

Univerzita Pardubice

Fakulta Chemicko-technologická

Protein PD-1 a jeho význam v regulaci IS a v protinádorové imunitě

Lucie Čiháková

Bakalářská práce

2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Lucie Čiháková**
Osobní číslo: **C16228**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Protein PD-1 a jeho význam v regulaci IS a v protinádorové imunitě**
Zadávající 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 struktury PD-1 proteinu, jeho významu a fyziologické funkce v lidském organismu. Popište roli tohoto proteinu v regulaci aktivity imunitního systému a v rámci fungování protinádorové imunity.
2. Zaměřte se a popište metody používané pro studium struktury, příp. studium funkce a významu PD-1 proteinu.
3. Zhodnoťte možnosti využití dosavadních znalostí o funkci PD-1 pro možnou terapii nádorů, případně terapii jiných závažných onemocnění. Zaměřte se na popis a zhodnocení vědeckých výsledků dosažených v posledních 10 letech. Uveďte, zda jsou protein PD-1 či jeho inhibitory (např. monokl. protilátka) již vyráběny *in vitro* a využívány v rámci výzkumných nebo klinických studií.
4. Vypracujte literární rešerši o PD-1 proteinu v členění textu do kapitol dle doporučené osnovy. Jako zdroje informací používejte odborné články z hodnotných odborných časopisů českých i zahraničních (anglický jazyk).
5. Informace přehledně zpracujte, použijte obrázky, schémata a grafy a ze získaných literárních údajů vyvoďte závěry, jak budou tyto nové informace o proteinu a jeho využití v regulaci IS, případně v rámci podpory protinádorové imunity.

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

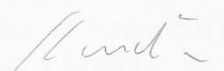
Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2018**

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 literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající 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

Lucie Čiháková

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych zde chtěla poděkovat prof. RNDr. Zuzaně Bílkové, Ph.D. za odborné vedení, pomoc a udělené rady při psaní mé bakalářské práce.

ANOTACE

Kompilační práce se zabývá proteinem PD-1. Tento protein se nachází na povrchu buněk a spolu se svými ligandy PD-L1 a PD-L2 potlačuje aktivaci T lymfocytů. Tento mechanismus využívají nádorové buňky pro únik před imunitním systémem. Dochází k nárůstu PD-1 na povrchu buněk, čehož lze využít k léčbě nádorových onemocnění.

KLÍČOVÁ SLOVA

PD-1, PD-L1, PD-L2, nádorová buňka.

TITLE

Protein PD-1 and his importance in regulation IS and in anti-tumor immunity.

ANNOTATION

The compilation thesis deals with PD-1 protein. This protein is located on the cell surface and together with his ligands PD-L1 and PD-L2 inhibits T cell activation. This mechanism is used by tumor cells to escape the immune system. There is an increase in PD-1 on the cell surface, which can be used to treat cancer.

KEYWORDS

PD-1, PD-L1, PD-L2, tumor cell.

OBSAH

Seznam obrázků	10
Seznam zkratek	11
Úvod	13
1 Protein PD-1	14
1.1 Struktura PD-1	14
1.2 Ligandy PD-L1 a PD-L2.....	15
1.2.1 Výskyt PD-L1 a PD-L2	16
1.2.2 Komplex PD-1/PD-L1 a PD-1/PD-L2	17
1.2.3 Aktivace ligandů	18
1.3 Funkce PD-1	18
1.3.1 Mechanismus signálních drah PD-1/PD-L	19
2 PD-1 a imunitní systém.....	22
2.1 Hematopoetické buňky	22
2.1.1 T lymfocyty.....	22
2.1.2 B lymfocyty	24
2.1.3 Dendritické buňky.....	25
2.1.4 Monocyty	26
2.2 Nehematopoetické buňky	27
2.2.1 Epitelové buňky	27
2.2.2 Buňky vaskulárního endotelu	28
3 PD-1 a nádorové bujení.....	29
4 Metody stanovení PD-1	32
4.1 Průtoková cytometrie	32
4.2 Izotermální titrační kalorimetrie	33
4.3 Western Blotting	34
4.4 Povrchová plazmonová rezonance.....	34
4.5 Mikročipová analýza.....	35
5 Klinické využití PD-1.....	36

5.1	Autoimunitní onemocnění	38
5.2	Infekční onemocnění.....	39
Závěr		40
Použitá literatura		41

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Schéma proteinu PD-1.....	14
Obrázek 2: PD ligand na povrchu APC.	16
Obrázek 3: Strukturní základy interakce PD-1/PD-L1 (PD-L2).....	17
Obrázek 4: PD-1/PD-L inhibuje aktivované T lymfocyty.	19
Obrázek 5: schéma aktivace/inhibice receptorů PD-1	20
Obrázek 6: Ligace T lymfocytů na PD-1	23
Obrázek 7: Schéma interakce mezi T lymfocytem, B lymfocytem a monocytem.....	24
Obrázek 8: Imunologické spojení mezi DC a T lymfocytem	26
Obrázek 9: Epitelové buňky s aktivovaným PD-1	28
Obrázek 10: Lidský PD-1 na povrchu prasečích endotelových buněk	29
Obrázek 11: Možnosti ovlivnění imunokompetentních buněk, buňkou nádorovou prostřednictvím PD-L.....	30
Obrázek 12: Inhibiční účinky B7-H1 v nádorové imunitní odpovědi.....	31
Obrázek 13: Nádorová imunologie a metabolická dráha PD-L1/PD-1.	37
Obrázek 14: Úloha NK buněk při blokádě kontrolního mechanismu.....	38
Obrázek 15: Infekční virus a PD-1 v imunitní reakci	39

SEZNAM ZKRATEK

APC	antigen prezentující buňka (z angl. „Antigen Presented Cell“)
B7-H1	B7-homolog 1
BTLA	B a T lymfocytární atenuátor (z angl. „B and T Lymphocyte attenuator“)
CD	speciální znaky buněčných linií (z angl. „Cluster of Differentiation“)
CTL	cytoxické T lymfocyty
CTLA	antigen cytotoxického T lymfocytu (z angl. „Cytotoxic T Lymphocyte Antigen“)
FAD	Úřad pro kontrolu (z angl. „Food and Drug Administration“)
FSC	přímý rozptyl (z angl. „Forward Scatter“)
GM-CSF	granulocytový/makrofágový faktor stimulující kolonie (z angl. „Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor“)
HCD	horní cesty dýchací
hPD	lidská programovaná smrt (z angl. „Human Programmed Death“)
hPD-L	ligand lidské programované smrti (z angl. „Human Programmed Death Ligand“)
Ig	imunoglobulin
IgSF	superrodina imunoglobulinů (z angl. „Immunoglobulin Super family“)
INF	interferon
IL	interleukin
ITC	izotermální titrační kalorimetrie (z angl. „Isothermal Titration Calorimetry“)
ITIM	tyrosinový imunoreceptor s inhibujícím motivem (z angl. „Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibitory Motif“)
ITSM	tyrosinový imunoreceptor s přepínacím motivem (z angl. „Immunoreceptor Tyrosine-Based Switch Motif“)
mPD-L	myší ligand programované smrti (z angl. „Mice Programmed Death Ligand“)
PBMC	mononukleární buňka periferní krve (z angl. „Peripheral Blood Mononuclear Cell“)
PBMCs	mononukleární buňky periferní krve (z angl. „Peripheral Blood Mononuclear Cells“)
PCR	polymerázová řetězová reakce (z angl. Polymerase Chain Reaction)

PD	programovaná smrt (z angl. „Programmed Death“)
Pdcd	programovaná buněčná smrt (z angl. „Programmed Cell Death“)
PD-L	ligand programované smrti (z angl. „Programmed Death Ligand“)
RGMb	RGM signální protein, inhibitor axonálního růstu (z angl. „Repulsive Guidance Molecule B“)
SDS	dodecylsulfát sodný (z angl. „Sodium Dodecyl Sulfate“)
SSC	boční rozptyl (z angl. „Side Scatter“)
TCR	receptor T buněk (z angl. „T Cell Receptor“)

ÚVOD

Největší a nejdůležitější úloha imunitního systému je ochrana lidského organismu před škodlivými vnitřními a vnějšími vlivy. K obraně využívá lidský organismus několik mechanismů, které zajišťují správnou funkci všech procesů imunitního systému. Jsou však nutné jejich kontroly, aby nedošlo ke vzniku autoimunitního onemocnění. K takovýmto kontrolním mechanismům patří mj. protein PD-1.

PD-1 byl objeven v roce 1992 týmem Yasumasa Ishidy. Ten se zabýval studiem apoptózy a proteinů programované smrti [1]. Tento protein se začal zkoumat blíže pro jeho inhibiční účinky. V konjugaci se svými ligandy dokáže potlačit aktivaci T lymfocytů.

Ukázalo se, že tohoto mechanismu využívají některé nádorové buňky pro své maskování před imunitním systémem. Tato vlastnost se začala využívat při onkologických vyšetření, protože zvýšený výskyt mohl indikovat nádorové bujení. Kromě využití jako nádorový marker se PD-1 se svými ligandy využívá i při léčbě. K tomu napomáhají specifické protilátky anti-PD-1.

Tato kompilační práce popisuje aktuální znalosti o klinicky významném proteinu PD-1, popisuje jeho strukturu, funkci a význam. V závěru práce upozorňuje na klinické využití popsaného mechanismu při nádorové terapii.

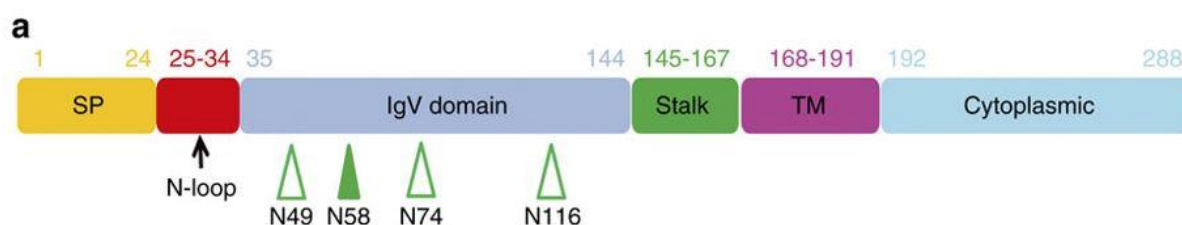
1 PROTEIN PD-1

Receptor buněčné smrti neboli PD-1, je jeden z inhibičních receptorů, který potlačuje aktivaci T lymfocytů. Tyto inhibiční receptory slouží jako kontrolní body imunitního systému proti neomezenému aktivování T lymfocytů. Mají také důležitou roli v udržování periferní tolerance a imunitní homeostázy v průběhu infekce. Jedním z těchto inhibitorů je právě PD-1 [2].

1.1 Struktura PD-1

Molekuly PD patří do skupiny B7 kostimulačních a funkčních proteinů adaptivního imunitního systému. PD-1 neboli CD279 je vystaven na povrchu lymfocytů a makrofágů. Jeho ligand PD-L1 neboli CD274, se nachází na povrchu buněk imunitního systému a nehematopoetických buňkách [3].

Protein PD-1 obsahuje 288 aminokyselin [7] a jeho velikost se pohybuje kolem 55 kDa [3]. Patří k povrchovým glykoproteinům monomerního typu I, který patří do imunoglobulinové superrodiny IgSF [5]. Tyto imunoglobuliny na povrchu obsahují jeden dusíkatý konec podobný IgV doméně, jenž je dlouhý přibližně 20 aminokyselin a odděluje IgV doménu z plazmatické membrány, transmembrány a cytoplazmatické domény [7].



Obrázek 1: Schéma proteinu PD-1

Celý protein PD-1 je rozdělen mezi ektodoménu (signální peptid, N-smyčka, IgV doména a oblast stonku), transmembránu a nitrobuněčnou doménu. N58 značí N-glykosylaci, která může být pozorována v komplexní struktuře ektodomény. Tato glykosylace je značena plnou zelenou šipkou, zbylé N-glykosylace označují duté zelené šipky. Čísla označují polohy aminokyselin. Převzato a upraveno [4].

PD-1 (Obr.1) je často zařazován do skupiny CD28, většinou jen na základě jejich funkčních podobností. Avšak PD-1 sdílí více strukturní homologie s antigenními receptory a CD8. Může tak být považován za přechod mezi antigenními receptory a proteiny CD28. Tento fakt naznačuje, že PD-1 podobný protein byl prekurzorem signálních receptorů skupiny IgSF [5].

Třídění proteinů podle jejich funkce, jako je tomu například u enzymů, se ukázalo obtížným úkolem. Platí to zejména pro proteiny obsahující doménu s aminokyselinovou sekvencí s podobností k imunoglobulinům – imunoglobulinová superrodinná (IgSF) doména. Po sekvenaci imunoglobulinů se ukázalo, že obsahují strukturně diskrétní domény o 100 aminokyselinách. Ty se mohou dělit do dvou kategorií. První je založena na funkci (variabilní doména neboli V-doména), druhá na velikosti (trvalá doména neboli C-doména) [6].

Cytoplazmatická doména IgV se skládá z inhibičního imunoreceptoru na základě tyrozinového motivu (ITIM) a imunoreceptoru se spínačem na základě tyrozinového motivu (ITSM). Mutagenetické studie ukazují, že tyrozin v rámci ITSM motivu je základní pro funkci PD-1 T lymfocytů a B lymfocytů. Na sekvenci ITSM se může vázat protein tyrozinové fosfatázy SHP-1 a SHP-2. Zatím však není zjištěno, zda tato vazba probíhá i za fyziologických podmínek. Dalším důležitým proteinem je extracelulární cystein. Tento cystein je obsažen v CD28, cytotoxických T lymfocytech a dalších buňkách, kromě PD-1. Umožňuje tvorbu homodimerů. Protože PD-1 cystein neobsahuje, může tvořit pouze monodimery. [8]

1.2 Ligandy PD-L1 a PD-L2

PD-1 má dva přírodně se vyskytující ligandy. Těmi jsou PD-L1 (B7-H1 neboli CD247) a PD-L2 (B7-DC neboli CD273). Oba dva ligandy jsou I typ transmembránového glykoproteinu založeného na IgC- a IgV- extracelulární doméně (Obr. 2). Ligandy sdílí z nějakých 20 % aminokyseliny totožné s B7-1 a B7-2, což jsou ligandy pro CD28 a CTLA-4. PD-L1 a PD-L2 mají krátké cytoplasmatické konce bez známého motivu pro přenos signálu, což naznačuje, že tyto ligandy nepřenášejí žádný signál pro interakci s PD-1 [9]. PD-L1 má krátkou cytoplasmatickou doménu (okolo 30 aminokyselin), která se uchovala napříč druhy, ale není známá její funkce. To délka cytoplasmatické domény PD-L2 je závislá na kom se vyskytuje. U hlodavců činí její délku pouze 4 aminokyseliny u ostatních savců její délka odpovídá délce PD-L1 [8].

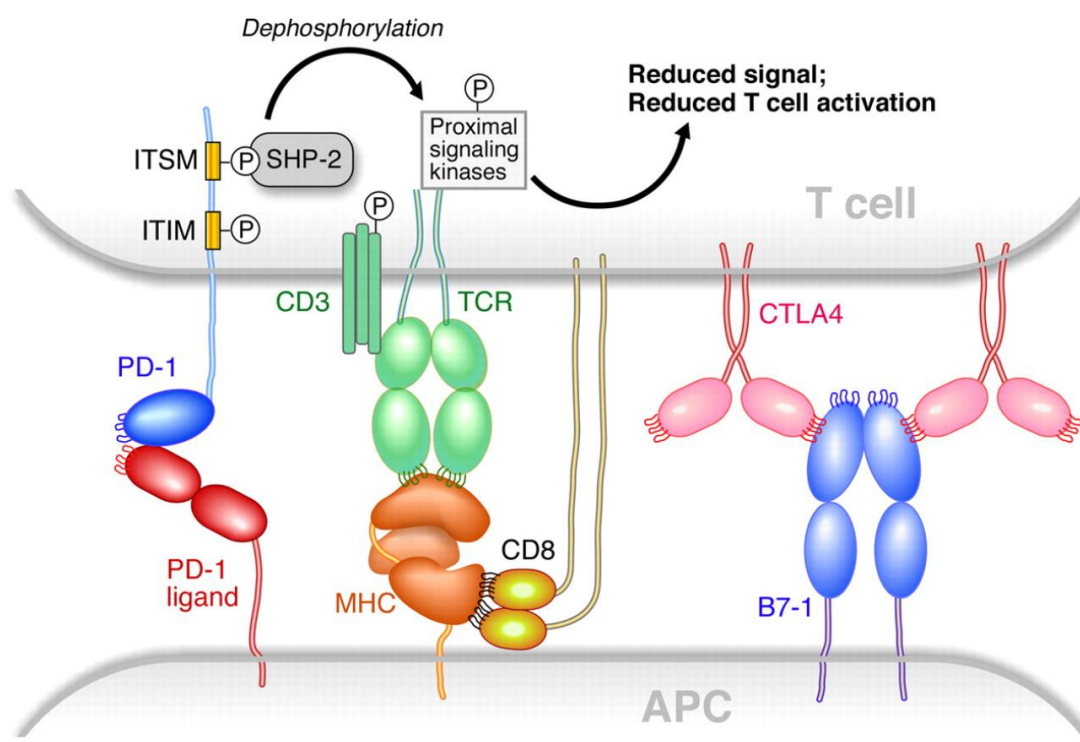
PD-1 váže dva ligandy. První PD-L1 byl identifikován pomocí hledání stejné homologie s již známou molekulou B7. Druhý, PD-L2 byl nalezen díky homologii s B7 a PD-L1 [10].

Afinita k PD-1 se u obou ligandů liší. PD-L2 má afinitu třikrát větší než PD-L1. PD-L1 se zase může vázat na B7-1, což PD-L2 nemůže [8].

K odhalení vazby mezi PD-L1 a B7-1 byli použity biofyzikální techniky. Míra interakce byla stanovována v párech B7-1 s CD28 a B7-1 s CTLA-4. Použitím proteinového zesílení a hmotnostní spektroskopie se ukázalo, že tyto dva proteiny překrývali rozhraní B7-1:CTLA-4 a

rozhraní PD-L1:PD-1. Interakce B7-1:PD-L1 může inhibovat buněčnou proliferaci T lymfocytů a produkci cytokinů [11].

Role, kterou mají PD-L1 a PD-L2 v aktivaci T lymfocytů jsou jak inhibiční, tak stimulační. Bylo také prokázáno, že B7-1 je schopen se navázat s PD-L1, který je již asociovaný s T lymfocyty. Tato vazba má za následek inhibování proliferace T lymfocytů a produkci cytokinů [12].



Obrázek 2: PD ligand na povrchu APC.

Na konci IgV domén jsou přidány smyčky pro zdůraznění jejich orientace, které jsou podobné oblastem určujícím komplementaritu. Převzato a upraveno [26]

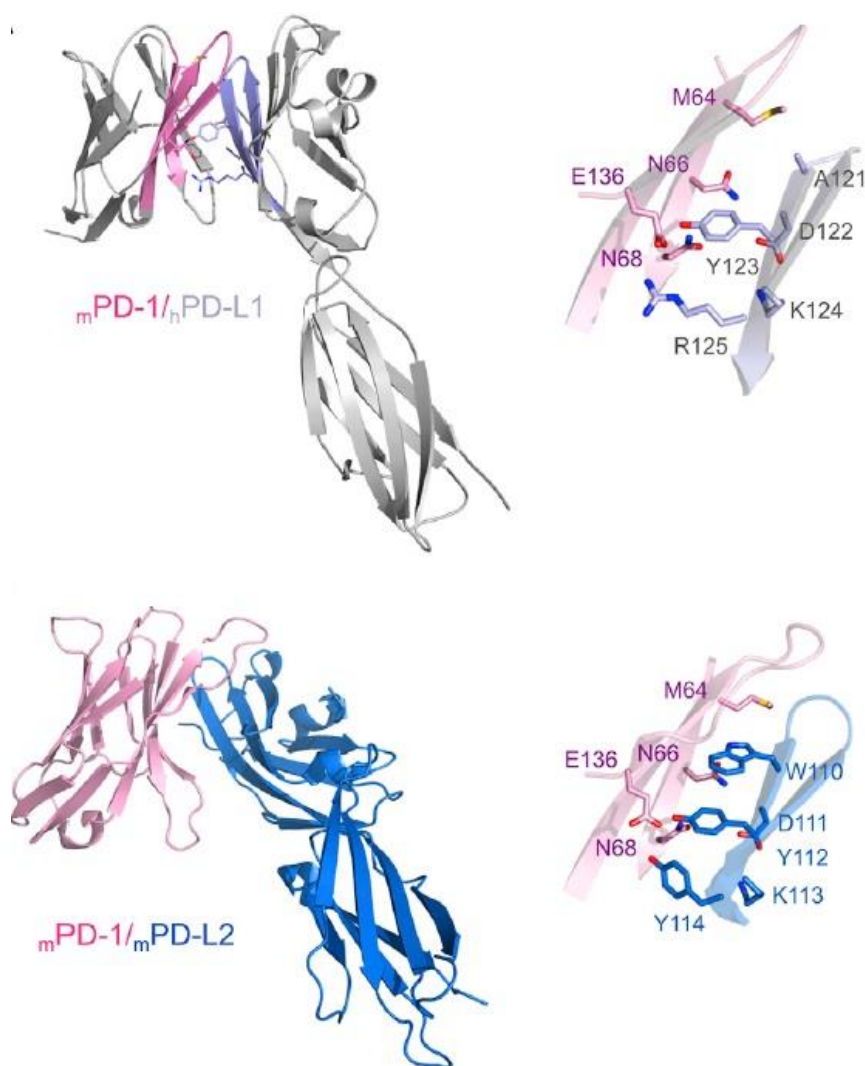
1.2.1 Výskyt PD-L1 a PD-L2

Ligandy PD-L1 a PD-L2 se stejně jako PD-1 vyskytují na hematopoetických a nehematopoetických buňkách. Jejich mRNA byla dále nalezena na různých tkáních, včetně srdce, plic a placenty [10].

PD-L2 je vyjádřen na méně buňkách než PD-L1. PD-L2 se inducibilně vyskytuje na povrchu dendritických buněk, makrofágů, peritoneální B1 B buněk, paměťových B buněk a na povrchu žírných buněk získaných z kostní dřeně. V kontrastu k PD-L2 je PD-L1 široce vyjadřován na povrchu hematopoetických a nehematopoetických buněk. PD-L1 se nejpodstatněji vyskytuje na povrchu B lymfocytů, dendritických buněk, makrofágů, žírných buněk pocházející z kostní dřeně a T lymfocytech. Více jsou dále regulovány při jejich aktivaci. PD-L1 je také

vyjádřen na široké škále druhů nehematopoetických buněk, včetně vaskulárního endotelu, fibroblastických retikulárních buňkách, buňkách pankreatických ostrůvků, astrocytech, neuronech a buněk imunitní výsady, dále na trofoblastech v placentě a v pigmentu sítnice epiteliálních buněk v oku a tato vazba ochraňuje oko od aktivovaných T lymfocytů [13, 14].

V brzlíku se PD-L1 vyskytuje na povrchu buněk lokalizovanými v jádru, zatímco PD-L2 se omezeně vyskytuje na stromálních buňkách [14].



Obrázek 3: Strukturní základy interakce PD-1/PD-L1 (PD-L2).

Převzato a upraveno [25].

1.2.2 Komplex PD-1/PD-L1 a PD-1/PD-L2

Vysoké rozlišení krystalové struktury komplexu tvořeného úplnými ektodoménami myších PD-1 a PD-L2 odhalilo, že tento komplex má stechiometrii v poměru 1:1, receptor:ligand. Tento komplex se vykazuje odlišným rozhraním a molekulární organizací, od pozorovaného

inhibičního komplexu CTLA-4/B7 [12]. Původně však krystalová struktura ukazovala spíše na stechiometrii 2:1. Poměr 1:1 byl potvrzen biochemickými testy [15]. (Obr. 3)

1.2.3 Aktivace ligandů

Tvorba a vyjádření PD-L1 a PD-L2 závisí na zánětlivém prostředí, protože produkované cytokiny, jsou silnými stimulanty. Interferony typu 1 a 2 indukují jejich vyjádření na T a B lymfocytech a epitelových a endotelových buňkách. Běžné γ řetězce cytokinů IL-2, IL-7 a IL-5 navyšují PD-L1 na lidských T lymfocytech. IL-21 je nenavyšuje na T lymfocytech, ale stimuluje je na B lymfocytech z periferních mononukleárních buněk (PBMCs) a na monocycytech. PD-L2 je *in vitro* stimulován interferony, IL-4 a granulocytární/makrofágovým kolonie-stimulujícím faktorem (GM-CSF). Studie ukazují, že vyjádření PD-L1 závisí na dvou vazebných místech IFN regulujícím faktoru-1 (IFR-1). Tato vazebná místa byla nalezena nejen u lidí, ale i u myši [8]. Vyjádření PD-L1 na monocycytech lze také indukovat IL-10. IL-4 spolu s GM-CSF, stimulují PD-L2 na dendritických buňkách. INF- γ může regulovat PD-1 na nelymfoidních buňkách. PD-1 jsou na povrchu epiteliálních buněk vyjadřovány kontinuálně, ale při léčbě *in vitro*, způsobí INF- γ jejich rychlý nárůst [14].

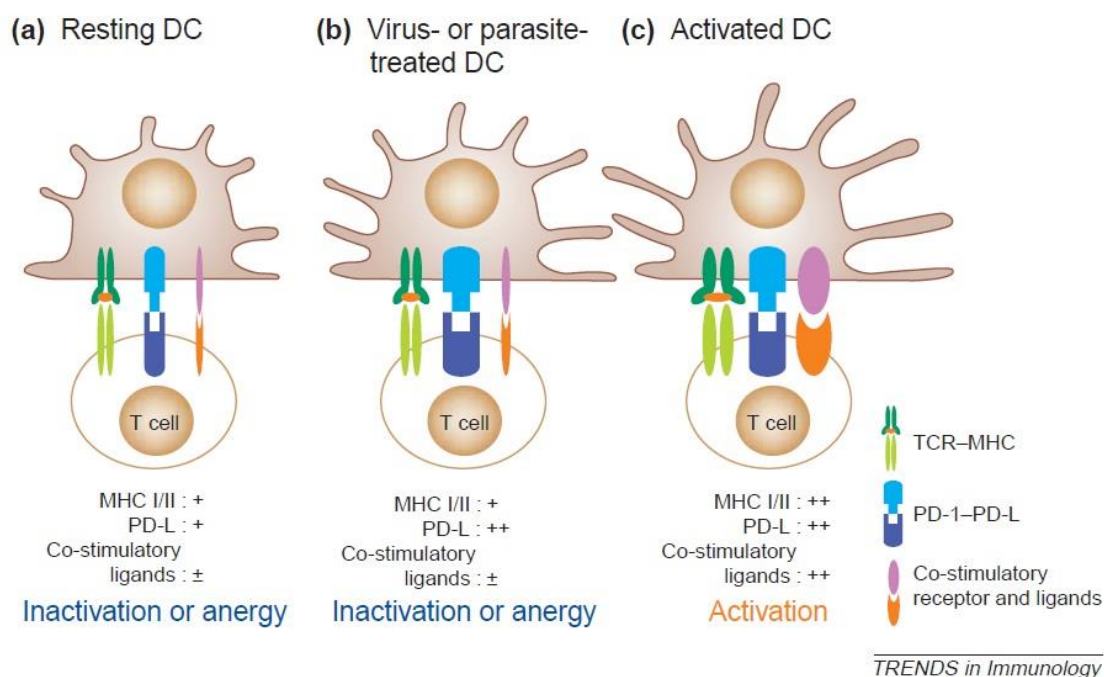
1.3 Funkce PD-1

Imunitní systém má soubor funkcí pro ochranu organismu nejen proti různým cizím patogenům, ale i proti vlastním autoreaktivním a destruktivním tkáním. Tento selektivní proces je řízen mechanismem centrální (je aktivní pouze ve fetálním období) a periferní tolerance. Centrální tolerance je odpovědná za odstranění autoreaktivních buněk, ne všechny buňky jsou ale odstraněny a unikají na periferii. Periferní kontrolní mechanismy volné imunokompetentní buňky rozpoznávají a rozhodují, prostřednictvím inhibičních a regulačních T a B lymfocytů o jejich zapojení do imunitní odpovědi nebo o jejich anergizaci a zničení. Specifická inhibice odpovídá za křehkou rovnováhu mezi účinnou imunitou a tolerancí vlastních tkání [16]. PD-1 jako protein rodiny CD28/B7 jedním z popsanych inhibičních receptorů. Další jsou CTLA-4 na povrchu regulačních B a T lymfocytů [17].

PD-1 je nejčastěji aktivní v periferních tkáních, kde mohou T lymfocyty potlačovat jejich setkání s PDL-1 a PDL-2 a také přispívá k funkčním defektům paměti CD8 T lymfocytů [18, 19].

1.3.1 Mechanismus signálních drah PD-1/PD-L

Způsob působení PD-1/PD-L1 je důležitý pro několik fyziologických procesů, včetně rozvoje centrální a periferní tolerance [3]. Nejdůležitější úlohou PD-1/PD-L dráhy, je inhibice funkce T lymfocytů. Té lze zabránit navázáním PD-1 s PD-L1 na T lymfocytech nebo PD-L2 na APC (Obr. 4) [20].



Obrázek 4: PD-1/PD-L inhibuje aktivované T lymfocyty.

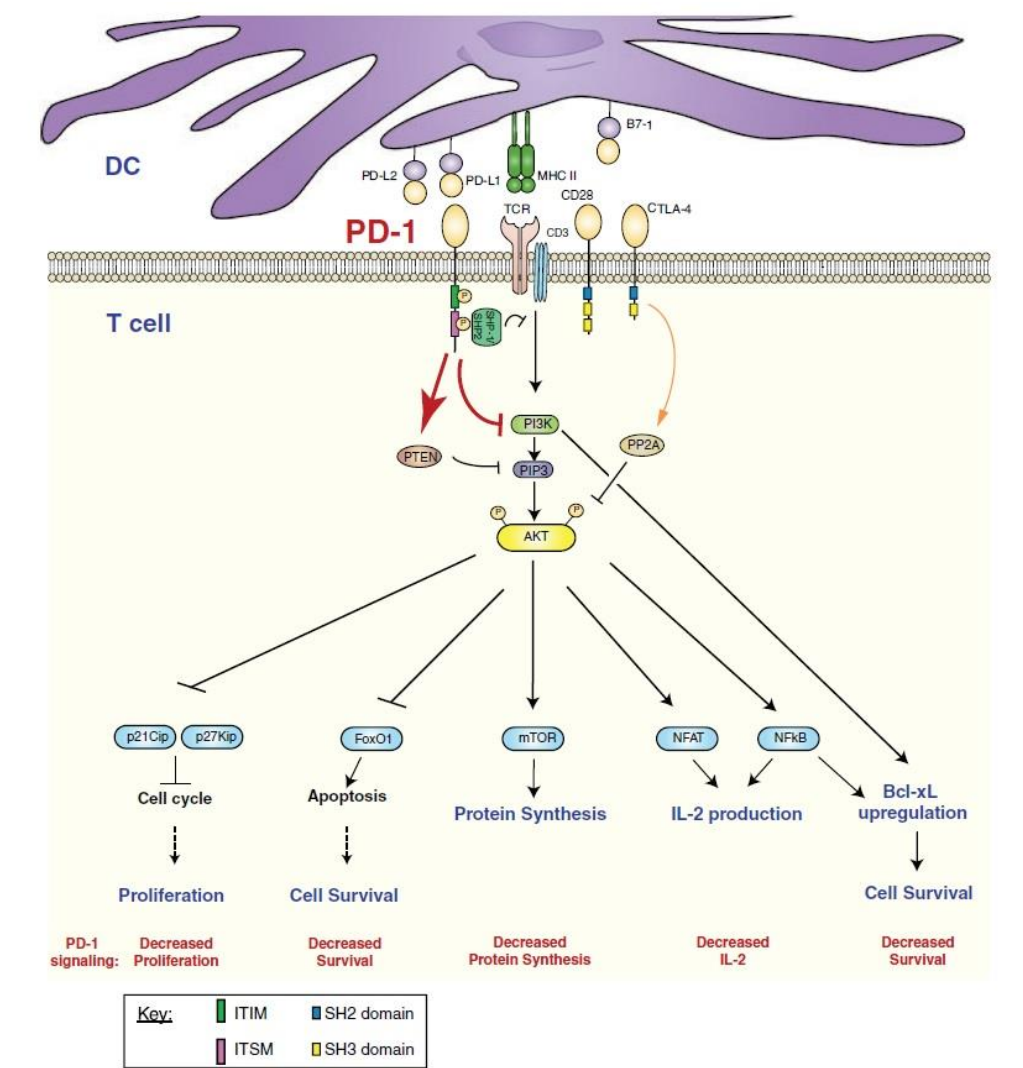
Rovnováha mezi PD-L a kostimulačními ligandy na T lymfocytech a (a) klidových dendritických buňkách, (b) virech nebo parazitech, nebo (c) aktivovaných dendritických buňkách. Převzato a upraveno [21].

PD-1 a PD-L1 se na povrch T lymfocytů tvoří a vyjadřují během jejich vývoje v brzlíku. Jejich zvýšený výskyt blokuje pozitivní výběr T lymfocytů. Absence brzlíkového PD-1 zase vede ke zvýšení dvojité-negativních T lymfocytů [3].

Víme, že PD-1 je inhibítozem imunitní odpovědi pouze v případě, že dojde k propojení TCR případně BCR povrchových receptorů T a B lymfocytů s HLA Ag II. třídy na DC (APC), na rozdíl CD28Zprostředkovaná signalizace PD-1 inhibuje spotřebu glukózy, produkci cytokinů, proliferaci a přežití T lymfocytů. Dále je také zabráněno tvorbě transkripčních faktorů, jenž mají spojitost s funkcí efektorových buněk, včetně GATA-3, T-bet a Eomes [14].

Když se PD-1 spojí s ligandem, začne fosforylace tyrozinových zbytků (Obr. 5). Jejich fosforylace vede k navázání proteinových tyrozinových fosfatáz (PTP), jako je například SHP2.

Zajímavostí je, že SHP-2 se rekrutuje po indukované aktivaci TCR buněk i přes nepřítomnost zapojení PD-1. Avšak, aby proběhlo aktivní blokování T lymfocytů, musí být PD-1 zapojeno. PD-1 je také v těsné blízkosti CD3 a CD28, které pak fungují jako negativní regulátory. Zapojené PTP mohou defosforylovat kinázy a antagonizovat pozitivní odpovědi, které nastávají prostřednictvím TCR a CD28. Ovlivňují signální dráhy včetně těch, které zahrnují fosfoinositid-3-kinázu (PI3K) – AKT, RAS, mimobuněčnou kinázu ovlivňující signál (ERK), VAV a fosfolipázu C γ (PLC γ). Funkčním závěrem těchto účinků je snížení aktivace, proliferace, přežití a tvorba cytokinů T lymfocytů a změněného metabolismu. [22, 23, 24].



Obrázek 5: schéma aktivace/inhibice receptorů PD-1

Ligace TCR a PD-1 vede k fosforylaci (P) tyrosinu v ITIM a ITSM PD-1. Převzato a upraveno [8].

V cytoplazmatické oblasti inhibičních receptorů, jako je IgC Fc receptor typu IIB a CD22, byla identifikována sekvence obklopující N-terminální tyrosin. Tato sekvence okolo tyrosinu

splňuje požadavek ITIM. Lze proto předpokládat, že PD-1 ke svému inhibičnímu účinku využívá právě tento tyrozinový zbytek. Při stimulaci jsou tyto zbytky ITIM obvykle fosforylovány. Fosforylace umožňuje získání Src homolog 2 (SH2), jenž obsahuje fosfatázu, která má velice důležitou roli při negativní regulaci buněčné aktivity. Vícestupňový model pro signalizaci BCR nejdříve stimulací aktivuje Lyn. Lyn pak fosforyluje tyrozinový zbytek v imunoreceptoru na tyrozinové bázi s motivem aktivací $Ig\alpha$ a $Ig\beta$, čímž dojde k náboru dalšího proteinu tyrozinové kinázy, Syk. Aktivovaný protein tyrozinové kinázy fosforyluje tyrozinový zbytek v ITIM. Ten nabírá fosfatázu obsahující SH2 k defosforylaci a deaktivaci signálových převodníků. Tím pádem je regulace fosforylace tyrosinu důležitá jak v aktivaci, tak i inhibici B lymfocytů. Mezi imunoinhibičními receptory ITIM se uvádí, že $Fc\gamma IIB$ rekrutují doménu obsahující SH2-fosfatidylinozitol 5-fosfatáza (SHIP) s vazbou na BCR, jehož zapojení vede k deaktivaci CD19 a inhibici signalizace zprostředkovanou molekulou CD19 [27, 28].

Ukazuje se že PD-1 přednostně signalizuje inhibici CD28 více než dráhy řízené TCR. Citlivost PD-1 je pravděpodobně ovlivněna závislostí různých druhů T lymfocytů na TCR nebo CD28 [23].

S přihlédnutím ke chronickým virovým infekcím, hraje roli inhibiční dráha PD-1 i u nádorů. PD-1 se vyskytuje na různých lidských nádorech. Tvorba a výskyt PD-L1, zapříčiněna nádorovými buňkami koreluje s velmi špatnou prognózou, což naznačuje že rakovinné buňky tuto dráhu eliminují, aby se vyhnuly odpovědi imunitního systému [19].

2 PD-1 A IMUNITNÍ SYSTÉM

Jak bylo zmíněno v předchozí kapitole PD-1 a jeho ligandy se vyskytují na různých hematopoetických (T lymfocyty, B lymfocyty, monocyty, myeloidní dendritické buňky atd.) a nehematopoetických (epitelové, endotelové) buňkách. V následujících kapitolách bude pojednáno o jednotlivých typech buněk, které tento typ receptorů mají.

2.1 Hematopoetické buňky

2.1.1 T lymfocyty

Populace regulujících T lymfocytů je důležitá pro udržení periferní tolerance a hraje také důležitou roli v imunitních odpovědích jako jejich silný inhibitor [20].

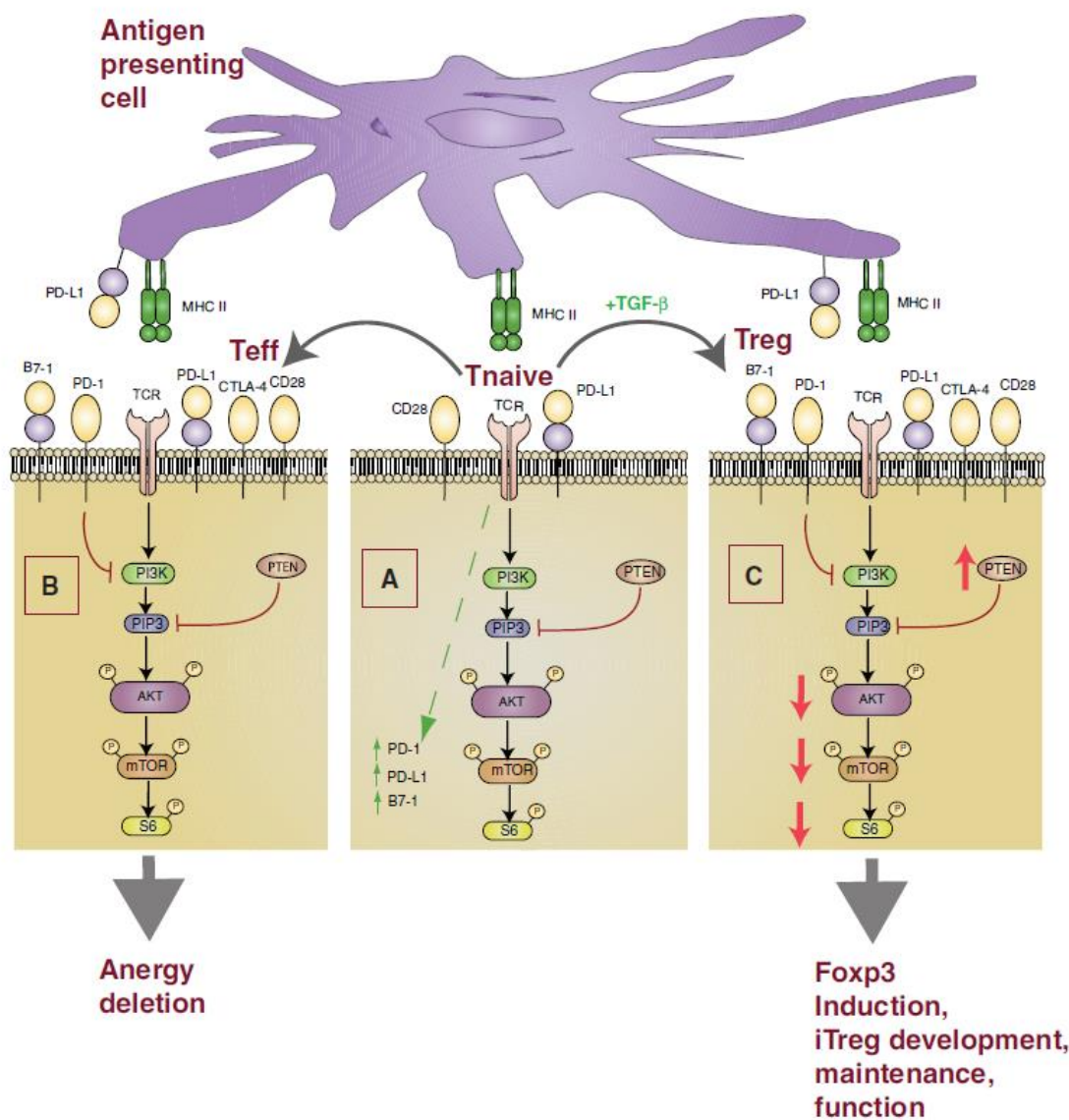
T lymfocyty patří do skupiny bílých krvinek. Vznikají v ústředních lymfatických orgánech. K primárním lymfoidním orgánům patří thymus a Fabriciova burza. Ta se vyskytuje u ptáků, savci mají její ekvivalent a u lidí je to kostní dřev. Zde se z pluripotentní hematopoetické kmenové buňky vznikají naivní lymfocyty, které získávají dospělost. Přeměňují se do plně funkčních T-lymfocytů. Maturace T lymfocytů probíhá v thymu [29]. Během jejich vývoje dochází k přeskupení genů kódujících receptor pro antigen, TCR. Ten pak společně s HLA napomáhá lymfocytové diferenciaci.

T lymfocyty se rozdělují podle povrchových znaků nebo funkčního hlediska do různých podtypů. Největší a základní subpopulace tvoří T lymfocyty, které na svém povrchu ukazují molekuly CD4 a CD8. Molekulu CD4 vyjadřuje subpopulace s pomocnou funkcí tzv. Th-helper. Znak CD8 je vyjádřen subpopulací s funkcí cytotoxickou tzv. Tc. [30]

CD4 T pomahačské lymfocyty mají důležitou úlohu v získané imunitě. Aktivují a povolávají další buňky imunitního systému včetně B lymfocytů, makrofágů, žírných buněk, neutrofilů, eozinofilů a bazofilů. Sekrecí cytokinů a výskytem specifických transkripčních faktorů se Th dělí na čtyři hlavní linie Th1, Th2, Th17 a Treg. Každá z těchto linií produkuje směs cytokinů, mezi ně patří např. IL-2, IL-9 a IL-10, INF γ a další [31].

CD8 T lymfocyty myjí cytotoxickou funkci neboli usmrcují poškozené buňky. Poškozené buňky jsou rozpoznávány TCR. Tento heterodimer je schopen přeskupovat DNA a podílet se na aktivaci T lymfocytu v odpovědi na prezentovaný antigen. TCR dělíme na TCR typu $\alpha\beta$

nebo $\gamma\delta$ a k jejich vývoji je zapotřebí thymového prostředí. K jejich aktivaci slouží MHC molekuly na buňkách prezentující antigen. Aktivací TCR se zahájí proces, na jehož konci dojde k buněčné proliferaci, diferenciaci, produkci cytokinů nebo k aktivaci indukované buněčné smrti (apoptózy) [32]. (Obr. 6)



Obrázek 6: Ligace T lymfocytů na PD-1

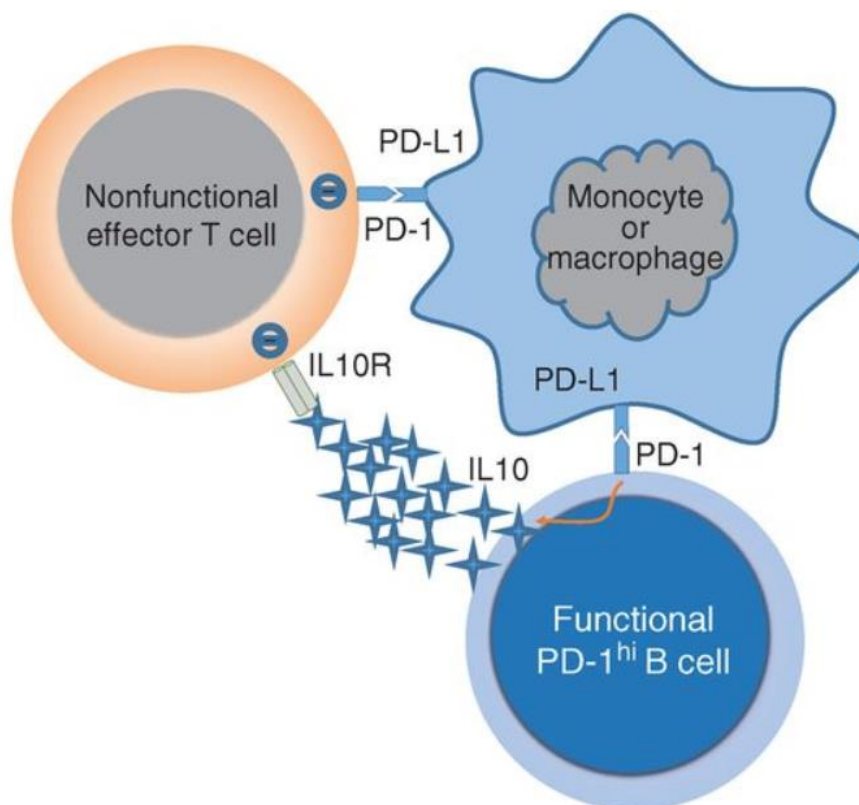
Po zapojení T lymfocytu do TCR dojde k navýšení PD-1 a PD-L1. (B) PD-L1 inhibuje PI3K-AKT v naivních T lymfocytech. Dochází k funkční inaktivaci naivních T lymfocytů a k inhibování diferenciaci a funkce efektorových T lymfocytů. (C) Je přítomen TGF- β , PD-1 zmírňuje účinky PI3K-AKT. Zvýhodněně ovlivňuje programování naivních T lymfocytů směrem k rozvoji a přežití iTreg. Převzato a upraveno [8]

2.1.2 B lymfocyty

B lymfocyty vznikají dělením a diferenciováním kmenových buněk v kostní dřeni. Kmenová buňka se rozděluje na dvě větve, myeloidní a lymfoidní. B lymfocyty patří do lymfoidní řady [33].

Zrání B lymfocytů je striktně udržovaný proces, v němž dochází k postupné přeměně V, (D) a J genových segmentů, které kódují variabilní (V) oblast těžkého a lehkého Ig řetězce. Naivní B lymfocyty putují z kostní dřene do germinálních center, kde se poprvé setkávají s antigenem. Tyto buňky mají zvýšenou životnost, rychlost a silnější imunitní odpověď na stimulaci a tvorbu somaticky mutovaných a afinitně zralých imunoglobulinových genů. Skoro polovina B lymfocytů v lidském těle je tvořena paměťovými buňkami, což je další vývojové stadium B lymfocytů. Ty kromě IgG, IgA tvoří i IgM s nebo bez IgD [34].

Na povrchu funkčních B lymfocytů se vyjadřují PD-1- (Obr. 7)



Obrázek 7: Schéma interakce mezi T lymfocyt, B lymfocyt a monocyt

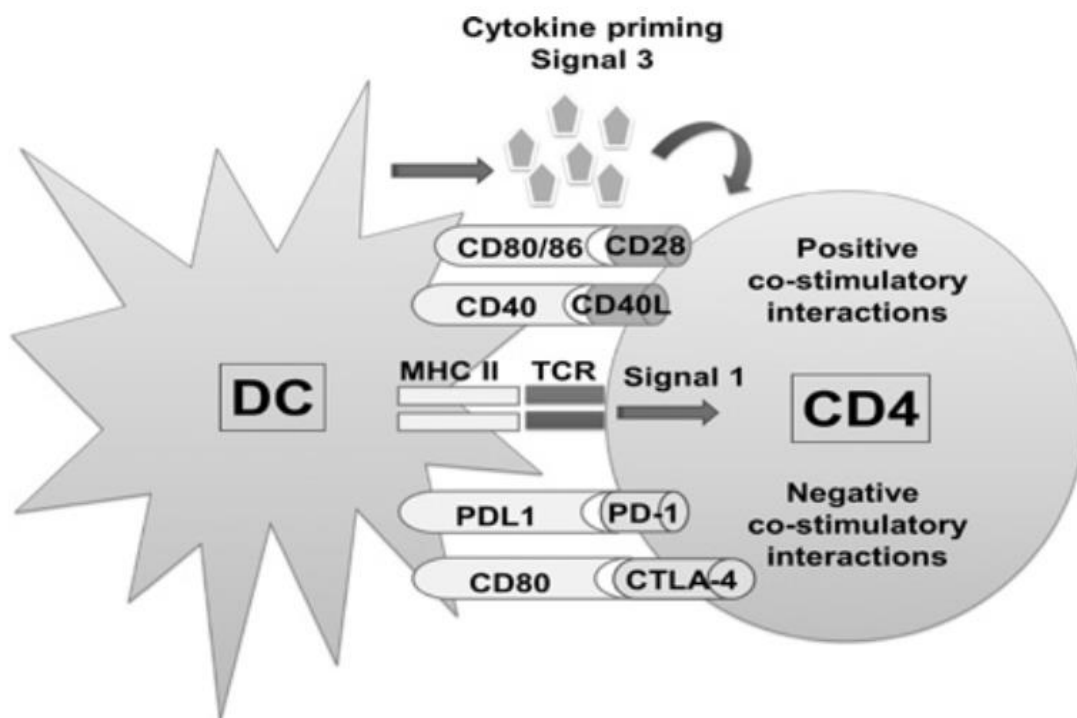
Přímá interakce PD-L1⁺ na povrchu monocytů nebo makrofágů s PD-1^{hi} B lymfocytů indukuje dysfunkci T lymfocytů prostřednictvím dependentním IL-10. Tato dysfunkce může být indikována i přímou interakcí PD-L1 – PD-1, mezi monocytem a T lymfocyt. Převzato a upraveno [36]

2.1.3 Dendritické buňky

Dendritické buňky jsou unikátními APCs a slouží jako hlídky imunitního systému. Samotné buňky neslouží jako efektory bojující proti patogenům, ale kontrolují získanou imunitu a poskytují základní signály k řízení požadované imunitní reakce. Fungují jako spojník mezi rychlou nespecifickou a pomalou specifickou částí imunitního systému [33]. (Obr. 8)

Všechny DC pocházejí ze společného makrofág/DC progenitoru, který se nachází v kostní dřeni. Tento progenitor se dále diferencuje na monocyt/makrofág nebo na společný progenitor dendritických buněk (CDP). CDP dává vzniknout plasmacytoidním dendritickým buňkám a pre-DC progenitorům. pDC plně dozrávají v kostní dřeni, kterou následně opustí do krevního řečiště již jako dospělé funkční buňky. To pre-DC na druhé straně migruje skrz vaskulární systém do tkání nebo lymfatických orgánů. Tam se dokončí jejich diferenciace na různá základní skupiny, jako je například $CD8\alpha^+/CD103^+$ DC nebo $CD11b^+$ DC [34].

Dendritické buňky se vyskytují nejvíce v kůži a ve sliznicích trávicího a dýchacího ústrojí. Slizniční DC jsou schopny se pomocí svých výběžků, dostat do prostoru mezi epiteliálními buňkami a odebrat tam vzorky potravních či jiných antigenů. V případě, že se v organismu nevyskytuje infekce, jsou nezralé DC využívány k pohlcování odumřelých buněk zdravých tkání. Mohou pohlcovat i různé rozpuštěné molekuly z mezibuněčné tekutiny. Ty pak mohou spolu s fragmenty antigenů vyjadřovat na svém povrchu v komplexu s MHC proteiny. Když nezralá buňka během své existence narazí na patogenní organismus aktivují se na zralé dendritické buňky [37].



Obrázek 8: Imunologické spojení mezi DC a T lymfocyt

Schéma popisuje tři signály mezi APC a T lymfocyt vedoucí k aktivaci T lymfocytu. První signál ukazuje vazbu komplexu peptidu MHC s TCR (uprostřed). Ve druhé vazbě je ukázána pozitivní kostimulační interakce, přesněji CD80/CD28 a CD40/CD40L (nahore). Poslední vazba zobrazuje negativní kostimulační interakci. V tomto případě mezi PD-L1/PD-1 a CD90/CTLA-4. Převzato a upraveno [35]

2.1.4 Monocyty

Monocyty, spolu s makrofágy a dendritickými buňkami pochází z myeloidní mononukleárních buněk (MMCs), které poskytují důležité snímací funkce přirozené imunity a zároveň představují skrz prezentaci antigenů i most k získané imunitě.

Monocyty jsou typické MMCs, tvořící asi 10 % všech mononukleárních buněk v periferní krvi. Mají nepřeberné množství funkcí při zánětu a velmi rychle se diferencují do buněk s fenotypem podobným DC a makrofágům, které se mohou od sídlících populací [38].

PD-L1 na povrchu monocytů může inhibovat T lymfocyty podle schématu na Obr. 6.

2.2 Nehematopoetické buňky

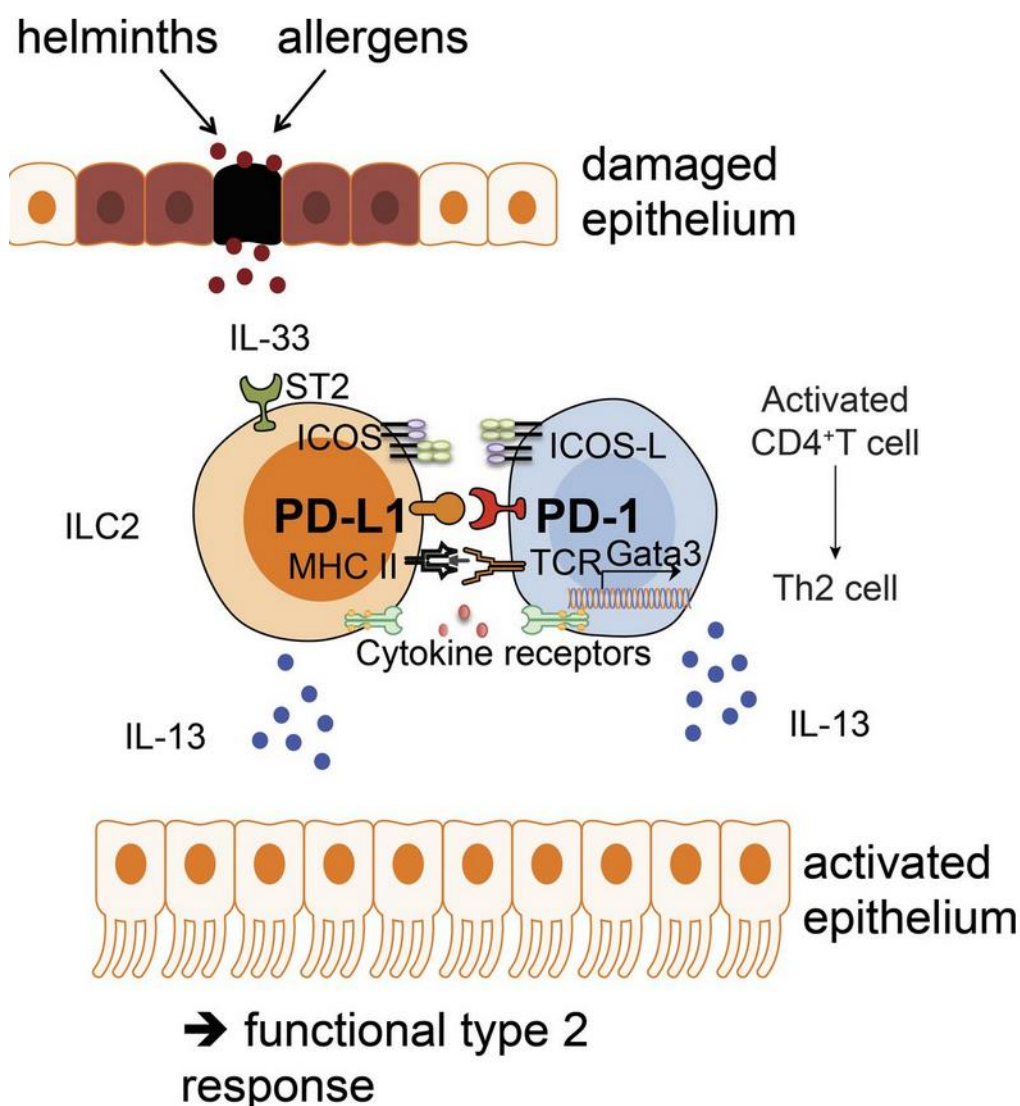
2.2.1 Epitelové buňky

Epitelové buňky jsou základem pro přežití a udržení homeostázy organismu. Všechny tyto buňky se vyskytují na povrchu sliznic, kůže, a dalších strukturách pro fyziologické funkce. Představují bariéru mezi vnitřním a vnějším prostředím. Dělíme je nejčastěji podle tvaru a funkce [39]. Pro zjednodušení je vytvořena následující tabulka. Aktivace PD-1 na epitelových buňkách při poškození epitelu napomáhá jeho obraně vůči škodlivým agens (Obr. 9).

Rozdělení epitelové tkáně

Podle uspořádání buněk			
	Plošný epitel (krycí epitel)		
	Trámčitý epitel (trojrozměrné trámce – játra, endokrinní žlázy)		
	Retikulární epitel (brzlík)		
Podle funkce			
	Krycí	Jednovrstevný	Plochý (endotel cév, glomerulus)
			Kubický (kanálky ledvin)
			Cylindrický (žaludek, děloha, HCD)
		Vícevrstevný	Dlaždicový (epidermis, jícen, dutina ústní)
			Kubický (vývod potních žláz)
			Cylindrický (spojivka, mužská uretra)
			Přechodný (ledvinná pánvička, ureter, močový měchýř)
	Žlázový (epitel žaludku, pankreatického acinu, hepatocyty)		

Aktivace PD-1 na epitelových buňkách při poškození epitelu napomáhá jeho obraně vůči škodlivým agens (Obr. 9).



Obrázek 9: Epitelové buňky s aktivovaným PD-1

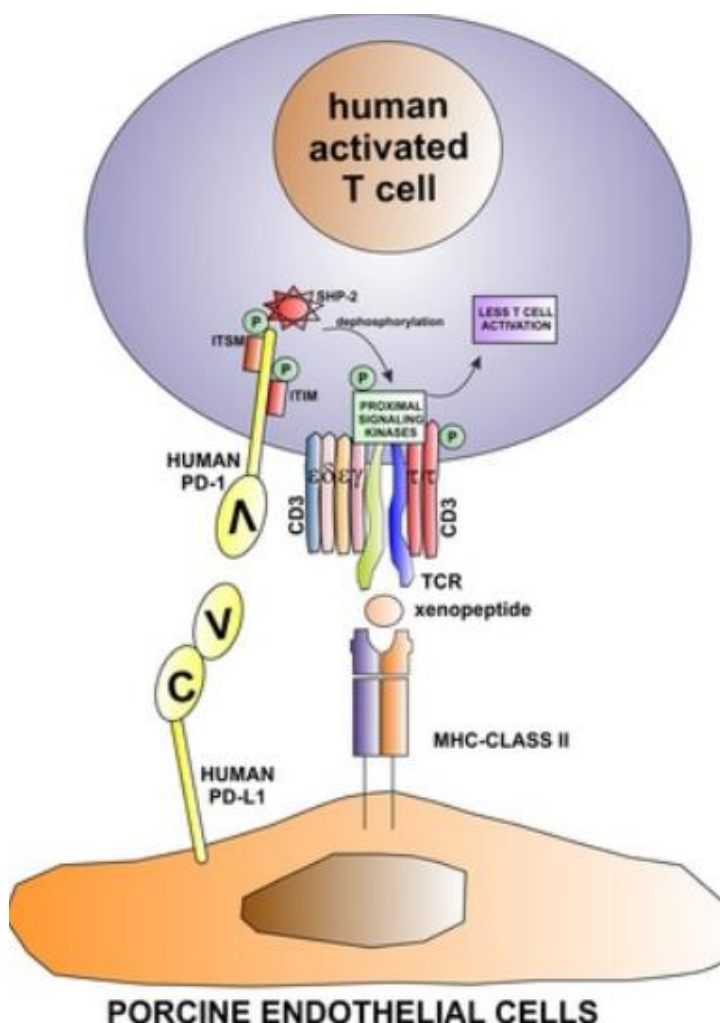
Poškozený epitel uvolňuje IL-33. IL-33 přes ST2 aktivuje ILC2. ILC zvyšuje densitu PD-L1 na povrchu buněk a interagují s T lymfocyty, tím se podpoří exprese GATA3. Začne tvorba IL-13, který následně aktivuje epitelové buňky. Převzato a upraveno [40].

2.2.2 Buňky vaskulárního endotelu

Buňky vaskulárního neboli cévního endotelu se nacházejí na vnitřní stěně cév. Jsou na bazální lamině a mají lehce zploštělý a protáhlý tvar v podélném směru cévy. Vyskytují se v tepnách, žilách a ve vlasečnicích. Má několik funkcí, z nichž nejpodstatnější je napomáhání srážecí kaskádě při poranění cévy.

Experimenty prokázali, že transgenní vyjádření lidského PD-1 na povrchu prasečích endotelových buněk může představovat přístup pro inhibici lidských xenoreaktivních buněk. Indu-

kovaný lidský PD-1, na prasečích endotelových buňkách, snižuje odezvy zprostředkované lidskými antiprasečími T lymfocyty. Zprostředkované T lymfocyty jsou inhibovány prostřednictvím signálů PD-1 [41] (Obr.10).



Obrázek 10: Lidský PD-1 na povrchu prasečích endotelových buněk

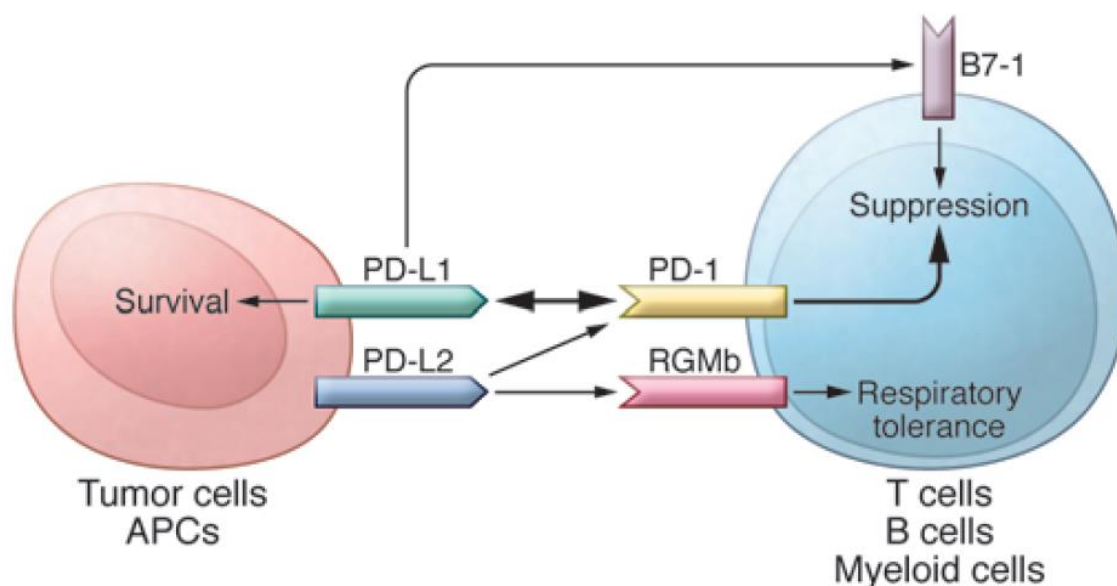
Genetická modifikace prasečího endotelových buněk genem pro lidský PD-L1 a studium jejich interakce s aktivovanými lidskými T lymfocyty. Převzato a upraveno [41]

3 PD-1 A NÁDOROVÉ BUJENÍ

Růst nádorové tkáně je určen rovnováhou mezi buněčnou proliferací a buněčnou smrtí. Z toho důvodu některé z nádorových mutací, které řídí růst a vliv nádoru, musí jednu z těchto dvou věcí regulovat [42]. Kromě regulování jednoho z těchto dvou mechanismů, je nádor také schopen vyhýbat se imunitní odpovědi. Tato schopnost je zajištěna tvorbou ligandů kostimulátorů negativních receptorů, které vystavuje na povrchu svých buněk [43] (Obr. 11).

Imunitní systém má tři cesty, jak se vypořádat s nádorovým bujením. První z nich je ochrana proti bakteriální či virové infekci, která může působit jako původce rakoviny. Druhý způsob je

napomáhání léčby zánětu. Třetí, nejvýznamnější způsob spočívá v rozpoznání a zničení rakoviných buněk. Maligně zvrhlá buňka také využívá v boji proti imunitnímu systému různé mechanismy. K těm patří ztrátu tumorových antigenů, snížení proliferace APC, odolnost vůči cytotoxickým molekulám [45]. Maligně zvrhlé buňky si pro svůj růst vytvářejí vhodné prostředí. Jeho hlavním rysem je zmírnění autoimunity, a to prostřednictvím regulace aktivovaných T lymfocytů a BTLA. Všechny tyto faktory posouvají imunitní mikroprostředí k imunosupresivnímu stavu. Tento proces se nazývá imunoeditace. Ta má tři stadia. V prvním dochází k eliminaci tumoru. Ve druhém nastává nastavení rovnováhy mezi tumorem a imunitním systémem a ve třetím vzniká nádor, kde buňky disponují silnějšími mechanismy inhibujícími imunitní systém. [45, 46]

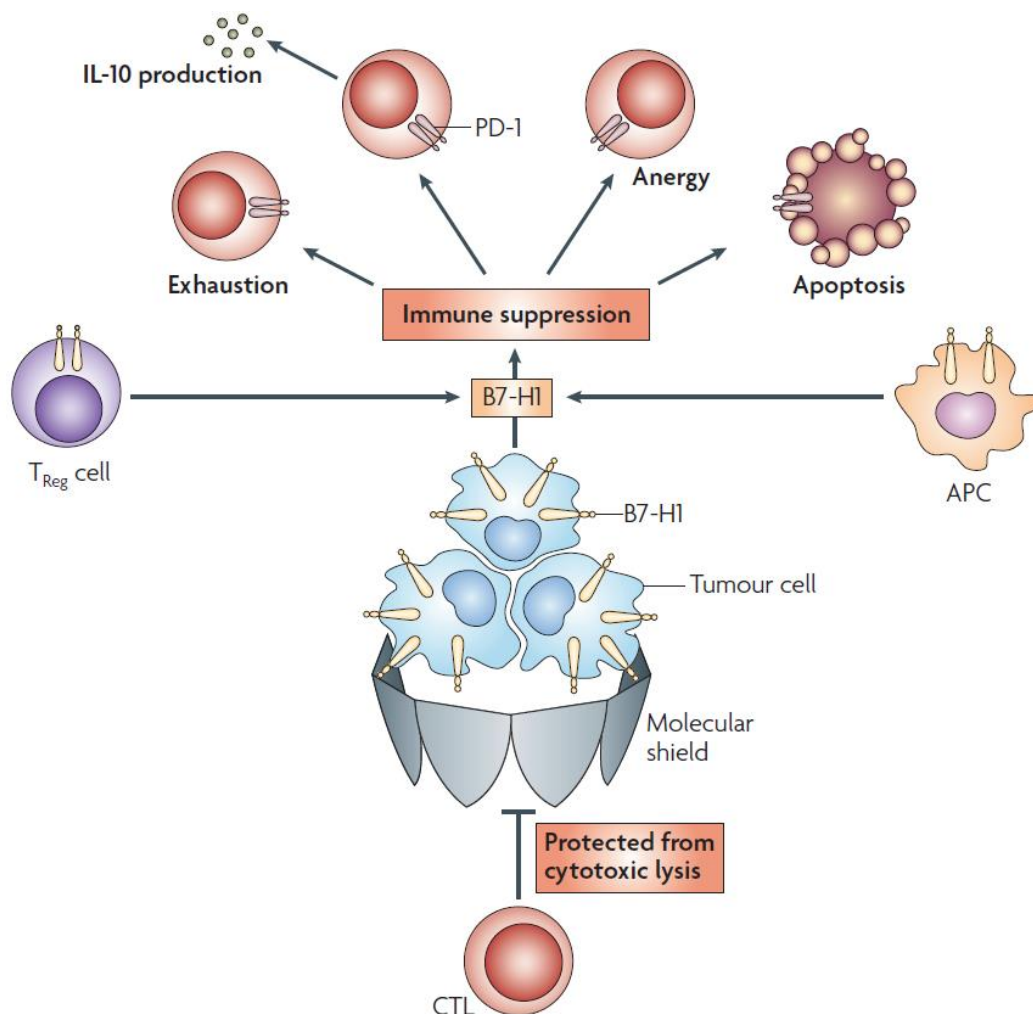


Obrázek 11: Možnosti ovlivnění imunokompetentních buněk, buňkou nádorovou prostřednictvím PD-L.

PD má nejméně 5 interagujících molekul. PD-L1 a PD-L2 byly identifikovány jako jeho ligandy a jejich interakce s PD-1 může indukovat supresi T lymfocytů. PD-L1 také interaguje s B7-1, nacházející se na aktivovaných T lymfocytech, a inhibují aktivitu T lymfocytů. PD-L2 interaguje i s RGMb, čímž aktivuje nejprve T lymfocyty, ale následně indukuje respirační toleranci. Dále může PD-L1 na nádorové buňce fungovat jako receptor a pomocí signálu z PD-1, vyskytující se na T lymfocytech, ochránit buňku před lýzou. Převzato a upraveno [46]

Buňky, které na svém povrchu vystavují PD-L1 ovládají několik mechanismů, aby se vyhnuly T lymfocytům (indukce apoptózy, anergie, vyčerpání T lymfocytů, tvorba molekulárního

štítu proti lýze nádorových buněk, vyčerpání a další) (Obr. 11). Pomocí apoptózy, zprostředkované PD-L1, si hostitel udržuje homeostázu. U lidí může PD-L1 indikovat apoptózu PD-1 na T lymfocytech. U myši je k tomu potřeba B7-H117. Mechanismus vyčerpání byl objeven při studiu chronické infekce. PD-1 se hojně vyskytuje na povrchu funkčně vyčerpaných antigen specifických T lymfocytech. Lze jej také pomocí B7-H1 detekovat v lymfatických orgánech. Blokádou PD-1 nebo B7-H1 lze zachránit buňky před úplným vyčerpáním [47].



Obrázek 12: Inhibiční účinky B7-H1 v nádorové imunitní odpovědi

Nádorové a tumor-asociované antigen prezentující buňky tvoří vysoké hladiny B7-H1. Potenciální supresivní účinky byly řešeny v několika modelech a předpokládá se, že způsob účinků je jejich kombinací. Molekulový štít je popsán jako rezistence nádorových buněk vůči lýze cytotoxickými T lymfocyty (CTL). Převzato a upraveno [47]

4 METODY STANOVENÍ PD-1

Ke stanovení a vysvětlení funkce PD-1 se využívá mnoho metod. V odborných člancích byly použity metody jako je průtoková cytometrie, Western Blott [1], izometrická titrační kalorimetrie [5], mikročipová analýza [19], ELISPOT analýza [48], kvantitativní PCR v reálném čase [24], histopatologie [73] a jiné. V této kapitole si několik z těchto technik popíšeme.

4.1 Průtoková cytometrie

Jak již název napovídá, jedná se o metodu, která využívá měření částic v proudu kapaliny. Na rozdíl od většiny ostatních klinických metod, má průtoková cytometrie široký záběr v možnostech vzorků. Nejedná se jen o buňky z periferní krve, je ta i kostní dřeň, mozkomíšní mok, pleurální mok, mikroorganismy a jiné.

K měření se využívá laserového paprsku. Ten prochází přes úzkou kyvetu, nejčastěji vyrobenou z křemene, která se vyznačuje vysokou optickou kvalitou. Když je buňka ozářena laserem, způsobí rozptyl světelného paprsku. Měří se dva druhy tohoto rozptylu přímý rozptyl (FSC) a boční rozptyl (SSC). FSC zobrazuje velikost procházející buňky. SSC určuje granularitu, či jadernou celistvost.

Předností průtokové cytometrie je schopnost, zkombinovat informace ze světelného rozptylu a fluorescenčním značením. Buňku lze označit pomocí vazby specifických monoklonálních protilátek, značených fluoreskujícím barvivem, na její povrchové antigeny. Jako fluorescenční barvivo se nejčastěji využívá fluorescein isothiokyanát (FITC), fykoerytrin (PE).

Průtoková cytometrie se dále zlepšuje a zpřesňuje, díky vývoji nových monoklonálních protilátek a fluorescenčních barviv [50,51].

Tým Okazaki a spol. při stanovení PD-1 využily PD-1 deficientní myši B lymfocyty. Fragменты myši PD-1 cDNA, které byly sloučeny s myšimi fragmenty FcγRIIB cDNA. Sloučením těchto dvou molekul vytvořili chimérické molekuly, které se sestávaly z extracelulární oblasti FcγRIIB a cytoplazmatické oblasti FcγRIIB, KIR a PD-1 nebo z mutace PD-1. Pro zjištění množství PD-1 se využily PE značené monoklonální protilátky anti FcγRIIB, které interagovaly s extracelulárním FcγRIIB na povrchu B lymfocytů [1].

4.2 Izotermální titrační kalorimetrie

Izotermální titrační kalorimetrie (ITC) spolu s diferenciální skenovací kalorimetrií (DSC) patří k hlavním kalorimetrickým technikám. tyto metody slouží ke studiu mechanismů regulace a řízení biologických struktur a procesů na molekulární úrovni.

ITC je založeno na měření biochemických reakcí nebo molekulárních interakcích při konstantní teplotě, např. interakce mezi enzymem a substrátem. Reakce je spuštěna změnou chemického složení vzorku titrací požadovaného reaktantu. V ITC zjišťujeme energii spojenou s reakcemi nebo procesy, které probíhají za konstantních teplot [52].

V průběhu ITC se měří generované nebo absorbované teplo, které vzniká při vazebné reakci. Nejčastěji se jedná o přidání vazebného partnera (titrant) pomocí titrace k druhému vazebnému partnerovi v průběhu času. Může se jednat o jednu nebo více dávek. Podle toho, jaký se použije přístroj měříme teplo buď jako změnu teploty nebo jako změnu výkonu potřebnou pro udržení teploty mezi vzorkem a referenční buňkou. Vzniklé teplo je při každém vstříknutí vzorku, úměrné množství nově vzniklého komplexu [53].

ITC je rozšířená technika již se aplikovala na řadu systémů. Většinou se jedná o molekulární interakce, jako je protein s proteinem, protein a malý ligand, DNA. Dále se využívá ke zkoumání dalších jevů, jako je např. kinetika enzymů. ITC se rutinně používá ke stanovení funkčnosti a substrátové specifity kanálů a transportérů [54].

V experimentech týmu Chenga a spol. pro vyjádření a purifikaci PD-1 byla využita extracelulární oblast lidského PD-1 (hPD-1). hPD-1 byl upraven přidáním Met na N-konec a mutací Cys na Ser, aby se zvýšila jeho denzita. Tato úprava byla provedena ve formě neoznačeného proteinu v inkluzních tělískách v buňkách *Escherichia coli*. hPD-1 byl poté produkován z buňek *Escherichia coli*, která se pěstovala ve vhodném živném mediu. Při stanoveních se použily i lidské a myší PD-L1 (hPD-L1 a mPD-L1) a PD-L2 (hPD-L2 a mPD-L2). Oba tyto ligandy byly produkovány ve buňkách ovárií čínského křečka. Pro samotné stanovení byly použity hPD-L1 nebo hPD-L2. Následně se jeden z ligandů přidal k roztoku lidského PD-1Fc, který byl obsažen v kalorimetrické komůrce. Stanovení zjišťovalo zahřívací zředění interakce hPD-L1 nebo hPD-L2 s PD-1Fc. To bylo výsledkem přidání hPD-L1 nebo hPD-L2 k PD-1Fc [5].

4.3 Western Blotting

Western blotting nebo také proteinový blotting, či imunoblotting je metoda, která se využívá pro imunodetekci proteinů. Tato metoda se vyvinula z DNA blotování (Southern blotting) a RNA blotování (Northern blotting).

Jedná se o metodu, která umožňuje přenos proteinů z polyakrylamidového gelu dodecylsulfátu sodného (SDS) na absorpční membránu. Takto přenesené proteiny tvoří přesnou repliku gelu. Díky tomuto přenosu se dají stanovovat i jinak zřídka se vyskytující proteiny [55].

Blotování proteinů má několik výhod. Jedná se o snadno proveditelnou techniku, má dobrou citlivost a umožní nám specifickou detekci jednotlivých proteinů. Jak již bylo poznamenáno důležitým prvkem metody je přesná kopie elektroforetického vzoru v gelu. Díky blotování lze kombinovat různé elektroforetické techniky. Navíc proteiny zadržené na membránách nemají detekční problémy jako proteiny v gelu. Na matici nedochází k difúzi, lze eliminovat SDS a renaturovat proteiny. K identifikaci se dají využít monoklonální i polyklonální protilátky a další [56].

Pro stanovení PD-1 inhibičních receptorů metodou Western blott byly využity Jurkat buňky neboli linie lidských nesmrtelných T lymfocytů. Tato buněčná linie produkovala na svém povrchu hPd-1. K samotnému stanovení se použily monoklonální protilátky anti-PD-1, anti-CD28 a další [49].

4.4 Povrchová plazmonová rezonance

Povrchová plazmonová rezonance (SPR) patří mezi optické techniky. Plazmon je kvantum oscilace plasmy. Povrchový plazmon je tedy vlna hustoty povrchového náboje, který se vyskytuje na povrchu kovu [57]. Využívá se pro charakterizaci tenkých vrstev, monitorování procesů kovového rozhraní, senzory pro měření fyzikálních, chemický či biologických veličin, nebo pro analýzu biospecifických interakcí v reálném čase.

Rezonující povrchový plazmon může existovat na rozhraní dvou prostředí s dielektrickými konstantami opačných znamení, pro příklad kov s dielektrikem. Hustotní vlna náboje je spojena s elektromagnetickou vlnou. Její vektory na rozhraní dosahují svého maxima a následně se evanescentně rozpadne do obou prostředí. Tuto povrchovou plazmonovou vlnu lze podpořit u optických vlnových délek vhodnými kovy. Nejčastěji se používá zlato a stříbro [58].

Studie ukazují, že pro nejlepší měření by se měla vlnová délka plazmonů nacházet, mezi excitační vlnu a Ramanovu emisní vlnovou délku. Pomocí snímání vlnových délek lze detekovat řadu chemicky a biologicky významné molekuly [59].

Při tomto experimentu využil tým Chenga a spol. se pro stanovení vazebné afinity lidského a myšního PD-1 k jeho ligandům, myši a lidské PD-L1 a PD-L2, případně kontrolní biotinylovaný protein. PD-1 se poté navázal na imobilizované ligandy. Alternativně se připravil a aktivoval i lidský nebo myši fúzní protein PD-1Fc. Na PD-1Fc se v tomto stanovení vážali přes hPD-L1 nebo hPD-L2. Tímto experimentem se zjišťovala data pro kinetickou analýzu [5].

4.5 Mikročipová analýza

Základy mikročipové analýzy jsou založeny na molekulární biologii. Mikročipy využívají prvky s vysokou hustotou, rovinné skleněné substráty, nízké reakční objemy, vícebarevné fluorescenční značení. K analýze se využívá vysokorychlostní přístrojové vybavení a sofistikovaný software pro analyzovaná data a modelování. Všechny tyto prostředky nám umožňují miniaturní biologické testy, díky kterým lze zkoumat jakýkoliv organismus v genomickém měřítku [60].

Mikročipy se obvykle vyrábí natištěním malých (subnanolitrových nebo nanolitrových) objemů ligandů. Tisk se provádí na povrch proteinů robotickým mikročipem. Ligand je jedním koncem navázán na povrch mikročipu, druhý konec se obvykle váže na stanovovanou látku, která je ve většině případů fluorescenčně značena. Mikročipová technika je mocným nástrojem k vyšetřování interakcí širokých tříd molekul, např. s RNA [61].

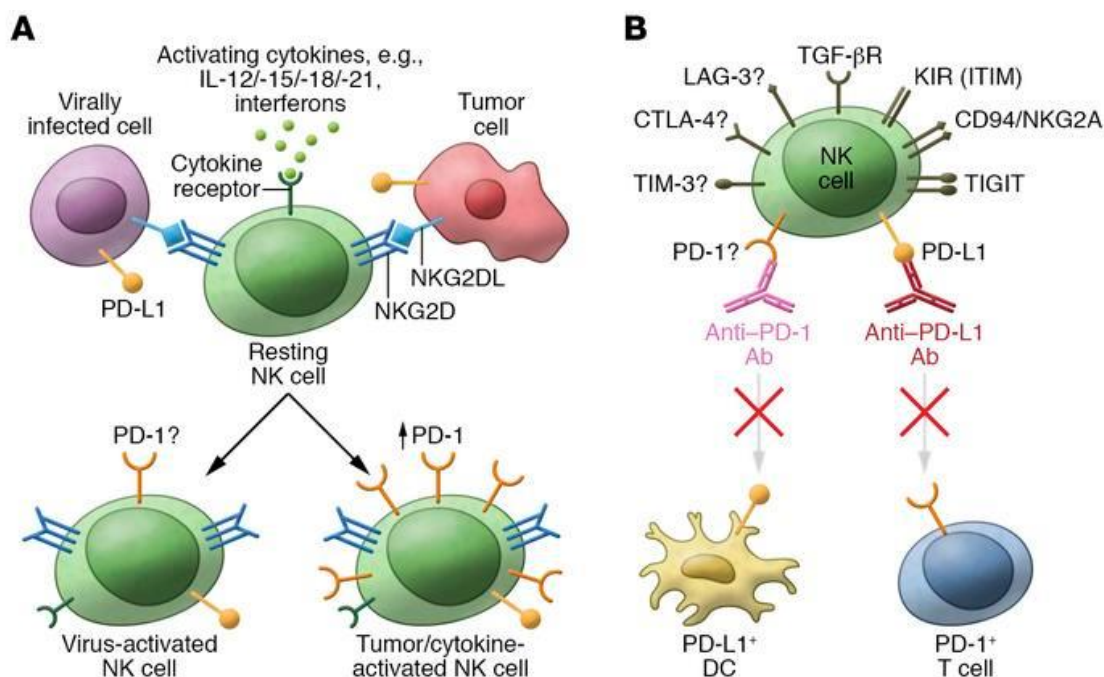
Tým Duraiswamy a spol. pomocí mikročipové analýzy stanovovali profil exprese genu PD-1 na T lymfocytech u dospělých, zdravých lidí. K analýze byla použita lidská krev, z které se izolovaly mononukleární buňky periferní krve. Data genové exprese byla sloučena s RMA, malá RNA, a spojena podle každého typu buňky (PD-1^{hi}, PD-1^{lo}). U každé skupiny byly křížově vyšetřeny její signální geny, aby se získaly jedinečné soubory genů mezi podskupinami PD-1^{hi}, PD-1^{lo} a naivními T lymfocyty [19].

5 KLINICKÉ VYUŽITÍ PD-1

V posledních letech se při léčbě hojně využívá imunoterapie. Imunoterapie je odvětví, ve kterém se učinili obrovské pokroky, jako je identifikování a odstranění nových inhibitorů imunitního kontrolního mechanismu, pro použití v klinických případech. Jedním z nejúspěšnějších pokroků vývoje inhibitorů imunitního kontrolního bodu jako možnost protinádorové léčby, byl přístup při objevování nádorových léků [62]. Napomáhalo i zvyšování znalostí o aktivaci imunitního systému a pokrok v technologiích. Technologický pokrok umožní klinické testování na imunitně stimulujících cytokinech, mezi které patří interferony nebo interleukiny [63]. První případy, kde se tyto léky objevily, bylo při léčbě v první linii, která má více nádorů. Do těchto onemocnění můžeme řadit metastazující melanom, nemalobuněčný karcinom, karcinom ledvinových buněk či rakovinu močového měchýře. Začala se zkoušet i léčba jiných typů rakovin, např. rakovina prsu, hlavy, krku nebo hematologické malignity [64]. První schválený inhibitor pro léčbu, který se postaral o pokrok v léčbě, byl schválen v roce 2011. tímto lékem byl Ipilimumab, což je lidská monoklonální protilátka proti CTLA-4. Jako lék ho schválila americký Úřad pro dohled pro jídlo a drogy (FAD) [65]. V současné době jsou FAD schváleny dva druhy imunoterapie. Jednou z nich je terapie CTLA-4 a druhou je používání PD-1 a jeho ligandů [62].

Jedním z problémů bylo, že samotný imunitní systém vynakládá ohromné úsilí, aby zabránil nadměrné imunitní aktivaci, v obavě před poškozením zdravé tkáně organismu. Tento strach využívá i rakovina, pro své ukrývání před imunitním systémem. Ke svému úniku používá řadu různých mechanismů. Do těchto mechanismů se řadí i protein PD-1.

Jak již bylo zmíněno, PD-1 je inhibítozem TCR pomocí svých dvou ligandů a vyskytuje se v mikroprostředí tumoru. Zvýšená selektivita imunitních potlačujících signálů, vysílaných přímo nádorovou buňkou, spolu s PD-1, jenž reguluje hlavně efektorovou fázi T lymfocytů, naznačuje, že jeho využití v léčbě bude mít vedlejších účinků než protinádorová aktivita inhibičního CLAT-4. PD-1 inhibuje T lymfocyty při chronických onemocněních, kdy je dlouhá expozice antigenu na T lymfocyty [63].



Obrázek 14: Úloha NK buněk při blokádě kontrolního mechanismu

Zánětlivé prostředí v hostitelském organismu ovlivňuje tvorbu PD-1 na NK buňkách. V mikroprostředí se ukazuje jeho zvýšená tvorba. (B) Aktivita Nk buněk je dána řadou aktivačních a inhibičních signálů. Blokování PD-1 pomocí anti- PD-1 zabrání intracelulární signalizaci. Také blokace PD-L1 pomocí anti-PD-L1 zabrání poslání inhibičního signálu k PD-1 na T lymfocytech, nebo na PD-L1 na APC. Převzato a upraveno [69].

Hladina PD-1 při nádorovém onemocnění souvisí s jeho prognózou. Vyšší hladina PD-1 ukazuje na horší prognózu [70].

5.1 Autoimunitní onemocnění

Po skončení autoimunitní reakce, je nutné, aby se imunitní systém vrátil do klidového stavu. Kontrolovat tento proces může pomoci při terapii autoimunitního onemocnění, odmítnutí transplantovaného štěpu, při chronickém onemocnění nebo maligního bujení. Roli v tomto kontrolování má i aktivita T lymfocytů. T lymfocyty útočí na vlastní tkáň, nebo je jejich aktivita nedostatečná. V obou případech je velmi žádaná terapeutická strategie. A jelikož PD-1 má vysokou funkci při regulaci a aktivaci T lymfocytů, stává se terapeuticky žádaným cílem [16].

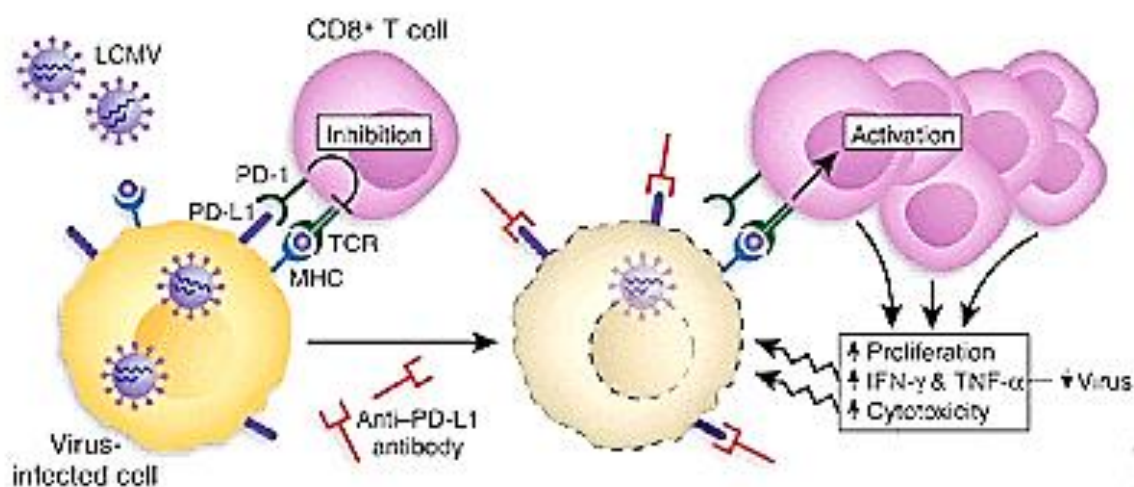
Jak již bylo mnohokrát popsáno, PD-1 má dva ligandy. Tyto ligandy se liší hlavně místem svého výskytu. Tento rozdíl je však také předpokladem myšlenky, že PD-1 působí se zpožděním pro udržení dlouhodobé tolerance. Negativní signály způsobené PD-1 na T lymfocytech kontrolují autoimunitu. Dále se PD-1 zkoumalo v autoimunitních modelech, které

představovaly diabetes, roztroušená skleróza. Při podávání protilátek proti PD-L1 byl u testovaného subjektu zpozorován diabetes [70].

PD-1 má svou úlohu již během těhotenství, kdy se na placentárních syncytiotrofoblastech vyskytuje PD-L1 a na placentárních vaskulárních endotelových buňkách zase PD-L2. Denzita PD-L1 vzrůstá během druhého trimestru, vlivem rostoucí hladiny kyslíku. Při poklesu hladiny kyslíku poklesne i množství PD-L1. Zajišťuje toleranci matky na plod. Podáváním protilátek anti-PD-L1 matkám, vyvolalo potrat (test probíhal u samice myši) [71].

5.2 Infekční onemocnění

Inhibiční vlastnosti PD-1 využívá kromě maligních buněk a autoimunitních onemocnění i chronická bakteriální, nebo virová infekce. Interakce PD-1/PD-L1 patří ke styčným bodům obryny hostitele proti patogenním mikroorganismům (Obr. 15). Podobně jako maligní buňky, i mikroorganismy využívají při chronických infekcích, mechanismus PD-1, aby se skryli před imunitním systémem. PD-1/PD-L1 přispívá přímo k dysfunkci T lymfocytů. Kromě toho však PD-1/PD-L1 omezuje poškození způsobené T lymfocyty [71].



Obrázek 15: Infekční virus a PD-1 v imunitní reakci
Převzato a upraveno [72].

ZÁVĚR

Protein PD-1 má díky svým vlastnostem využití v protinádorové léčbě, autoimunitních i infekčních onemocnění. Nádorové buňky se *in vivo* pomocí PD-1 a vazbou ligandů PD-L1 a PD-L2 dokážou maskovat a chránit před útokem imunokompetentních buněk. Tento mechanismus účinně tlumí aktivitu T lymfocytů.

V experimentálních studiích se stanovuje jeho přítomnost na povrchu nádorových buněk. Pokud je PD-1/PD-L přítomen využívají se protilátky anti-PD-1/anti-PD-L, které zablokují na nádorové buňce příslušný receptor. Nádorová buňka tak není schopna, po rozpoznání imunitním systémem, ovlivňovat aktivitu T lymfocytů.

PD-1 hraje významnou roli i u autoimunitních onemocnění, kdy svojí aktivitou udržuje T lymfocyty v nereaktivitě vůči vlastním buňkám. Pokud PD-1 není na povrchu buněk, či je nějak jinak zablokován, může dojít k autoimunitnímu onemocnění.

Kromě, výše zmíněné pronádorové aktivity, jsou inhibiční mechanismy tohoto proteinu využívány i u chronických infekčních onemocnění. K jejich terapii se nejčastěji používají specifické protilátky proti PD-1 nebo PD-L.

.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] ISHIDA, Y., Y. AGATA, K. SHIBAHARA a T. HONJO. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *The EMBO Journal*. 1992, **11**(11), 3887-3895 [cit. 2019-07-01].
- [2] HUI, E., J. CHEUNG, J. ZHU, et al. T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition. *Science*. 2017, **355**(6332), 1428-1433 [cit. 2019-04-08].
- [3] FOLKL, A. a D. BIENZLE. Structure and function of programmed death (PD) molecules. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2010, **134**(1-2), 33-38 [cit. 2019-04-01].
- [4] TAN, S., H. ZHANG, Y. CHAI, et al. An unexpected N-terminal loop in PD-1 dominates binding by nivolumab. *Nature Communications*. 2017, **8**(1) [cit. 2019-06-30].
- [5] CHENG, X., et al. Structure and interactions of the human programmed cell death 1 receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 2013, 288.17: 11771-11785.
- [6] BARCLAY, A. N. Membrane proteins with immunoglobulin-like domains—a master superfamily of interaction molecules. *Seminars in Immunology*. 2003, **4**(15), 215-223 [cit. 2019-04-08].
- [7] RILEY, J. L. PD-1 signaling in primary T cells. *Immunological Reviews*. 2009, **229**(1), 114-125 [cit. 2019-04-01].
- [8] FRANCISCO, L. M., P. T. SAGE a A. H. SHARPE. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunological Reviews*. 2010, **236**(1), 219-242 [cit. 2019-04-01].
- [9] OKAZAKI, T. a T. HONJO. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *International Immunology*. 2007, **19**(7), 813-824 [cit. 2019-04-12].
- [10] LIANG, S. C., Y. E. LATCHMAN, J. E. BUHLMANN, M. F. TOMCZAK, B. H. HORWITZ, G. J. FREEMAN a A. H. SHARPE. Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. *European Journal of Immunology*. 2003, **33**(10), 2706-2716 [cit. 2019-04-14].
- [11] BUTTE, M., M. KEIR, T. PHAMDUY, A. SHARPE a G. FREEMAN. Programmed Death-1 Ligand 1 Interacts Specifically with the B7-1 Costimulatory Molecule to Inhibit T Cell Responses. *Immunity*. 2007, **1**(27), 111-122 [cit. 2019-04-15].
- [12] LAZAR-MOLNAR, E., Q. YAN, E. CAO, U. RAMAGOPAL, S. G. NATHENSON a S. C. ALMO. Crystal structure of the complex between programmed death-1 (PD-1) and its ligand PD-L2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008, **105**(30), 10483-10488 [cit. 2019-04-24].
- [13] KEIR, M. E., M. J. BUTTE, G. J. FREEMAN a A. H. SHARPE. PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annual Review of Immunology*. 2008, **26**(1), 677-704 [cit. 2019-06-18].
- [14] BARDHAN, K., T. ANAGNOSTOU a V. A. BOUSSIOTIS. The PD1: PD-L1/2 Pathway from Discovery to Clinical Implementation. *Frontiers in Immunology*. 2016, **7** [cit. 2019-04-24].

- [15] LIN, D. Y.-w., Y. TANAKA, M. IWASAKI, et al. The PD-1/PD-L1 complex resembles the antigen-binding Fv domains of antibodies and T cell receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008, **105**(8), 3011-3016 [cit. 2019-04-17].
- [16] FIFE, B. T.; PAUKEN, K. E. The role of the PD-1 pathway in autoimmunity and peripheral tolerance. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2011, 1217.1: 45-59.
- [17] GHIOTTO, M., L. GAUTHIER, N. SERRIARI, S. PASTOR, A. TRUNEH, J. A. NUNES a D. OLIVE. PD-L1 and PD-L2 differ in their molecular mechanisms of interaction with PD-1. *International Immunology*. 2010, **22**(8), 651-660 [cit. 2019-04-24].
- [18] TOPALIAN, S. L., F. S. HODI, J. R. BRAHMER, et al. Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2012, **366**(26), 2443-2454 [cit. 2019-05-09].
- [19] DURAISWAMY, J., Ch. C. IBEGBU, D. MASOPUST, et al. Phenotype, Function, and Gene Expression Profiles of Programmed Death-1 hi CD8 T Cells in Healthy Human Adults. *The Journal of Immunology*. 2011, **186**(7), 4200-4212 [cit. 2019-05-09].
- [20] RIELLA, L. V., et al. Role of the PD-1 Pathway in the Immune Response. *American Journal of Transplantation*. 2012, 12.10: 2575-2587.
- [21] OKAZAKI, T. a T. HONJO. The PD-1–PD-L pathway in immunological tolerance. *Trends in Immunology*. 2006, **27**(4), 195-201 [cit. 2019-04-17].
- [22] CHEMNITZ, J. M., R. V. PARRY, K. E. NICHOLS, C. H. JUNE a J. L. RILEY. SHP-1 and SHP-2 Associate with Immunoreceptor Tyrosine-Based Switch Motif of Programmed Death 1 upon Primary Human T Cell Stimulation, but Only Receptor Ligation Prevents T Cell Activation. *The Journal of Immunology*. 2004, **173**(2), 945-954 [cit. 2019-04-08].
- [23] SHARPE, A. H. a K. E. PAUKEN. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nature Reviews Immunology*. 2018, **18**(3), 153-167 [cit. 2019-07-03].
- [24] PATSOUKIS, N., J. BROWN, V. PETKOVA, F. LIU, L. LI a V. A. BOUSSIOTIS. Selective Effects of PD-1 on Akt and Ras Pathways Regulate Molecular Components of the Cell Cycle and Inhibit T Cell Proliferation. *Science Signaling*. 2012, 5(230), ra46-ra46 [cit. 2019-05-08].
- [25] ZAK, K.M., P.GRUDNIK, K. MAGIERA, A. DÖMLING, G. DUBIN a Tad A. HOLAK. Structural Biology of the Immune Checkpoint Receptor PD-1 and Its Ligands PD-L1/PD-L2. *Structure*. 2017, **25**(8), 1163-1174 [cit. 2019-07-01].
- [26] FREEMAN, G. J. Structures of PD-1 with its ligands: Sideways and dancing cheek to cheek. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008, **105**(30), 10275-10276 [cit. 2019-07-02].
- [27] OKAZAKI, T., A. MAEDA, H. NISHIMURA, T. KUROSAKI a T. HONJO. PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001, **98**(24), 13866-13871 [cit. 2019-04-27].
- [28] ONO, M., H. OKADA, S. BOLLAND, S. YANAGI, T. KUROSAKI a J.V RAVETCH. Deletion of SHIP or SHP-1 Reveals Two Distinct Pathways for Inhibitory Signaling. *Cell*. 1997, **90**(2), 293-301 [cit. 2019-07-03].

- [29] FERENČÍK, M., *Imunitní systém: informace pro každého*. Vyd. 1. české. Praha: Grada, 2005, ISBN 80-247-1196-6.
- [30] BARTŮŇKOVÁ, J., *Imunodeficiency*. Praha: Grada, 2002. Malá monografie (Grada). ISBN 80-247-0244-4.
- [31] ZHU, J. a W. E. PAUL. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Research* 2010, **20**(1), 4-12 [cit. 2019-07-03].
- [32] FULKOVÁ, Z. *Charakteristika a laboratorní vyšetřování cytotoxických T lymfocytů*. Univerzita Pardubice, 2017. Dostupné také z: <http://hdl.handle.net/10195/69377>. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice, Fakulta Chemicko-technologická. Vedoucí práce Marcela Slováková.
- [33] HOŘEJŠÍ, V. a J. BARTŮŇKOVÁ. *Základy imunologie*. 4. vyd. Praha: Triton, 2009. ISBN 978-80-7387-280-9.
- [34] SEIFERT, M a R KÜPPERS. Human memory B cells. *Leukemia*. 2016, **30**(12), 2283-2292 [cit. 2019-07-03].
- [35] LIECHTENSTEIN T, DUFAIT I, BRICOGNE C, LANNA A, PEN J, et al. (2012) PD-L1/PD-1 Co-Stimulation, a Brake for T cell Activation and a T cell Differentiation Signal. *J Clin Cell Immunol*. S12:006.
- [36] REN, Z., H. PENG a Y.-X. FU. PD-1 Shapes B Cells as Evildoers in the Tumor Microenvironment. *Cancer Discovery*. 2016, **6**(5), 477-478 [cit. 2019-07-01].
- [37] WAISMAN, A., D. LUKAS, B. E. CLAUSEN a Nir YOGEV. Dendritic cells as gatekeepers of tolerance. *Seminars in Immunopathology*. 2017, **39**(2), 153-163 [cit. 2019-05-31].
- [38] COLIN, M., V. BIGLEY. Monocyte, Macrophage, and Dendritic Cell Development: the Human Perspective. *Microbiology Spectrum*. 2016, **4**(5) [cit. 2019-05-31].
- [39] TERJUNG, R., ed. *Comprehensive Physiology* Hoboken. NJ, USA: John Wiley, 2011 [cit. 2019-05-31]. ISBN 9780470650714
- [40] SCHWARTZ, Ch., A. R. KHAN, A.FLOUDAS, S. P. SAUNDERS, E. HAMS, H. RODEWALD, A. N.J. MCKENZIE a P. G. FALLON. ILC2s regulate adaptive Th2 cell functions via PD-L1 checkpoint control. *The Journal of Experimental Medicine*. 2017, **214**(9), 2507-2521 [cit. 2019-07-01].
- [41] DEL RIO, M., J. D. SEEBACH, C. FERNÁNDEZ-RENEDO aj. RODRIGUEZ-BARBOSA. ITIM-dependent negative signaling pathways for the control of cell-mediated xenogeneic immune responses. *Xenotransplantation*. 2013, **20**(6), 397-406 [cit. 2019-07-01].
- [42] REYA, T., S. J. MORRISON, M. F. CLARKE a I. L. WEISSMAN. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001, **414**(6859), 105-111 [cit. 2019-06-30].
- [43] SALMANINEJAD, A., V. KHORAMSHAHI, A. AZANI, et al. PD-1 and cancer: molecular mechanisms and polymorphisms. *Immunogenetics*. 2018, **70**(2), 73-86 [cit. 2019-07-03].
- [44] PECORINO, Lauren. *Molecular biology of cancer: mechanisms, targets, and therapeutics*. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press, c2012. ISBN 978-0-19-957717-0.

- [45] ZOU, W., J. D. WOLCHOK a L. CHEN. PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations. *Science Translational Medicine*. 2016, **8**(328), 328rv4-328rv4 [cit. 2019-06-27].
- [46] CHEN, L. a X. HAN. Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present, and future. *Journal of Clinical Investigation*. 2015, **125**(9), 3384-3391 [cit. 2019-06-27].
- [47] ZOU, W. a L. CHEN. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nature Reviews Immunology*. 2008, **8**(6), 467-477 [cit. 2019-06-30].
- [48] GULERIA, I., A. KHOSROSHAHI, M. J. ANSARI, et al. A critical role for the programmed death ligand 1 in fetomaternal tolerance. *The Journal of Experimental Medicine*. 2005, **202**(2), 231-237 [cit. 2019-04-15].
- [49] SHEPPARD, K., L. J. FITZ, J. M. LEE, et al. PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3 ζ signalosome and downstream signaling to PKC θ . *FEBS Letters*. 2004, **574**(1-3), 37-41 [cit. 2019-07-02].
- [50] CHATTOPADHYAY, P. K. a M. ROEDERER. Cytometry: Today's technology and tomorrow's horizons. *Methods*. 2012, **57**(3), 251-258 [cit. 2019-07-03].
- [51] VIRGO, P. F. a G. J. GIBBS. Flow cytometry in clinical pathology. *Annals of Clinical Biochemistry*. 2012, **49**(1), 17-28 [cit. 2019-07-03].
- [52] FREIRE, E.; MAYORGA, O. L.; STRAUME, M..Isothermal titration calorimetry. *Analytical chemistry*. 1990, **62**.18: 950A-959A
- [53] SALIM, N., N. a A. L. FEIG. Isothermal titration calorimetry of RNA. *Methods*. 2009, **47**(3), 198-205 [cit. 2019-07-03].
- [54] BOUDKER, O. a S. OH. Isothermal titration calorimetry of ion-coupled membrane transporters. *Methods*. 2015, **76**, 171-182 [cit. 2019-07-03].
- [55] KURIEN, B a R SCOFIELD. Western blotting. *Methods*. 2006, **38**(4), 283-293 [cit. 2019-07-03].
- [56] BEISIEGEL, U. Protein blotting. *Electrophoresis*. 1986, **7**(1), 1-18 [cit. 2019-07-03].
- [57] LIEDBERG, B., C. NYLANDER a I. LUNSTRÖM. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensors and Actuators*. 1983, **4**, 299-304 [cit. 2019-07-03].
- [58] HOMOLA, J., S. S. YEE a G. GAUGLITZ. Surface plasmon resonance sensors: review. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 1999, **54**(1-2), 3-15 [cit. 2019-07-03].
- [59] WILLETS, K. A. a R. P. VAN DUYN. Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing. *Annual Review of Physical Chemistry*. 2007, **58**(1), 267-297 [cit. 2019-07-03].
- [60] STEARS, R. L., T. MARTINSKY a M. SCHENA. Trends in microarray analysis. *Nature Medicine*. 2003, **9**(1), 140-145 [cit. 2019-07-03].
- [61] ABULWERDI, F. A. aj. S. SCHNEEKLOTH. Microarray-based technologies for the discovery of selective, RNA-binding molecules. *Methods*. 2016, **103**, 188-195 [cit. 2019-07-03].

- [62] ALSAAB, H. O., S. SAU, R. ALZHRANI, K. TATIPARTI, K. BHISE, S. K. KASHAW a A. K. IYER. PD-1 and PD-L1 Checkpoint Signaling Inhibition for Cancer Immunotherapy: Mechanism, Combinations, and Clinical Outcome. *Frontiers in Pharmacology*. 2017, **8** [cit. 2019-07-02].
- [63] RIBAS, A., et al. Tumor immunotherapy directed at PD-1. *N Engl J Med*, 2012, 366.26: 2517-2519.
- [64] HANAHAN, D. a R. A. WEINBERG. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011, **144**(5), 646-674 [cit. 2019-07-02].
- [65] LIPSON, E. J. a C. G. DRAKE. Ipilimumab: An Anti-CTLA-4 Antibody for Metastatic Melanoma. *Clinical Cancer Research*. 2011, **17**(22), 6958-6962 [cit. 2019-07-02].
- [66] TOULMONDE, M., N. PENEL, J. ADAM, et al. Use of PD-1 Targeting, Macrophage Infiltration, and IDO Pathway Activation in Sarcomas. *JAMA Oncology*. 2018, **4**(1) [cit. 2019-07-02].
- [67] MADORE, J., R. E. VILAIN, A. M. MENZIES, et al. PD-L1 expression in melanoma shows marked heterogeneity within and between patients: implications for anti-PD-1/PD-L1 clinical trials. *Pigment Cell & Melanoma Research*. 2015, **28**(3), 245-253 [cit. 2019-07-02].
- [68] CHEN, D. S., B. A. IRVING a F. S. HODI. Molecular Pathways: Next-Generation Immunotherapy--Inhibiting Programmed Death-Ligand 1 and Programmed Death-1. *Clinical Cancer Research*. 2012, **18**(24), 6580-6587 [cit. 2019-04-15].
- [69] DUNAI, C. a W. J. MURPHY. NK cells for PD-1/PD-L1 blockade immunotherapy: pinning down the NK cell. *Journal of Clinical Investigation*. 2018, **128**(10), 4251-4253 [cit. 2019-07-03].
- [70] FIFE, B. T. aj. A. BLUESTONE. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunological Reviews*. 2008, **224**(1), 166-182 [cit. 2019-07-03].
- [71] SHARPE, A. H, E J. WHERRY, R. AHMED a G. J FREEMAN. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nature Immunology*. 2007, **8**(3), 239-245 [cit. 2019-07-03].
- [72] Infectious virus and the Immune mechanism of action. In: *The Arts, Sciences and Medicine*. 2012 [cit. 2019-07-03].
- [73] ANSARI, M. J. I., A. D. SALAMA, T. CHITNIS, et al. The Programmed Death-1 (PD-1) Pathway Regulates Autoimmune Diabetes in Nonobese Diabetic (NOD) Mice. *The Journal of Experimental Medicine*. 2003, **198**(1), 63-69 [cit. 2019-07-03].