

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra veterinárních disciplín**



**Studium funkce T-lymfocytů u prasat s dědičným  
melanomem**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Barbora Šedivá**

**Vedoucí práce: prof. Ing. Mgr. Markéta Sedmíková, Ph.D.**

© 2015 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Studium funkce T-lymfocytů u prasat s dědičným melanomem" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 8. 4. 2015

---

### **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala prof. Ing. Mgr. Markétě Sedmíkové, Ph.D. za to, že se ujala vedení mé práce. Největší poděkování patří MVDr. Jozefu Jandovi, Ph.D., bez kterého by tato práce vůbec nemohla vzniknout. Děkuji mu za jeho trpělivost, smysl pro humor, pozitivní myšlení a veškerý čas, který mi věnoval. Dále bych ráda poděkovala celému liběchovskému kolektivu skvělých lidí, kteří mě mezi sebe přátelsky přijali a celou dobu mi se vším pomáhali. V neposlední řadě děkuji své rodině, příteli a přátelům za to, jak mě podporovali po celou dobu mého studia.

# Studium funkce T-lymfocytů u prasat s dědičným melanomem

## Souhrn

Maligní melanom kůže vzniká neoplastickou proliferací kožních melanocytů. Jedná se o nádor s nejrychleji vzrůstajícím se výskytem na světě. U některých lidských nádorových antigenů byly zjištěny specifické T buněčné odpovědi. Pro studium faktorů zodpovědných za rozvoj nádorů a pro hledání nových, více efektivních terapeutických technik, je velmi důležité využívání zvířecích modelů. Prasečí melanom je v biochemických, imunohistochemických a molekulárně biologických vlastnostech velmi podobný lidským maligním melanomům. Prasata MeLiM (Melanoma bearing Libechov Minipig) mají schopnost spontánní regrese melanomu, jejíž mechanismus není dosud známý. Předběžné výsledky ukazují zvýšené množství proteinů teplotního šoku a následné zvýšení infiltrace tumoru T lymfocyty. U rychle rostoucích nádorů nastává spontánní regrese ve věku tří až čtyř měsíců, u pomalu rostoucích nádorů ve věku pěti až sedmi měsíců.

Byla stanovena hypotéza, že regrese melanocytů je spojena s aktivací T lymfocytů, která se po stimulaci nádorovým antigenem projeví zvýšenou proliferací a produkcí cytokinů. Cílem práce bylo zavést metody pro detekci specifické imunitní odpovědi v periferní krvi u prasat s melanomem a ověřit hypotézu.

Pro vykonané experimenty byla prasatům různého stáří odebrána periferní krev z *vena jugularis*. Pro vyhodnocení exprese cytokinů a měření podílu proliferujících  $CD4^+$  T lymfocytů byla prasata rozdělena do tří skupin: na čtyřtýdenní, devítitýdenní a šestnáctitýdenní. Jako kontroly, byla použita stejně stará zdravá bílá prasata. První zaváděnou metodou bylo intracelulární barvení  $IFN\gamma$ . U této metody jsem si pouze ověřili, že jsme schopni intracelulární  $IFN\gamma$  označit a detekovat ho. Následovalo stanovení exprese vybraných cytokinů, měřených po stimulaci mononukleárních buněk PMA a ionomycinem. Zjistili jsme, že rozdíl mezi čtyř a devítitýdenními prasaty není statisticky významný. U šestnáctitýdenních prasat byl pozorován výrazný pokles relativní exprese většiny cytokinů. Poslední metodou bylo měření proliferační aktivity u  $CD4^+$  T lymfocytů. Po stimulaci mononukleárních buněk lyzátem z melanomu, byly objeveny rozdíly v proliferaci buněk ve

fázi spontánní regrese nádorů. Z výsledků je patrné, že nárůst proliferujících buněk u devítitýdenních prasat koreluje s již nastartovanou imunitní odpovědí proti melanomům. Podobně, jako u měření exprese cytokinů, bylo procento proliferujících buněk u šestnáctitýdenních prasat výrazně sníženo.

Vzhledem k tomu, že u nejstarších prasat došlo k poklesu proliferace a exprese cytokinů, byla hypotéza potvrzena jen částečně. Výsledky by bylo dobré ověřit v dalších experimentech, pro jejichž zopakování se jako nejvhodnější metody jeví barvení intracelulárního IFN $\gamma$  a měření proliferační aktivity CD4<sup>+</sup> T lymfocytů. Zajištění dat o rozvoji imunitní odpovědi v čase, by mohlo pomoci při objasňování mechanismu spontánní regrese u prasat a k dalšímu využití v protinádorové léčbě u lidí.

**Klíčová slova:** T lymfocyt, prase, melanom, regrese melanocytu, cytokiny

# Study of T-lymphocyte function in pigs with hereditary melanoma

## Summary

Malignant skin melanoma is developed by neoplastic proliferation of skin melanocytes. This tumor has the highest raising rate of occurrence in the world. There have been some specific T-cells answers of human tumor antigens detected. The animal models are very important for research of factors responsible for tumor development and searching for new and more effective therapy techniques. The pig melanoma is in biochemical, immunohistochemical and molecular ways very similar to the human one. The MeLiM pigs (Melanoma bearing Libechov Minipig) have the ability of spontaneous melanoma regression. Its mechanism is not known yet. Preliminary outcomes show higher amount of thermal shock protein following by higher T lymphocytes tumor infiltration. The regression comes at age of three to four months in case of fast growing tumor, in case of slowly growing one at age of five to seven months.

There was a hypothesis determined, that regression of melanocytes is connected to T lymphocytes activation that shows higher proliferation and cytokines production after tumor antigen stimulation. The goal of this diploma thesis was to implement methods for detection of specific immune answers in peripheral blood of pigs with melanoma and to verify this hypothesis.

For executed experiments the peripheral blood from *vena jugularis* of pigs of different age was removed. For evaluation of cytokines expression and proliferating CD4<sup>+</sup> T lymphocytes share measurement, the pigs were divided to three groups by the ages: four weeks old, nine weeks old and sixteen weeks old. The same old healthy white pigs were used as check. The first implemented method was intracellular staining by IFN $\gamma$ . With this method, we only confirm that we are able to identify and detect intracellular IFN $\gamma$ . The next step was chosen cytokines expression assessment measured after PMA and ionomycin mononuclear stimulation. The difference between four and nine weeks old pigs is statistically insignificant. The significant decrease of expressed cytokines by sixteen weeks old pigs was observed. The last method was proliferous activity of CD4<sup>+</sup> T lymphocyte measurement. After stimulation of mononuclear cells by melanoma lysate, the differences in cells proliferation in spontaneous tumor regression were discovered. There is evident that increase

of proliferating cells by nine weeks old pigs correlates with already started immune answer against melanomas. The percentage of proliferating cells at the group of sixteen weeks old pigs was distinctly reduced, similarly to cytokines expression measurement.

Due to decrease of proliferation and expression at the group of the oldest pigs, the hypothesis was confirmed only partially. These outcomes are recommended to verify in other experiments. The most appropriate methods for the repetition are intracellular IFN $\gamma$  staining and measuring the proliferation activity of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. The real – time immunologic answer data detection could help with pig's spontaneous regression mechanism clarification and further usage in antitumor treatment.

**Keywords:** T lymphocyte, pig, melanoma, melanoma regression, cytokines

# Obsah

<b>1 Úvod.....</b>	<b>10</b>
<b>2 Vědecká hypotéza a cíle práce .....</b>	<b>11</b>
<b>3 Literární rešerše .....</b>	<b>12</b>
<b>3.1 Lymfocyty .....</b>	<b>12</b>
3.1.1 NK buňky .....	13
3.1.2 B lymfocyty .....	14
3.1.3 T lymfocyty .....	15
<b>3.2 Brzlík a diferenciacie T lymfocytů.....</b>	<b>15</b>
3.2.1 TCR .....	16
3.2.2 Alfa – beta T lymfocyty .....	17
3.2.3 Gama – delta T lymfocyty.....	17
3.2.4 Regulační funkce specifických T lymfocytů.....	18
3.2.5 Cytotoxické reakce .....	18
<b>3.3 Antigeny .....</b>	<b>20</b>
3.3.1 Prezentace antigenu a imunologické funkce MHC .....	20
<b>3.4 Cytokiny .....</b>	<b>22</b>
3.4.1 Základní charakteristika cytokinů .....	23
3.4.2 Klasifikace cytokinů podle funkce .....	24
3.4.3 Receptory pro cytokiny .....	27
<b>3.5 Imunitní systém prasete.....</b>	<b>27</b>
3.5.1 Morfologické a funkční zvláštnosti imunitního systému prasat.....	27
<b>3.6 Protinádorová imunita .....</b>	<b>29</b>
3.6.1 Genetická podstata nádorů .....	29
3.6.2 Nádorové antigeny .....	31
3.6.3 Protinádorová imunitní odpověď .....	32
<b>3.7 Prasata s dědičným melanomem .....</b>	<b>33</b>
3.7.1 Maligní melanom .....	33
3.7.2 Zvířecí modely .....	35
3.7.2.1 MeLiM.....	36
<b>4 Materiály a metody .....</b>	<b>38</b>
<b>4.1 Detekce antigen specifických buněk barvením intracelulárních cytokinů .</b>	<b>38</b>
4.1.1 Získávání periferní krve a izolace PBMC .....	38
4.1.2 Stanovení počtu životaschopných buněk .....	38
4.1.3 Stimulace PBMC a barvení povrchových markerů.....	38
<b>4.2 Stanovení exprese cytokinů pomocí PCR .....</b>	<b>39</b>
4.2.1 Získávání a zpracování periferní krve .....	39



4.2.2	Izolace mononukleárních buněk.....	39
4.2.3	Stimulace a inkubace mononukleárních buněk.....	40
4.2.4	Izolace RNA a prepis do cDNA.....	40
4.2.5	Barvení a program PCR.....	41
<b>4.3</b>	<b>Měření proliferace buněk.....</b>	<b>41</b>
4.3.1	Značení leukocytů CFSE.....	41
4.3.2	Značení CD4 T lymfocytů.....	42
<b>4.4</b>	<b>Statistické hodnocení.....</b>	<b>42</b>
<b>5</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>43</b>
<b>5.1</b>	<b>Detekce antigen specifických buněk barvením intracelulárního IFN<math>\gamma</math>.....</b>	<b>43</b>
<b>5.2</b>	<b>Stanovení exprese cytokinů pomocí PCR.....</b>	<b>44</b>
5.2.1	Rozdělení MeLiM prasat do skupin.....	44
5.2.2	Expresce cytokinů IFN $\gamma$ .....	46
5.2.3	Expresce cytokinů IL – 2.....	47
5.2.4	Expresce cytokinů IL – 4.....	48
5.2.5	Expresce cytokinů IL – 6.....	49
5.2.6	Expresce cytokinů IL – 8.....	50
5.2.7	Expresce cytokinů IL – 10.....	51
5.2.8	Expresce cytokinů TGF $\beta$ .....	52
<b>5.3</b>	<b>Měření proliferace CD4<sup>+</sup> buněk.....</b>	<b>53</b>
5.3.1	Stimulované ConA.....	54
5.3.2	Stimulované lyzátem L1 (melanom v progresi).....	55
5.3.3	Medium.....	56
5.3.4	Stimulované L4 (bílá kůže).....	57
<b>6</b>	<b>Diskuze.....</b>	<b>58</b>
<b>7</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>64</b>
<b>8</b>	<b>Seznam literatury.....</b>	<b>65</b>

# 1 Úvod

Melanom vzniká neoplastickou proliferací melanocytů. Řadí se mezi nejagresivnější tumory s vysokou letalitou. Výskyt kožního melanomu se u člověka každých deset let zdvojnásobí. V současné době připadá v Evropě na 100 000 obyvatel 15 nově hlášených melanomů ročně. Kromě kůže se může vyskytnout i v oku, močovém měchýři, orgánech trávicí soustavy, plicích, vaječníku, srdeční svalovině a žlučníku. Všechny formy melanomu mohou tvořit metastáze zejména v kůži, podkoží a lymfatických uzlinách. Na vznik maligního melanomu mají vliv genetické predispozice, fenotyp a působení rizikových faktorů.

Pro studium faktorů zodpovědných za rozvoj nádorů a pro hledání nových, více efektivních terapeutických technik, je velmi důležité využívání zvířecích modelů. V současné době existuje jen pár druhů vhodných jako experimentální modely pro výzkum melanomu. Mnoho z nich potřebuje pro vznik nádoru působení karcinogenu a UV záření nebo vložení známého onkogenu. Naproti tomu u některých pigmentovaných plemen prasat dochází ke spontánnímu vzniku těchto tumorů. Z těchto prasat proto byla vyšlechtěna nová plemena, u kterých dochází k vysokému výskytu tumorů již před třetím měsícem věku. Takovým plemenem je MeLiM (Melanoma bearing Libechov Minipig). Prasečí melanom je v biochemických, imunohistochemických a molekulárně biologických vlastnostech velmi podobný lidským maligním melanomům.

U 96 % MeLiM prasat je pozorována kompletní spontánní regrese nádorů, doprovázená kožní depigmentací. Mechanismus regrese melanomu není dosud známý. Předběžné výsledky ukazují zvýšené množství proteinů teplotního šoku a následné zvýšení infiltrace tumoru T lymfocyty, z čehož se dá usoudit, že za regresí nádoru stojí buněčná protinádorová imunita. Objasnění mechanismu spontánní regrese melanomů u prasat by mohlo vést k významnému posunu ve výzkumu léčby maligních melanomů u lidí.

## 2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Byla stanovena hypotéza, že regrese melanocytů je spojena s aktivací T lymfocytů, která se po stimulaci nádorovým antigenem projeví zvýšenou proliferací a produkcí cytokinů.

Cílem této diplomové práce je:

- zavést metody pro detekci specifické imunitní odpovědi v periferní krvi u prasat s melanomem: intracelulární barvení IFN $\gamma$ , stanovení exprese cytokinů pomocí PCR, detekce proliferační aktivity CD4<sup>+</sup> lymfocytů barvených CFSE
- ověřit hypotézu prostřednictvím stimulace T lymfocytů nádorovým antigenem a následně měřením jejich proliferace a produkce cytokinů

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Lymfocyty

Lymfocyty jsou základní buňky lymfatické tkáně, lymfy a krve. Jsou to kulaté mononukleární buňky o průměru 7 až 12  $\mu\text{m}$  s velkým jádrem obaleným malým množstvím cytoplazmy, která je většinou bez granul (Rovenský, 2006). Jejich úkolem je specifické rozpoznání antigenu s následnou regulační nebo efektorovou funkcí (Toman a kol., 2009). Na základě funkce, povrchových znaků a ultrastruktury se lymfocyty dělí do tří hlavních skupin: na B lymfocyty, T lymfocyty a NK buňky (Rovenský, 2006). Mimo tyto hlavní skupiny existují ještě lymfocyty účastníci se cytotoxických reakcí závislých na protilátce – ADCC, které zabíjejí buňky obalené protilátkami IgG. Dále buňky LAK (lymphokine activated killers), jež po aktivaci vykazují protinádorovou cytotoxicitu. Nádory takéž infiltruje specifická populace lymfocytů TIL (tumor infiltrated lymphocyte). Tyto tři skupiny jsou aktivovány cytokinem IL – 2 (Toman a kol., 2009).

Lymfocyty, jakožto součást imunitního systému, vznikají ve vzájemné souhře se systémem oběhovým. Jejich kmenové buňky pochází z epiblastů zadní části primitivního proužku. Objevují se nejdříve v oblasti mezi aortou, mezonefros a genitální rýhou, později se přesouvají do jater. Jsou to pluripotentní buňky, ze kterých se diferencují veškeré krevní a imunitní buňky. V játrech embrya dozrávají nejprve erytroblasty, makrofágy, dendritické buňky, megakaryocyty a krevní destičky (Zon, 1995). Dále se objevují prekurzory lymfocytů, NK buňky a granulocyty. Nejpozději se objevují prekurzory buněk specifické imunity, pro – B buňky v játrech a pro – T buňky v brzlíku. Zralé T a B lymfocyty kooperují ve slezině, později v ontogenezi v mízních uzlinách a lymfatických strukturách v systému slizniční imunity (Raulet and Melchers, 2001).

Kostní dřeň je definitivním místem krvetvorby v postnatálním období. Díky adhezivním molekulám VLA – 4 (very late antigen – 4) jsou kmenové buňky navázány na molekuly VCAM (vascular cell adhesion molecule) stromatu kostní dřeně. Zde dozrávají pod vlivem cytokinů SCF (stem cell factor), interleukinů IL – 6 a IL – 12, LIF (leukemia inhibitory factor) a mnoha transkripčních faktorů. Vlivem dalších cytokinů diferencují v jednotlivé linie imunitních buněk (Toman a kol., 2009).

Prekurzorem lymfocytů je lymfoblast, jehož diferenciace je řízena specifickými transkripčními faktory, například GATA – 3, PU.1 a Ikaros. Dalším stádiem je prolymfocyt, který je menší než lymfoblast s centrálním jádrem a dobře patrným centrálním nukleolem.

Zralý lymfocyt je charakteristický velkou funkční variabilitou a plasticitou. Jejich vývoj je uskutečňován v primárních a sekundárních lymfatických orgánech (Penka, Tesařová a kol., 2011).

K primárním lymfatickým orgánům patří brzlík a kostní dřeň. V těchto orgánech buňky vznikají a vyžívají. Mezi sekundární lymfatické orgány jsou řazeny lymfatické uzliny, slezina, lymfoidní tkáň ve sliznicích a mandle. Tyto struktury jsou osídleny zejména zralými lymfocyty, které se zde mohou seskupovat do zón s jedním převládajícím buněčným typem (Jílek, 2014).

Lymfocyty opouštějící primární lymfatické orgány jsou nazývány naivní lymfocyty. Tyto buňky se dosud neseťkaly se specifickým antigenem, tudíž jsou neaktivované a nediferencované (Rovenský, 2006). Po setkání s cílovými antigeny jsou lymfocyty přeměněny na paměťové nebo efektorové buňky v podobě plazmatických či cytotoxických T lymfocytů (Penka a kol., 2011).

V krvi se vyskytují jen asi 2 % lymfocytů, většina se nalézá v lymfatických orgánech a intersticiu. Lymfocyty recirkulují z krve do mízních orgánů nebo do intersticia a lymfou zase zpět do krve (Lüllmann–Rauch, 2012). Neustále cirkuluje méně než 10 % lymfocytů, z nichž má schopnost recirkulovat asi 70 %. Tuto schopnost mají zejména dlouho žijící zralé T lymfocyty, ale také paměťové B lymfocyty. Zbytek zůstává usazený ve tkáních a orgánech (Rovenský, 2006).

### **3.1.1 NK buňky**

NK buňky, neboli přirození zabíječi, jsou součástí nespecifické imunity, jež hraje důležitou roli v obraně hostitele. V periferní krvi tvoří 5 – 10 % z celkového počtu lymfocytů (Bárta a kol., 2008). Jsou to neadherentní lymfocyty diferencující se ze společného prekurzoru s T lymfocyty. V jejich cytoplazmě jsou trvale obsažena cytotoxická granula, a proto jsou buňky také označovány jako velké granulární lymfocyty (Šterzl, 1993). V granulech jsou obsaženy specifické cytotoxické látky – perforiny a granzymy.

Primární funkcí NK buněk je zabíjení infikovaných buněk a produkce cytokinů a chemokinů během brzké fáze patogenní infekce (Assarsson et al., 2004). K dalším funkcím jsou řazeny likvidace nádorových buněk, udržení březosti, regulace krvetvorby a růstu jater. Buněčné funkce jsou regulovány expresí receptorů, které mohou vést k inhibujícím nebo aktivačním signálům. K aktivačním receptorům NK buněk jsou řazeny aktivátory apoptózy (TNFR1, CD95/Fas), adheziny (ICAM – 1, 2, 3 a intergriny), aktivátor proliferace (receptor pro IL – 2) a receptory pro rozpoznávání a lýzu (Toman a kol., 2009). Buňky jsou aktivovány

interleukiny IL – 2 a IL – 12, interferony IFN $\alpha$  a IFN $\beta$ . Samy vytvářejí mnoho cytokinů, např. IFN $\gamma$ , TNF, TGF $\beta$ ; neuroadhezínů CD56, hormonů (prolaktin), neuropeptidů a opioidů, jejichž prostřednictvím komunikují s neurohumorálním systémem (Gerner et al., 2009).

Tyto lymfocyty mají schopnost rozpoznávat buňky s chybějícím MHC I. Při setkání se zdravou buňkou jsou jejich inhibiční receptory navázány na molekuly MHC I, čímž je inhibována lyza zdravé buňky. V případě jakýkoliv změn či chybění molekul MHC I dojde k cytotoxické reakci (Assarsson et al, 2004).

### 3.1.2 B lymfocyty

B lymfocyty tvoří 5 – 15 % cirkulujících lymfocytů. Nejvíce se jich nalézá v kostní dřeni a ve slezině, nejméně v brzlíku. U myši a člověka je kostní dřeň hlavním místem postnatální krvetvorby a zrání B lymfocytů. U řady hospodářských zvířat (králík, přežvýkavci, prase) probíhá zrání v lymfatických tkáních střeva (Toman a kol., 2009).

Jejich hlavní funkcí je produkce protilátek a pozitivní regulace imunitního systému pomocí prezentace antigenu T lymfocytů. Mimo to jsou B lymfocyty schopné produkovat i cytokiny. Na jedné straně mohou pomoci v efektorové fázi imunitní reakce tím, že produkují škálu cytokinů (IFN $\gamma$  a TNF $\alpha$  nebo IL – 4 a IL – 13) v závislosti na prostředí, ve kterém proběhlo první setkání B buněk s příbuzným antigenem. Na stranu druhou mohou přispět k udržení tolerance vůči některým antigenům prostřednictvím imunoregulačních cytokinů IL – 10 a TGF –  $\beta$  (Rosser et al., 2014).

Protilátky jsou produkovány B lymfocyty do krve po rozpoznání antigenu pomocí membránových receptorů BCR (Coico and Sunshine, 2009). Základním membránovým receptorem je IgM. K dalším imunoglobulinům jsou řazeny IgG, IgA, IgE, IgD. Jednotlivé třídy se mezi sebou liší délkou řetězců, strukturou, počtem domén (smyček aminokyselin) a počtem disulfidických můstků mezi lehkými a těžkými řetězci. Těžké polypeptidické řetězce jsou složeny z jedné variabilní a tří či čtyř konstantních domén. Lehké řetězce jsou složeny z jedné variabilní a jedné konstantní domény. Variabilní domény jsou odlišné podle antigenu, proti kterému jsou protilátky produkovány (Bárta a kol., 2008).

V případě setkání B lymfocytu s neproteinovým antigenem dochází k rychlé reakci bez asistence T lymfocytů. B lymfocyty, s receptory k takovému antigenu, jsou aktivovány a následně prolifерují. Vzniklé dceřiné buňky se diferencují na plazmatické buňky produkující rozpustné protilátky. Při setkání s proteinovým antigenem je vyžadováno spolupůsobení T lymfocytů. Prvním kontaktem s antigenem je spuštěna primární imunitní odpověď, při které se z naivních B lymfocytů stanou: a) plazmatické buňky produkující protilátky s vysokou

afinitou k antigenu, b) paměťové B lymfocyty. Dojde-li k opětovnému setkání s příslušným nebo podobným antigenem nastává sekundární imunitní odpověď, která je rychlejší a účinnější (Lüllmann–Rauch, 2012).

### 3.1.3 T lymfocyty

T lymfocyty jsou zásadní regulační a efektorovou složku imunitního systému, neboť kooperací s B lymfocyty a buněčnými složkami nespecifické imunity zajišťují kompletní obranu organismu. T lymfocyty pocházejí z lymfoidní linie vytvořené z pluripotentní kmenové buňky kostní dřeně (Bi et al., 2007). Hlavním místem dozrávání T lymfocytů je brzlík, ze kterého se dále přesouvají do sekundárních lymfatických orgánů – mizních uzlin, sleziny, lymfatické tkáně střev, lymfatické tkáně bronchů a lymfatické tkáně kůže (Bárta a kol., 2008). Podíl T lymfocytů u zdravého zvířete je více než 60 % ze všech lymfocytů. Populace těchto lymfocytů je značně heterogenní a je rozdělována podle různých kritérií do několika subpopulací (Boon et al., 2006).

## 3.2 Brzlík a diferenciací T lymfocytů

Brzlík je lymfoepiteliální orgán uložený za horní částí hrudní kosti, jehož hlavní funkcí je dozrávání T lymfocytů. K jeho další funkci patří produkce faktorů s vlastnostmi hormonů. Tyto faktory ovlivňují dozrávání prekurzorů T lymfocytů, expresi receptorů pro cytokiny a jejich tvorbu, funkce a množení periferních T lymfocytů. K produkovaným faktorům jsou řazeny: IL – 1, IL – 4, IL – 6, tymozin, tymopoetin a tymulin (Nazzal et al., 2014).

Embryonálně vzniká brzlík z entodermálního třetího a čtvrtého hlitanového váčku, ektodermu žaberní štěrby a mezenchymálního pojiva. U většiny obratlovců dosahuje nejtěžší váhy v období pohlavního dospívání, poté se jeho růst zastaví a začne se involuvat a přeměňovat na retrosternální tukovou tkáň (Lavini et al, 2008).

Brzlík je rozdělen na pravý a levý lalok. Každý lalok je dále dělen vazivovými septy do menších lalůčků. Lalůčky jsou tvořeny vnější kůrou (kortexem) a vnitřní dření (medulou). Ve dření se nalézají lymfoidní buňky a Hassalova tělíska. V kůře jsou početně zastoupeny progenitory T lymfocytů – thymocyty. V septech oddělujících jednotlivé lalůčky procházejí krevní a lymfatické cévy a nervy (Toman a kol., 2009).

Nediferencované progenitory T lymfocytů pocházející z kostní dřeně migrují přes krevní oběh do fetálního brzlíku a kolonizují korový epitel jako takzvané pro - thymocyty.

Zde začnou produkovat typické znaky T lymfocytů označených jako CD3/TCR. Nejprve se u nich začnou přeskupovat geny pro TCR $\beta$  a TCR $\delta$ . Poté se na povrchu brzkých thymocytů objeví pre – TCR složený z  $\beta$  řetězce (tzv. TCR $\alpha$ ) a CD3 komplexu. Dále pokračuje přeskupování genů pro TCR $\alpha$  následované vznikem definitivního TCR  $\alpha\beta$  a CD3. V tomto stádiu vývoje mají thymocyty na svém povrchu i koreceptory CD4 a CD8. Poté přichází negativní selekce, při které se eliminují autoreaktivní a nereaktivní buňky. Při pozitivní selekci dochází u buněk s nízkou afinitou k MHC k vpuštění buněk do cirkulace a zachování exprese, buďto CD4 nebo CD8 (Lanzavecchia et al., 1999).

CD molekuly vyjadřují během vývoje lymfocytů jejich dospělost a funkci. Nejméně vyzrálé jsou buňky CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup>, po nich následují CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> (double positive) a vyzrálé CD4<sup>+</sup> nebo CD8<sup>+</sup> (Penka a kol., 2011). Jejich počet je odlišný u různých druhů zvířat. CD molekuly mají tyto funkce: označení funkce buňky, umožnění vzájemného rozeznání buněk, kooperace mezi buňkami, receptory pro cytokiny, receptory pro regulatorní a přenosové proteiny (Bárta a kol., 2008).

U některých autoreaktivních thymocytů však k eliminaci nedojde a vyvíjí se do tzv. regulačních T lymfocytů (Treg), které hrají významnou roli při udržování tolerance k vlastním tkáním (Kässer et al., 2008).

### 3.2.1 TCR

Komplex TCR se skládá z části rozeznávající antigen a ze skupiny několika proteinů – CD3 komplexu, který je důležitý pro přenos signálu. Část komplexu rozeznávající antigen je strukturně podobná imunoglobulinům. Je složena ze dvou transmembránových řetězců  $\alpha$  a  $\beta$  nebo  $\gamma$  a  $\delta$ . Konce těchto řetězců jsou variabilní a váže se na ně antigen. S TCR spolupracují při rozpoznávání antigenu koreceptory CD4 a CD8 (Gerner et al., 2009). CD3 komplex má pět řetězců ( $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  a  $\eta$ ), které tvoří transmembránové proteiny, jež asociují s protein-tyrosin kinázami (Coico and Sunshine, 2009).

T lymfocyty nesoucí TCR  $\alpha\beta$  rozeznávají antigen vyskytující se na povrchu antigen prezentujících buněk. K uplatnění plného aktivačního signálu vedoucího k dělení a diferenciaci lymfocytů je obvykle potřeba působení dalšího receptoru kostimulačního signálu – CD28. Ten je schopen rozeznat na povrchu buněk produkujících antigen kostimulační molekuly CD80 a CD86. TCR  $\gamma\delta$  obecně rozeznávají různé povrchové či rozpustné molekuly (Charentantanakul and Roth, 2007).



### 3.2.2 Alfa – beta T lymfocyty

Tyto lymfocyty jsou u většiny savců více početným typem, ovšem u prasat převládají  $\gamma\delta$ T buňky. Vyvíjejí se pouze v brzlíku. Je možné je rozdělit podle toho, jestli nesou molekuly CD4 nebo CD8 (Mingueneau et al., 2013).

Lymfocyty CD4<sup>+</sup> rozeznávají antigenní peptidy prezentované molekulou MHC II. Většinou se jedná o prekurzory pomocných T buněk (Th), které lze rozdělit podle hlavních cytokinů, jež produkují. Th1 mají v jádře transkripční faktor T – bet a produkují zejména IL – 2 a IFN $\gamma$ . Th2 mají v jádře transkripční faktor GATA – 3 a jejich hlavní produkce cytokinů jsou IL – 4, IL – 5, IL – 6, IL – 10. Th0 klony je produkována směs cytokinů Th1 a Th2. Th3 jsou charakteristické velkou produkcí TGF –  $\beta$ . Významné prozánětlivé vlastnosti má IL – 17 produkovaný buňkami Th17, jež se diferencují z Th0 (Gerner et al., 2008).

Lymfocyty CD8<sup>+</sup> rozpoznávají antigenní peptidy prezentované molekulou MHC I. Jsou to prekurzory cytotoxických buněk (Tc) nebo buňky paměťové. Tyto buňky mají také důležité regulační funkce, neboť produkují velké spektrum cytokinů (Kässer et al., 2008).

Ve variabilních doménách řetězců  $\alpha$  a  $\beta$  se nacházejí nejvíce rozlišná místa tvořená aminokyselinovými zbytky. Tyto hypervariabilní oblasti se nazývají komplementární determinující oblasti (CDR1, CDR2, CDR3). Oblasti CDR1 a CDR2 jsou variabilní na základě zárodečné DNA. Oblast CDR3 získává variabilitu na základě přeskupování genových segmentů při dozrávání lymfocytů v brzlíku (Thorsby, 1999).

### 3.2.3 Gama – delta T lymfocyty

Buňky tohoto typu v sobě spojují vlastnosti přirozené i specifické imunitní odpovědi. V lymfatických orgánech se jich mnoho nenachází, zato tvoří významnou buněčnou složku v kůži, střevní sliznici a v plicích (Giraldi, 2006). Kromě brzlíku se vyvíjejí ve střevním epitelu, pokožce, slezině a ve fetálních játrech.

Tato populace lymfocytů je jednou z prvních obranných bariér těla, která vykazuje cytotoxickou aktivitu. Zároveň je složena z buněk s regulační funkcí, které produkcí cytokinů ovlivňují  $\alpha\beta$  T lymfocyty (Born et al., 2006). Lymfocyty  $\gamma\delta$  jsou schopné rozeznávat antigenní podněty, jež nemají charakter peptidů. Svou skladbou se více podobají imunoglobulinům než  $\alpha\beta$  T lymfocytům (Boismenu et al., 1998). S  $\alpha\beta$  buňkami sdílejí cytotoxickou aktivitu a produkci cytokinů IFN –  $\gamma$ , IL – 2, IL – 4 a TNF –  $\alpha$ . K dalším vlastnostem  $\gamma\delta$  T lymfocytů patří tvorba paměťových buněk (Kabelitz et al., 1999).

S ohledem na expresi jsou tyto lymfocyty většinou CD4<sup>-</sup> a CD8<sup>-</sup>. Malé množství lymfocytů exprimuje CD8<sup>+</sup> a ještě menší množství CD4<sup>+</sup> molekuly (Davis, 2002).

### 3.2.4 Regulační funkce specifických T lymfocytů

Imunitní systém se snaží udržovat imunitní odpověď v rovnováze mezi dvěma extrémy. Prvním extrémem je přehnaně silná imunitní odpověď, při které je zvýšené riziko autoimunitního onemocnění v důsledku nízké kontroly. Druhým extrémem je stav slabé, silně regulované odpovědi, jež není dostatečně silná proti většině patogenů. V regulaci imunitní odpovědi hrají hlavní roli regulační T lymfocyty (Chen et al., 2005).

Bylo prokázáno, že regulační T lymfocyty hrají podstatnou roli v ochraně před vznikem autoimunitních onemocnění a mohou způsobovat značné omezení protinádorové imunitní odpovědi (Kretschmer et al., 2006).

Mezi regulační T lymfocyty jsou řazeny přirozené a indukované CD4<sup>+</sup> regulační T lymfocyty, CD8<sup>+</sup> regulační T lymfocyty, dvojité negativní regulační T lymfocyty a  $\gamma\delta$  T lymfocyty (Vieira et al., 2004).

Pro správnou funkci a vývoj regulačních T lymfocytů je nezbytný FoxP3 transkripční faktor. Není ovšem jejich jediným regulátorem, a proto se při identifikaci regulačních T lymfocytů využívá ještě marker CD25, což je koreceptor pro interleukin 2 (Hill et al., 2007).

Jsou známy čtyři základní mechanismy potlačení imunitní odpovědi: potlačení pomocí cytokinů, potlačení zprostředkované cytolýzou, metabolickým rozvratem a pomocí modulace dendritických buněk. Potlačení pomocí cytokinů zahrnuje především produkci IL – 10, IL – 35 a TGF –  $\beta$ . TGF –  $\beta$  zaujímá významné místo v protinádorové imunitě, neboť nepřímo zprostředkovává její omezení indukcí regulačních T lymfocytů (Rubtsov et al., 2008). Potlačení metabolickým rozvratem vedou k potlačení funkce efektorových T lymfocytů (de la Rosa et al., 2004).

### 3.2.5 Cytotoxické reakce

Cytotoxické T lymfocyty (Tc) CD8<sup>+</sup> jsou spolu s NK buňkami zodpovědné za eliminaci buněk infikovaných viry nebo jinými intracelulárními parazity a buněk jinak abnormálních (poškozených stresem, nádorových). Eliminace probíhá buďto přímým kontaktem Tc s napadenou buňkou nebo prostřednictvím sekretovaných produktů. Cytotoxické T lymfocyty

rozeznávají antigenní struktury prezentované na molekulách MHC I. třídy (Lanzavecchia et al., 1999).

Zahájení imunitní odpovědi nastává v sekundárních lymfatických orgánech po rozeznání komplexu MHC I. třídy s navázaným antigenním peptidem na antigen prezentujících buňkách (APC) prekurzorem Tc. Zároveň musí být přítomny patřičné adhezivní molekuly a kostimulační molekuly – CD80, CD86 a ligandy receptoru CD28. APC jsou daným virem buďto infikovány, nebo pohlty antigeny, jež pocházejí z odumřelých infikovaných, stresovaných nebo nádorových buněk (Watts and DeBenedette, 1999). Prekurzor Tc začne proliferovat a diferencovat na klony zralých efektorových cytotoxických buněk. Tomuto procesu napomáhají cytokiny IL – 2 produkované buňkami Th1. Další funkcí těchto buněk je stimulace dendritických buněk kontaktem, čímž je dendritická buňka schopna stimulovat dělení a diferenciaci antigenně specifických klonů Tc. Při této aktivaci dendritických buněk mají zásadní úlohu adhezivní a signalizační molekuly – CD40L (na povrchu aktivovaného Th lymfocytu) a CD40 (na povrchu dendritické buňky). Tyto molekuly stimulují expresi kostimulačních povrchových buněk CD80 a CD86, a sekreci cytokinů IL – 1 a IL – 12 (Farrar et al., 2002).

Efektorové Tc jsou dále roznášeny krevním oběhem na místa působení. Zralé Tc již k aktivaci cytotoxických mechanismů nepotřebují kostimulační signál, stačí jim pouze jeden signál přes TCR. Mohou teda eliminovat různé typy infikovaných buněk (van Leeuwen and Samelson, 1999).

Cytotoxická aktivita Tc je zajišťována exocytární dráhou. První možností je nastartování apoptózy působením perforinů a granzymů. Perforiny vyloučené Tc do úzké štěrby mezi navázanými buňkami naruší cytoplazmatickou membránu označené buňky. Takto narušenou membránou proniknou granzymy, které v cytoplazmě štěpí prekurzory proteáz – kaspáz, čímž je aktivuje a postupně dochází k apoptóze. Druhým mechanismem je také apoptotické působení na cílovou buňku. Na povrchu Tc se nalézá protein Fas – ligand (FasL), který se váže na receptor Fas (CD95) přítomný na povrchu mnoha buněk. Navázáním je spuštěna kaskáda reakcí vedoucí k apoptóze buňky. Receptor Fas je součástí i cytotoxických T lymfocytů, což je důležitý mechanismus brzdící aktivitu Tc a časově omezující cytotoxické imunitní reakce. Třetím způsobem je produkce cytotoxických cytokinů – lymfotoxinu a TNF –  $\beta$ , které mají podobné působení jako FasL (Romagnani et al., 2000).

### 3.3 Antigeny

Antigenem je každá látka, která je schopná navázat se na protilátku. Antigeny jsou přirozené makromolekuly proteinů, polysacharidů a nukleových kyselin. Imunogenní jsou takové antigeny, jež jsou schopné vyvolat imunitní odpověď organismu. Rozpoznávání antigenů pomocí T a B lymfocytů má mnoho společného i rozdílného. T lymfocyty jsou schopny rozpoznávat pouze lineární peptidové fragmenty antigenů, jež vznikly degradací kompletních struktur v antigen prezentujících buňkách. Tento první aktivační signál musí být doplněn dalšími kostimulačními a přídatnými signály mezi antigen prezentující buňkou a antigen specifickým T lymfocylem. Oproti tomu B lymfocyty rozeznávají antigeny v jejich nativní konformační podobě. K aktivaci B lymfocytů je zapotřebí dalších pomocných signálů zprostředkovaných T lymfocytárním systémem (Abbas and Janeway, 2000).

Hapteny jsou malé antigenní molekuly vyvolávající imunitní odpověď pouze, pokud jsou navázány na větší nosič (Medzhitov and Janeway, 2002). Obecně lze říci, že antigeny s nižší hmotností než je 5 kDa jsou špatné imunogeny, stejně jako polymery tvořené jedinou aminokyselinou nebo cukrem. Mitogeny jsou antigeny se schopností aktivovat velkou část B nebo T lymfocytů, způsobují takzvanou polyklonální aktivaci. K nejsilnějším mitogenům jsou řazeny superantigeny mikrobiálního původu, které se váží na variabilní doménu TCR a na MHC molekulu mimo vazebné místo, čímž aktivují velkou část lymfocytů (Toman a kol., 2009).

#### 3.3.1 Prezentace antigenu a imunologické funkce MHC

Prezentace antigenu specifickému receptoru T lymfocytů (TCR) je základní funkcí hlavního histokompatibilního komplexu (MHC). TCR rozeznává pouze antigeny navázané na polymorfni molekuly MHC nebo na nepolymorfni molekuly CD1, které se vyskytují na membráně buněk prezentujících antigen. Molekula CD1 má společného předchůdce s molekulami MHC, ke kterým má funkčně i strukturně velmi blízko. Vyskytuje se na dendritických buňkách, makrofázích a B lymfocytech, na kterých prezentuje hydrofobní peptidy, glykolipidy a lipidy. Tato molekula je zastoupena jako neklonální u všech jedinců v populaci savců, zatímco MHC jsou zastoupeny jen určitými alelami (Yin et al., 2012).

Molekuly MHC nesou ve své struktuře vazebná místa, na něž se váží antigenní peptidy z endogenních nebo exogenních cizorodých částic. Všechny jaderné buňky jsou po zpracování ve specializovaných cytosolových organelách (proteazomech) schopné prezentovat endogenní cizorodé částice vazbou na MHC I. třídy. Takto navázaný antigen je

rozpoznán subpopulací cytotoxických CD8<sup>+</sup> T lymfocytů. Oproti tomu schopnost zpracovat exogenní cizorodé částice má jen omezené spektrum buněk, zvané antigen prezentující buňky. Tyto buňky nejprve proteolyticky degradují cizorodé částice v endosomálních buněčných organelách na antigenní peptidové fragmenty. Tyto fragmenty jsou posléze prezentovány molekulami MHC II. třídy, jež jsou rozpoznány subpopulací pomocných CD4<sup>+</sup> T lymfocytů (Van Laethem et al., 2007).

Díky vysokému polymorfismu nese na svém povrchu každý jedinec unikátní sestavu molekul MHC. Tato pestrost v populaci volně se křížících jedinců zajišťuje, že alespoň část populace vyvine dostatečnou imunitní odpověď na jakýkoliv antigenní podnět. Složení konkrétních molekul MHC u jednotlivců poté podmiňuje individuální imunologickou reaktivitu. Všichni jednotlivci, kromě homozygotních dvojčat, vykazují odlišnosti (Garcia, 2012).

Jakožto produkt určité alely je molekula MHC schopná vázat jeden z mnoha tisíců peptidových fragmentů. Peptidy se liší ve své primární struktuře, ale mají stejný motiv dvou nebo tří aminokyselinových zbytků, které přesně zapadají do kotvících kapes, tvořených aminokyselinovými zbytky na molekule MHC. V případě, že v organismu není přítomna žádná infekce, jsou vlastní bílkoviny endogenně rozkládány, navázány na MHC a prezentovány na povrchu buňky. V průměru je na buňce prezentováno 100 totožných vlastních antigenních fragmentů. Pokud je buňka infikována nebo pohltna cizorodou částicí, jsou vlastní antigenní fragmenty nahrazeny antigenními fragmenty cizorodého nosiče, čímž může dojít k imunitní odpovědi (Adams et al., 2011).

Relativně konzervované úseky TCR – CDR1 a CDR2 reagují s méně polymorfními úseky  $\alpha$  helixů molekuly MHC, kde zajišťují orientaci a konfiguraci kontaktu. Velmi variabilní kontakty úseku CDR3 a peptidového antigenního fragmentu určují specifitu interakce (Rudolph et al., 2006).

V případě, že se uvnitř buňky nenaváže na molekulu MHC žádný antigenní peptid, tak je molekula rychle rozložena, aniž by byla transportována na povrch. Pro rozvoj T buněčné odpovědi je zapotřebí dostatečně dlouhá prezentace komplexu molekul MHC s navázanými antigeny a sestavení multifunkčních signálních komplexů, které zajišťují etážovitou imunitní reaktivitu. Ta zajistí, aby imunitní systém reagoval jen na podněty, vyžadující imunitní odpověď (Cresswell and Lanzavecchia, 2001).

### MHC I. třídy

Molekula MHC I. třídy je transmembránový glykoprotein, sestávající z membránově vázaného řetězce  $\alpha$ , který je nekovalentně vázán s řetězcem  $\beta$ . Řetězec  $\beta$  není zakotven v cytoplazmatické membráně a svým složením je shodný pro všechny molekuly MHC. Strukturou je podobný molekulám imunoglobulinů a je mezi ně i řazen. Vazebné místo pro antigenní struktury je po stranách uzavřeno a vyžaduje tudíž přesnou velikost fragmentů (8-11 aminokyselin). Molekuly MHC I. třídy jsou vyjádřeny v různém počtu na povrchu jaderných buněk. Nejvíce, řádově stovky tisíc molekul, se jich nachází na buňkách imunitního systému. Vyjádření molekul podléhá změně vlivem cytokinů. Indukčně působí zejména  $\text{INF}\gamma$  a  $\text{INF}\alpha$  (Feng et al., 2007).

### MHC II. třídy

Molekula MHC II. třídy je taktéž řazena do imunoglobulinové rodiny. Je složena z řetězců transmembránových glykoproteinů  $\alpha$  a  $\beta$ . Vazebné místo antigenních fragmentů je otevřené a mohou se na něj vázat delší struktury. Molekuly MHC II. třídy se nejvíce nacházejí na dendritických buňkách, B lymfocytech a na buňkách monocyto – makrofágového původu. Tyto buňky jsou typické pro prezentaci antigenů T lymfocytům. Za určitých okolností, po aktivaci cytokiny, mohou schopnost prezentovat antigeny získat i jiné buněčné typy, například epitelové buňky (Deng et al., 2012).

## **3.4 Cytokiny**

Cytokiny jsou základní regulátory imunitního systému, zajišťující komunikaci mezi buňkami a mezi imunitním systémem a dalšími tělními soustavami. Jsou to proteiny sekretované mnoha buňkami imunitního systému – neutrofilů, monocytů, makrofágů, B a T lymfocytů, které působí prostřednictvím specifických receptorů (Dinarello, 2007). Tyto proteiny se nacházejí jak u obratlovců, tak i u bezobratlých (Beschinn et al., 2001). Cytokiny mají významnou roli už v průběhu embryogeneze, kde se podílejí při procesech histogeneze a organogeneze.

Cytokinová signální síť udržuje tělní homeostázu pomocí synergistických a antagonistických interakcí. Většina cytokinů je ve svých účincích pleiotropní – jeden cytokin má více fyziologických účinků. Dále působí v kaskádě – jeden cytokin indukuje tvorbu druhého, a významná je také cytokinová redundantnost – rozdílné cytokiny mohou mít stejné nebo podobné účinky (Hill and Sarvetnick, 2002). Působení většiny cytokinů je

autokrinní (působí na buňku, která ho produkuje). Další možností je parakrinní působení (na buňky v těsné blízkosti) a spíše výjimečně působí cytokiny endokrinně (sytémově). Obecně je možné říci, že produkce cytokinů stoupá krátce po buněčné aktivaci. Díky vysoké biologické aktivitě je jejich homeostatická koncentrace v tělních tekutinách velmi nízká. Účinkují již při koncentracích v pg/ml (Schenk et al., 2001). U zdravého jedince není koncentrace detekovatelná nebo je nižší než 1 pg/ml. Proto je detekce zvýšení jejich koncentrace ukazatelem spojeným se zánětem nebo rozvojem onemocnění (Dinarello, 2000). Cytokiny jsou tedy využívány jako biomarkery napomáhající k pochopení a předvídání rozvoje onemocnění a k sledování účinků léčby (Bienvenu et al., 2000).

### **3.4.1 Základní charakteristika cytokinů**

Většinou jsou cytokiny syntetizovány ve formě prekurzorů, které mají na svém N konci hydrofobní aminokyselinové sekvence – signální peptidy, jež jsou nezbytné pro přestup přes membránu. Cytokin se stává biologicky aktivním po odštěpení signálního peptidu z prekurzoru. Hmotnost většiny cytokinů se pohybuje v rozmezí 15 – 25 kDa.

Funkčně představují pro buňku dodatečné aktivační signály podílející se na buněčné aktivaci, regulují cyklus buňky až k mitóze. Působením cytokinů prodělávají buňky značné membránové změny, zejména zvýšení exprese receptorů pro cytokiny a regulaci míry exprese kostimulačních a akcesorních molekul. Dále cytokiny působí na změny v cytoskeletu, jež jsou spojeny s důležitými efektorovými funkcemi buněk. Prostřednictvím některých cytokinů mohou v buňce nastat procesy vedoucí k apoptóze. Značnou měrou regulují zánětlivé reakce, proliferaci a diferenciaci buněk imunitního systému v krvetvorných orgánech (Lefkowitz and Lefkowitz, 2001).

Vazbou na přirozené inhibitory a solubilní formy receptorů pro cytokiny jsou biologické účinky cytokinů neutralizovány. Nejdůležitějším regulačním mechanismem koncentrace cytokinů je jejich schopnost vázat se na různé makromolekuly vyjádřené na povrchu buňky a na mezibuněčných molekulách (Schmitz et al., 2011).

V průběhu imunitní odpovědi jsou cytokiny uvolňovány z lokálních rezervoárů působením enzymů. Například účinkem matrixových metaloproteináz a příbuzných proteináz označovaných jako ADAM, jsou cytokiny uvolňovány z molekul mezibuněčné hmoty. Tyto proteinázy mohou některé cytokiny také degradovat, případně štěpit jejich receptory. Další skupina proteolytických enzymů – elastázy, uvolňují navázané cytokiny z molekul mezibuněčné hmoty a zároveň některé cytokiny a jejich receptory degradují. Díky

enzymatickému rozkladu molekul mezibuněčné hmoty je umožněn vstup buněk imunitního systému do tkání (Stetler – Stevenson, 1999).

### 3.4.2 Klasifikace cytokinů podle funkce

#### Cytokiny regulující hematopoézu

Do této skupiny jsou řazeny strukturně i funkčně heterogenní cytokiny působící na různém stupni vývoje krevních elementů. Některé mají pouze selektivní působení na určitou část krvetvorby, jiné se naopak vyznačují širokými účinky. V časných stupních krvetvorby, nejspíše již na kmenovou krvetvornou buňku, působí SCF (Stem Cell Factor). Tento faktor stimuluje proliferaci kmenových buněk a jejich uvolnění do periferní krve (Rieger and Schroeder, 2012). Rozmanité účinky má IL – 3, produkovaný zejména NK buňkami a T lymfocyty. Tento cytokin zasahuje do vyžívání všech krvetvorných linií, proto bývá označován jako pluripotentní kolonie stimulující faktor. Kolonie stimulující faktory (CSF) ovlivňují vyžívání především myeloidních buněk a mají účinek i na pluripotentní kmenové buňky. Tyto cytokiny se rozlišují na G – CSF, stimulující proliferaci a diferenciaci granulocytů, GM – CSF, stimulující diferenciaci granulocytů a monocytů – makrofágových buněk, M – CSF, jež spouští produkci monocytů – makrofágových buněk (Lee et al., 2009).

#### Interferony

Interferony jsou důležitou součástí specifické i přirozené imunity. Dělí se podle struktury a funkce na interferony I. typu – IFN $\alpha$  a IFN $\beta$  a interferon II. typu – IFN $\gamma$ . Interferony I. typu jsou po stimulaci (zejména virovou infekcí) produkovány jadernými buňkami těla. Ve zdravé buňce zajišťují takzvanou non – permisivitu vůči virovým agens, při které buňka rozkládá virové nukleové kyseliny a zasahuje do translace virových proteinů. K dalším funkcím patří obecný antiproliferativní účinek a imunomodulační potenciál (Hare and Mossman, 2013).

IFN $\gamma$  je produkován omezeným spektrem buněk. Jedná se zejména o pomocné T lymfocyty – Th1 po antigenní stimulaci a NK buňky. IFN $\gamma$  projevuje důležité protinádorové a imunomodulační účinky. Na antigen prezentujících buňkách zvyšuje expresi MHC II. třídy. Dále má významné postavení v obraně proti mikrobům s převažujícím intracelulárním parazitismem. Je to induktor zánětu, aktivátor makrofágů, žírných buněk a fibroblastů (Bruin et al., 2013).



### Cytokiny regulující T a B lymfocyty

Do této skupiny je možné zařadit mnoho heterogenních cytokinů. Jedním z nich je IL – 2, který je po antigenní stimulaci produkován  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  T lymfocyty a NK buňkami (Yui et al., 2004). Působí autokrinně na T lymfocyty  $CD4^+$ . Dále je důležitým aktivačním podnětem subpopulace tlumivých cytotoxických T lymfocytů a NK buněk přes aktivaci transkripčního faktoru STAT5 (Sim and Radvanyi, 2014). IL – 2 je také druhým signálem aktivujícím a diferencujícím B lymfocyty.

$CD4^+$  T lymfocyty se dělí na tři podjednotky podle funkčních odlišností a spektrem produkováných cytokinů. Odlišné podjednotky dozrávají, v závislosti na řadě proměnných faktorů, ze společného prekurzoru Th0. Pro podjednotku Th1 je typická produkce  $INF\gamma$  a  $TNF\alpha$ . Podjednotka Th2 je charakteristická produkcí cytokinů IL – 4, IL – 5 a IL – 13. Th1 a Th2 jsou v antagonistickém postavení určovaným prostřednictvím cytokinů (Yagi et al., 2002). IL – 4 je velmi dobře popsán regulátor proliferace a je to cytokin, který ovlivňuje výběr produkce imunoglobulinové třídy v B lymfocytech (Ito et al., 2009).

IL – 10 je po antigenní stimulaci produkován podjednotkami Th3, které produkují i  $TGF\beta$ . Působí hlavně proti Th1 podjednotce a obecně jsou jimi produkovány protizánětlivé cytokiny (Mocellin et al., 2003).

### Pluripotentní prozánětlivé cytokiny

Do této skupiny je řazen především IL – 1, produkován zejména aktivovanými monocyty – makrofágovými buňkami. Tento cytokin reguluje expresi asi 90 funkčně významných genů. Je významným spojením mezi imunitní a endokrinní soustavou, je to aktivační faktor T lymfocytů a podílí se na obranné zánětlivé reakci (Santarasci et al., 2013).

IL – 6 je produkován zejména T a B lymfocyty, ale mohou ho produkovat i ostatní jaderné buňky. Funguje jako regulátor proliferace a diferenciaci B lymfocytů a syntézy protilátek. Zajišťuje také aktivaci T lymfocytů, diferenciaci a regulaci fenotypu Th2. Prostřednictvím tohoto cytokinu dochází v hepatocytech ke zvýšené tvorbě bílkovin akutní fáze (Kishimoto, 2010).

### Skupina tumor nekrotizujících faktorů

Tyto cytokiny jsou po aktivaci různými podněty produkovány zejména monocyty-makrofágovými buňkami. Jedním z nejvýznamnějších podnětů je navázání lipopolysacharidu na krevní bílkovinu LBP (Lipopolysacharide Binding Protein). Po interakci tohoto komplexu s makrofágem dochází k uvolnění prozánětlivých cytokinů a  $TNF\alpha$ .  $TNF\alpha$  je zásadní v časně

fázi vzniku zánětu a je považován za jednoho z nejvýznamnějších cytokinů přirozené imunity (MacEwan, 2002). Zvyšuje prokoagulační aktivitu endotelových buněk, stimuluje produkci normálních buněk a bílkovin akutní fáze. Vyvolává cytolytickou nebo cytostatickou aktivitu proti nádorovým buňkám, působí proti virům (Gupta, 2002). TNF $\beta$  je produkován B a T lymfocyty a má podobné účinky jako TNF $\alpha$  (Turner et al., 2014).

### Transformující růstové faktory

Rodina transformujícího růstového faktoru beta (TGF $\beta$ ) je tvořena fylogeneticky starými cytokiny, které se vyskytují u všech obratlovců v různých isoformách. Jsou to růstové a diferenciační faktory podílející se na morfologických procesech, histogenezi a organogenezi (Massagué et al., 2000). TGF $\beta$  reguluje adhezi buněk, expresi tkáňových metaloproteináz a tkáňových inhibitorů proteolytických enzymů. Podílejí se na regulaci obnovy poškozených tkání. Uplatňuje se v indukci a pozdější inhibici zánětu a v inhibici proliferační aktivity T a B lymfocytů. Protizánětlivé cytokiny TGF $\beta$  a IL – 10 jsou produkovány pomocnými T lymfocyty, které se vyčleňují do podjednotky Tr. Tato podjednotka účinně tlumí nežádoucí aktivitu Th1 (Eickelberg, 2001). Dysfunkce v signalizaci TGF $\beta$  hrají hlavní roli u různých druhů rakoviny, například melanomu (Hsu et al., 2005).

Součástí rodiny TGF $\beta$  jsou i biologicky aktivní molekuly – aktiviny a inhibiny. Tyto molekuly jsou produkovány různými buňkami a regulují procesy embryogeneze a funkce reprodukčních orgánů (Barakat et al., 2012).

### Chemokiny

Chemokiny jsou malé cytokiny s hmotností do 10 kDa, jejichž základní funkcí je regulace usměrněného pohybu buněčných populací. Dalšími funkcemi jsou prozánětlivé účinky, produkce mezibuněčného tmelu, angiogeneze a proliferace hemopoetických prekurzorů. Chemokiny jsou produkovány všemi jadernými buňkami. Díky tomu, může být prostřednictvím chemokinů stimulována imunitní odpověď. Indukce chemokinů může být vyvolána exogenně, například působením mikrobiálního povrchu, nebo endogenně působením cytokinů, vznikajících v průběhu zánětu (Moser et al., 2004).

Podle polohy terminálních cysteinů, lze chemokiny rozdělit do čtyř skupin: C – X – C, C – C, C a C – X<sub>3</sub> – C. Do skupiny C – X – C patří chemokiny regulující migraci neutrofilních granulocytů, T a B lymfocytů (Nomyiama et al., 2013). Jedním ze zástupců této skupiny je IL – 8. IL – 8 je chemoatraktant a aktivátor granulocytů, zesiluje jejich metabolické vzplanutí a degranulaci (Das et al., 2010).

### **3.4.3 Receptory pro cytokiny**

Cytokiny se vážou na specifické receptory membrány buňky, které jsou přesně regulované. Existují také rozpustné receptory sloužící pouze k přenosu cytokinového signálu. Cytokiny jsou na své specifické receptory vázány s vysokou afinitou. Exprese receptorů se řádově zvyšuje po aktivaci buňky. Podle strukturních podobností jsou receptory pro cytokiny děleny do pěti základních rodin (Ihle and Kerr, 1995).

Vazby cytokinu na povrchový receptor je spojena s konformační změnou receptorové molekuly. Toto se projeví v intracelulární části receptoru a zahájí se tím přenos signálu do buňky. Většina receptorů je nekovalentně asociována s cytoplazmatickými protein kinázami, po jejichž aktivaci jsou spuštěny signalizační kaskády. Tyto kinázy se označují jako Janusovy kinázy (JAK). Aktivované JAK fosforylují receptorové podjednotky na tyrozinových zbytcích, čímž umožní vazby dalších cytoplazmatických signálních molekul označených jako STAT. Fosforylované molekuly STAT spolu vytváří homo nebo heterodimery a za pomoci transportních bílkovin přechází do jádra, kde se navazují na regulační sekvence genů. Tady fungují jako sekvenčně specifické aktivátory přepisu genů (Villarino et al., 2015).

Receptory pro chemokiny jsou proteiny označované jako serpentinné molekuly, které sedmkrát pronikají cytoplazmatickou membránou. Receptory chemokinů jsou asociovány s trimerními G – proteiny (Murphy et al., 2000).

## **3.5 Imunitní systém prasete**

V posledních letech značně vzrostl zájem o výzkum prasečího imunitního systému. Prase je důležitý model pro výzkum transplantací a jiných fyziologických pochodů. Morfologie prasečí kůže je srovnatelná s lidskou, proto se využívá pro studium perfuze kůže a hojení ran, absorpce kožně podávaných léků atd. Pro využití prasat v experimentech je nutná znalost a pochopení jejich imunologie (Rothkötter, 2009).

### **3.5.1 Morfologické a funkční zvláštnosti imunitního systému prasat**

Slezina má dvě hlavní funkce: kontrolu buněčné funkce erytrocytů v červené pulpě a indukci imunitní odpovědi proti systémovým infekcím v bílé pulpě. Je to významný lymfopoetický orgán u selat a místo velké recirkulace lymfocytů (Reihner and Brismar, 1995).

Mízní uzliny mají převrácenou strukturu. Kůra je uložena centrálně, parakortex a dřev na periferii. Tkáň postrádá větší medulární oblasti a je složena spíše z kortexu a parakortexu. Migrace lymfocytů do uzlin probíhá přes aferentní lymfu proudící kolem trámce do centrálního kortexu a poté přes parakortex do dřevě. Lymfocyty opouštějí uzliny přes endotel kapilár. Dřev nemá žádné provazce ani sinusy, obsahuje hodně makrofágů a omezuje pohyb lymfocytů (Binns and Pabst, 1994).

Lymfatická tkáň ve střevě je přítomna buďto jako samostatné lymfatické folikuly nebo jako skupina lymfatických folikulů – Peyerových plaků. Kontinuální Peyerův plak v koncové části tenkého střeva obsahuje asi desetkrát víc B lymfocytů než T lymfocytů, dosahuje až jednoho metru délky a involuje okolo jednoho roku stáří prasete (Barman et al., 1997).

Ve střevní sliznici se také nachází mnoho odlišností. Kromě organizovaných lymfatických struktur mají prasata ve střevě ještě dvě populace lymfocytů, důležité pro slizniční imunitní odpověď: lymfocyty lamina propria a intraepiteliální (Blumberg and Neurath, 2006).

Intraepiteliální lymfocyty migrují do střevního epitelu po narození a ve věku dvou měsíců je jejich počet srovnatelný s dospělým prasetem. Ve střevě se nacházejí zejména  $CD3^+CD8^+$  lymfocyty. Počet  $\gamma/\delta$  T lymfocytů je ve střevní sliznici nízký, přestože v periferní krvi se nachází v mnohem větším množství (Rothkötter et al., 1999). Na rozdíl od ostatních druhů nemají enterocyty prasete MHC II molekuly. Tyto molekuly se naopak objevují po aktivaci T buněk, eozinofilů a endotelu (Toman a kol., 2009).

Lymfocyty v lamina propria jsou důležitou součástí slizniční imunity, kde vykonávají zejména efektorovou funkci k udržení střevní bariéry. Po narození neobsahuje hluboká vrstva lamina propria žádné T a B lymfocyty, až ve věku kolem jednoho týdne do ní začnou vstupovat  $CD4^+$  T buňky. U dospělých prasat převažují pod epitelem  $CD8^+$  T lymfocyty a uprostřed lamina propria klků  $CD4^+$  T buňky. B lymfocyty se nacházejí kolem střevních krypt a ve folikulech (Solano – Aguilar et al., 2000). Střevní stěna obsahuje většinu plazmatických buněk produkujících IgA, proto je střevo hlavním zdrojem IgA, ze kterého jsou protilátky uvolňovány do krevní plazmy (Vaerman et al., 1997).

Lymfocyty prasete se odlišují v expresi některých znaků a v procentuálním zastoupení v krvi. Periferní krev mladých prasat obsahuje vyšší počet  $\gamma/\delta$  T lymfocytů, které tvoří většinu  $CD4^+CD8^-$  T lymfocytů v krvi. Kolem jednoho roku věku se poměr  $\gamma/\delta$  a  $\alpha/\beta$  T lymfocytů obrací a převažují  $\alpha/\beta$  T buňky (Yang and Parkhouse, 1996). T lymfocyty  $\alpha/\beta$  se dělí na čtyři subpopulace. Jednou z nich jsou i  $CD4^+CD8^+$  buňky, které u prasat fungují jako paměťové buňky. Tato populace se jinak vyskytuje pouze u myši a lidí s fyziologickými poruchami

(Sinkora et al., 2002). B lymfocyty s membránovým IgM mohou produkovat CD2 znaky, které jsou u většiny savců znakem T lymfocytů. NK buňky neexprimují znaky CD3 a CD4, vyjadřují CD2 a slabě CD8 (Gerner et al., 2009).

Hlavní histokompatibilní komplex prasat (SLA) je lokalizovaný na sedmém chromozomu a zahrnuje velký počet různých genů. Rozpětí umístění genů pro SLA I., II. a III. třídy je nejmenší mezi všemi savci, kteří byli dosud zkoumáni (Piriou – Guzilack and Salmon, 2008). Ze sedmi až deseti genů I. třídy (sedmi z klasické a třemi z neklasické) jsou sérologicky prokazovány tři polymorfní lokusy: SLA – A, B, C, jejichž struktura a distribuce je podobná lidským MHC. Oblast II. třídy je velmi komplexní. Exprimuje antigen prezentující molekuly SLA – DR, – DQ, – DM, – DO. Jejich struktura je shodná s MHC molekulami jiných druhů. Fylogenetické analýzy prokázaly, že sekvenční homologie s lidským MHC je mnohem vyšší než s jinými druhy. Proto byly SLA II. třídy pojmenovány po jejich lidských protějšcích. Úsek genů pro SLA III. třídy obsahuje mnoho důležitých genů pro mechanismy imunitní obrany, jako jsou TNF nebo komplementové molekuly (Lunney et al., 2009).

### **3.6 Protinádorová imunita**

K nádorové transformaci buňky může dojít různými způsoby v důsledku selhání mnoha různých mechanismů regulace buněčného dělení a regulace sociálního chování buněk. Takové poruchy jsou obvykle vyvolány mutací v genech, které kontrolují buněčnou proliferaci a diferenciaci. U takto postižené buňky může docházet k nekontrolovatelnému dělení, úniku z běžného tkáňového umístění, usazení do jiných tkání a růstu v nich (Koebel et al., 2007). Zmutovaná buňka potom produkuje proteiny, které mohou být za určitých okolností rozeznány imunitním systémem. Většinou jsou odlišnosti od normálních buněk příliš malé na to, aby je imunitní systém rozeznal, nebo nádorové buňky používají mechanismy umožňující paralyzovat některé účinky imunitního systému (Smyth et al., 2006).

#### **3.6.1 Genetická podstata nádorů**

Proliferace a diferenciaci buňky je regulována několikastupňovými mechanismy obsahujícími intracelulární i extracelulární kontroly. V průběhu buněčného cyklu se uskutečňuje kontrola integrity genomu. Buněčný cyklus i procesy v něm probíhající jsou geneticky kontrolovány. Mutace v genech řídících procesy replikace DNA a její distribuce do dceřiných buněk mají fatální následky. Naproti tomu mutace v genech řídících buněčnou proliferaci, jsou slučitelné se životem a vedou k nekontrolovatelné proliferaci. Nejvýraznější

dopad mají mutace postihující G1 kontrolní bod buněčného cyklu. Tyto buňky jsou zcela bez kontroly a zůstávají aktivní v buněčném cyklu. Nemohou tedy řádně terminálně diferencovat a funkčně vyžrát (Sherr, 2000).

Vznik nádorů je chápán jako proces vedoucí k akumulaci genetických poruch v buňce, který je aktivován buněčnými protoonkogeny a inaktivován antionkogeny. Genomické poškození může být způsobeno buďto poškozením biopolymeru DNA, anebo chybami odehrávajícími se v enzymatickém aparátu, který zpracovává genetickou informaci v buňkách. DNA může být poškozena vlivem různých faktorů exogenní i endogenní povahy. K endogenním příčinám jsou řazeny vrozené genetické poruchy, látky vznikající v průběhu normálního buněčného metabolismu – hlavně kyslíkové radikály, chyby v průběhu replikace. Mezi exogenní příčiny patří ionizující záření, UV světlo, působení různých chemických sloučenin a infekční procesy (Bartkova et al., 2005).

Vzhledem k velké rozmanitosti poškození DNA neexistuje univerzální reparační mechanismus, jenž by zajistil integritu genomu. V průběhu evoluce se vytvořilo mnoho reparačních mechanismů, které jsou vysoce konzervované (Krejsek a Kopecký, 2004).

### Onkogeny

V genomu normální buňky se vyskytují protoonkogeny kódující bílkoviny, jež se podílejí na přenosu růstových a diferenciacních signálů z buněčného povrchu do cytoplazmy a jádra. Dojde-li k abnormální aktivaci protoontogenu, nastane zvýšená exprese nebo hyperaktivita proteinu, jež se podílí na vzniku nádorové buňky. Takto zmutovaná forma se nazývá onkogen (Collado and Serrano, 2010). Existuje několik mechanismů, jejichž působením mohou být protoonkogeny změněny. Jedním z mechanismů je inserce retrovirů, které mohou způsobit odchýlné vyjádření protoontogenů. Dalšími mechanismy jsou bodová mutace, genová amplifikace a translokace do transkripčně aktivního místa, jejímž důsledkem mohou být zkrácené či fúzované geny. Změnou protoontogenů kódujících růstové faktory, dochází k jejich intenzivní proliferaci a tím i k větší pravděpodobnosti genetické chyby. U různých nádorů je nejčastěji zjištěná zvýšená exprese těchto růstových faktorů: protoonkogen c-sis kódující  $\beta$  řetězec cytokinu PDGF $\beta$  a cytokin EGF (Chial, 2008).

Na nádorové přeměně buňky se rovněž podílejí abnormální receptory pro růstové faktory, jež jsou produktem protoonkogenů. Dalším častým znakem nádorových buněk jsou změny genů kódujících molekuly, které podmiňují buněčnou diferenciaci a vývoj (Thomas et al., 2007).

## Antionkogeny

První podmínkou onkogeneze je genetická porucha protoontogenů. Druhou podmínkou je porucha tumor – supresorových genů neboli antionkogenu. Antionkogenní produkty jsou bílkoviny, podílející se na kontrole buněčného růstu a diferenciaci buňky. V nádorových buňkách tyto geny indukují apoptózu a/nebo zastavení buněčného cyklu (Opalka et al., 2002). Hlavním představitelem je gen p53, který je zodpovědný za detekci poškození DNA a následně za zahájení oprav nebo indukci apoptózy. Abnormální gen p53 se vyskytuje u více než poloviny lidských nádorů. Protein p53 zasahuje do biochemických drah mnoho genových skupin, které regulují růst a diferenciaci buněk. Tento protein negativně reguluje přechod z G<sub>1</sub> do S fáze buněčného cyklu (Brooks and Gu, 2011). Na zvířecích modelech bylo pozorováno, že po vnesení genu p53 do genetické informace nastala regrese a inhibice růstu nádorů (Dolivet et al., 2002).

### **3.6.2 Nádorové antigeny**

Přítomností nádorových buněk v těle dochází k indukci komplexní imunitní odpovědi. Tato odpověď však nemusí být ochranná, ať z důvodu slabé imunogenности nádorových antigenů nebo důsledkem abnormálních regulací imunitní odpovědi. V současné době je identifikováno mnoho nádorových antigenů, které je možné rozlišit do dvou základních skupin: antigeny specifické pro nádory a antigeny asociované s nádory (Adam et al., 2003).

Antigeny specifické pro nádory byly u lidí rozděleny do tří typů: antigeny kódované geny v nádorových buňkách a nevyjádřenými v normálních buňkách (kromě varlat a placenty), diferenciační antigeny melanocytů a melanomových buněk a antigeny specifické pro individuální nádory, pravděpodobně vzniklé mutací ubikvitárně vyjádřených genů (Jager et al., 2001). U nádorových buněk se vyskytují změny v expresi obou tříd MHC. U nádorových buněk je typická velmi snížená exprese MHC I. třídy. Naopak u genů pro MHC II. třídy je pozorováno navození jejich syntézy u buněk, které byly původně MHC II. třídy negativní (Selliger et al., 2002).

Antigeny asociované s nádory nejsou přímo specifické pro nádorové buňky, ale nacházejí se i u některých zdravých buněk. Od normálních buněk se mohou lišit v kvantitě či době exprese nebo expresí na abnormálním místě. Stanovení jejich tkáňovým nebo buněčným vyjádřením v periferní krvi jsou využívána jako pomocné diagnostické markery. Nádorové markery jsou produkovány buďto přímo nádorovými buňkami, nebo jsou syntetizovány normálními buňkami, na které působí nádorové buňky. Nádorové markery se mohou nacházet na povrchu nádorových buněk, případně to mohou být cytoplazmatické či

jaderné struktury uvnitř nádorové buňky. Přítomnost a množství nádorových markerů v tělních tekutinách umožňují odhadnout rozsah nádorového procesu (Grijalva et al., 2015). K nejznámějším antigenům asociovaných s nádory patří: onkofetální antigeny, které jsou přítomné v normálních embryonálních buňkách, v postnatálním období zmizí a opět se objeví v případě některých nádorových onemocnění; melanomové antigeny – MAGE – 1a Melan – A jsou silně exprimovány na melanomových buňkách (Ogata et al., 2010); antigen HER2/neu je receptor růstového faktoru epiteliálních buněk, silně exprimovaný na některých nádorech mléčné žlázy (Mironova et al., 2014); EpCAM je adhezivní molekula epiteliálních buněk, která se vyskytuje ve velkém množství na nádorových metastázích (Sun et al., 2014).

### **3.6.3 Protinádorová imunitní odpověď**

Většina spontánně vzniklých nádorů je antigenní, ale jen malé množství je imunogenní. Standardně fungující imunitní systém může růst nádoru zpomalit nebo zastavit, anebo ho může podpořit. Imunitní reakce proti nádorové buňce může vzniknout v případě, že dendritické buňky aktivované v nefyziologickém prostředí prezentují nádorový antigen T lymfocytům. Po rozpoznání nádorových buněk imunitním systémem se na jejich potlačení mohou podílet všechny hlavní imunitní mechanismy – antigenně specifické i nespecifické (Dranoff, 2003).

Nádorové buňky mají na svém povrchu abnormálně sestavené mozaiky molekul, které se nenacházejí v normálních buňkách. Tyto mozaiky jsou identifikovány receptory buněk přirozené imunity a rozpustnými složkami přirozené imunity. Identifikace vede k aktivaci buněk přirozené imunity, které poté mohou prezentovat nádorové antigeny T lymfocytům. Následkem vyšší spotřeby kyslíku a horšímu cévnímu zásobení nádorových buněk dojde k hypoxii (Schmaltz et al., 1998). Hypoxie pak spolu s působením TNF -  $\beta$  vede v nádorové tkáni k nekrotickým procesům. Během nekrózy je pomocí vystavení imunitního systému biologicky aktivním látkám stimulována zánětová reakce (Chu, 2013). Aktivované buňky přirozené imunity, zejména makrofágy a dendritické buňky, zpracovávají a prezentují nádorové antigeny. T lymfocyty jsou schopné se aktivovat a klonálně expandovat pouze v případě, že rozpoznají antigenní fragmenty v optimálním prostředí zajištěném přirozenou imunitou (Castellino et al., 2006). V průběhu migrace dendritických buněk do sekundárních lymfatických orgánů, dochází ke zpracování nádorových antigenů. Zralé dendritické buňky vytvářejí v lymfatických uzlinách shluky s T lymfocyty. V přítomnosti prozánětlivých cytokinů TNF $\alpha$  a GM – CSF, dochází ke zvýšení exprese molekul CD40 na dendritických buňkách. Interakcí mezi molekulami CD40 a CD154, přítomné na T lymfocytech, dochází



k produkci IL – 12 dendritickými buňkami. Tento cytokin stimuluje vyzrání Th0 do podjednotky Th1, která je zodpovědná za cytotoxickou buněčnou reaktivitu v obranné reakci proti nádorovým buňkám (Heath and Carbone, 2009).

Důležitou součástí protinádorové imunity jsou NK buňky. Ty rozpoznávají nádorové buňky prostřednictvím molekulově rozmanitých membránových receptorů (Deaudeau et al., 2015). Pomocí těchto receptorů jsou vysílány cytotoxickým buňkám aktivační nebo inhibiční signály. Při spuštění aktivačních signálů nastává spuštění lytických mechanismů, vedoucích k usmrcení nádorových buněk. V případě převládnutí inhibičních signálů, unikají nádorové buňky cytotoxické aktivitě. Nejvýznamnějším kritériem je absence MHC I. třídy, při které je spuštěna cytotoxická aktivita NK buněk (Lanier, 2005).

Další významnou součástí protinádorové imunity je působení interferonů. Nádorové buňky a jejich produkty stimulují buňky imunitního systému i další jaderné elementy k tvorbě interferonů. Interferony působí na množící se nádorové buňky antiproliferativně a cytotoxicky, a formují protinádorovou imunitu. Cytostatické působení je založeno na jejich schopnosti indukovat rozklad RNA a interferovat s proteosyntézou (Robb and Hill, 2012). Převládající imunomodulační účinky se nacházejí u IFN $\gamma$ . Jeho prostřednictvím dochází na povrchu nádorových buněk k zesílení exprese molekul MHC I. třídy. Tím dojde k větší vnímavosti vůči nádorově specifickým CD8<sup>+</sup> T lymfocytům a k účinnějšímu zpracování a prezentaci nádorových antigenů. IFN $\gamma$  zvyšuje aktivitu monocyto-makrofágových buněk, což vede k tvorbě prozánětlivých cytokinů. Jeho působením dochází ke zvýšenému dozrání dendritických buněk, čímž se stávají nejučinnější antigen – prezentující buňkou (Frasca et al., 2008).

CD8<sup>+</sup> T lymfocyty mohou likvidovat nádorové buňky lyticky za pomoci perforinů a granzymů, anebo prostřednictvím FasL proteinu. Tento protein se váže na receptor Fas (CD95), přítomný na různých buňkách, čímž aktivuje buněčnou apoptózu (Yang et al., 2014).

## **3.7 Prasata s dědičným melanomem**

### **3.7.1 Maligní melanom**

Maligní melanom může vzniká neoplastickou proliferací kožních melanocytů. Jedná se o nádor s nejrychleji vzrůstajícím se výskytem na světě. Každých deset let se počet onemocnění zdvojnásobí (Vincent – Naulleau et al., 2004). V současné době připadá v Evropě na 100 000 obyvatel 15 nově hlášených melanomů ročně (Fikrle a Pizinger, 2010). Kromě kůže se může vyskytnout i v oku, močovém měchýři, orgánech trávicí soustavy, plicích,

vaječníku, srdeční svalovině a žlučníku. Všechny formy melanomu mohou tvořit metastáze zejména v kůži, podkoží a lymfatických uzlinách. Při další progresy nádorů jsou metastáze rozesety nejčastěji do jater, plic, mozku a kostí (Povýšil a kol., 2007).

Melanom, v porovnání s jinými nádory, se nevyznačuje lokálním destruktivním růstem, ale nebezpečím časného hematogenního či lymfogenního metastázování. Průměrný věk pacienta s melanomem při stanovení první diagnózy je 56 let, obě pohlaví jsou postižena téměř stejně, ale s rozdílnou anatomickou distribucí (Fikrle a Pizinger, 2010). Na vznik maligního melanomu mají vliv genetické predispozice, fenotyp a působení rizikových faktorů. Asi 10 % melanomů se vyskytuje u rodin s genetickou zátěží pro toto onemocnění (Geffrotin et al., 2004).

Důležitou roli hrají mutace jednotlivých chromozomů. U 50 % případů maligního melanomu je detekována delece na chromozomu 9 v oblasti 9p21, což je místo kódující důležité regulační proteiny buněčného cyklu. K dalším častým genetickým příčinám patří mutace BRAF a NRAS, které vedou k podpoře životaschopnosti a dělení zmutovaných buněk. Časté jsou také mutace tumor-supresorového genu p53 (Curtin et al., 2005).

Faktory podílející se na vzniku maligního melanomu jsou: atypické névy (kožní útvary vzniklé nahromaděním melanocytů); imunosuprese; fototyp kůže; UV záření – zejména UVB záření, které v kůži indukuje imunosupresivní účinek, vznik volných kyslíkových radikálů a poškození DNA melanocytů (Štork a kol., 2008).

První fází melanomu je melanom in situ – nádorové melanocyty se nacházejí jen v epidermis. Další fází je horizontálně-radiální růst, kdy atypické melanocyty pronikají do dalších vrstev epidermis a horizontálně do vzdálenějších epidermálních oblastí. Třetí fází je vertikální růst, kdy melanomové buňky pronikají do šikry a dále se v ní množí. Klinicky se rozlišují čtyři typy maligního melanomu - lentigo maligna melanom, povrchově se šířící melanom, akrolentiginózní melanom a nodulární melanom (Fikrle a Pizinger, 2010).

U některých lidských nádorových antigenů byly zjištěny specifické T buněčné odpovědi. U melanomových antigenů NY – ESO – 1, MelanA/MART – 1, SSX4, MELOE – 1 a TRAG – 3 byly detekovány CD4<sup>+</sup> Th1 lymfocyty (Bioley et al., 2006). Th2 buňky specifické pro MAGE – 3, CAMEL a MAGE – 6 byly objeveny u melanomů v pokročilejším stádiu (Tatsumi et al., 2002). Treg buňky specifické pro širokou škálu nádorových antigenů byly nalezeny u melanomových metastáz (Vence et al., 2007). CD8<sup>+</sup> T lymfocyty se vyskytují ve velké míře u melanocytů s antigeny MelanA/MART – 1 (Zippelius et al., 2004), gp100/Pmel 17, MAGE – 1, gp75/TRP – 1 a tyrozináza (Jäger et al., 2001).

### 3.7.2 Zvířecí modely

Pro studium faktorů zodpovědných za rozvoj nádorů a pro hledání nových, více efektivních terapeutických technik je velmi důležité využívání zvířecích modelů. V současné době neexistuje mnoho druhů vhodných jako experimentální modely pro výzkum melanomu. Mnoho z nich potřebuje pro vznik nádoru působení karcinogenu a UV záření nebo vložení známého onkogenu. Kříženci středoamerické sladkovodní ryby rodu *Xiphophorus* jsou stejně náchylní ke spontánnímu i karcinogeny indukovanému vzniku melanomu. Tento model je cenný při výzkumu genetických a environmentálních příčin vzniku melanomu. Nicméně odlišný původ prekurzorových melanomových buněk, nízký výskyt tumoru, biologické a histologické rozdíly oproti lidskému melanomu a nedostatek vyšetřovaného biologického materiálu limitují využití tohoto modelu (Vincent – Naulleau et al., 2004). U hlodavců jsou, kromě některých kmenů křečka syrského, spontánně vzniklé melanomy vzácné. Vznik melanomu může být indukován samotnými karcinogeny (morče, pískomil, křeček syrský, krysa) nebo v kombinaci s dalším činidlem, jako je UV záření. Byly vyšlechtěny geneticky modifikované myši, které nesou geneticky zabudované léze homologní s lidskými. Tyto myši by mohly být užitečné při studiu molekulárních mechanismů hrajících roli u predispozic k melanomu, role některých genů při progresi melanomu a působení rizikových faktorů životního prostředí (Bardeesy et al., 2000). Avšak původ prekurzorových buněk melanomu u myši se liší od člověka, jehož melanomové prekurzory pocházejí z bazální vrstvy pokožky nikoliv ze škáry (Vincent – Naulleau et al., 2004). Ze stejného důvodu je limitováno využití jihoamerické vačice (*Monodelphis*), která je jediným geneticky nemodifikovaným savcem náchylným k melanomu pouhým působením UV záření (Bardeesy et al., 2000). Kožní melanom se rovněž vyskytuje u domácích zvířat. Je poměrně běžný u psů, koní a některých plemen prasat. U psů a koní se melanom obvykle vyskytuje až v pozdějším věku a má odlišnou patologickou charakteristiku od lidské (Fleury et al., 2000; Roels et al., 1999). U prasat byly vrozeně přítomné novotvary pozorovány zejména u dvou pigmentovaných plemen – duroc a hampshire, ovšem s nízkým výskytem. Proto byla vyšlechtěna nová plemena, u kterých dochází k vysokému výskytu melanomů již před třetím měsícem věku. Mezi takto vyšlechtěná plemena patří: hormel, sinclair, mnichovské miniaturní prase a melanom nesoucí Liběchovská prasata (Müller et al., 2001).

### 3.7.2.1 MeLiM

Miniaturní prasata MeLiM (Melanoma bearing Libechov Minipigs) jsou chována v Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd České republiky v Liběchově. Sem bylo v roce 1967 dovezeno pět prasat plemene hormel, která zde byla křížena s plemeny: landrace, bílé ušlechtilé, cornwall, vietnamské a gottingenské miniaturní prase pro výzkum krevních skupin (Du et al., 2007). Jejich křížením vzniklo na 2 000 potomků bez známek melanomu. Nicméně v roce 1989 se v této geneticky heterogenní populaci vyskytlo několik černě pigmentovaných prasat s melanomy. Tato prasata pocházela z křížení dvou bratrů a čtyř příbuzných samic, jež neměli žádné viditelné melanomy (Fortýn et al., 1998). Postupně tak selektivním šlechtěním na výskyt melanomu vznikl kmen MeLiM. Kmen byl šlechtěn na nízkou hmotnost (v jednom roce věku 35 kg) a brzkou pohlavní dospělost (okolo čtvrtého měsíce věku). Barva zvířat je variabilní od bílé s černými nebo červenými fleky po zcela černé nebo rezavě červené. Nádory se vyskytují u obou pohlaví bez rozdílu. Tento model je charakterizován mnohačetnými kožními nádory, metastázemi v různých orgánech a vysokým výskytem nádorů. Melanomy jsou vizuálně rozpoznatelné jako černě pigmentované léze na kůži (Horák et al., 1999). Prasečí melanom je v biochemických, imunohistochemických a molekulárně biologických vlastnostech velmi podobný lidským maligním melanomům. Šlechtitelské analýzy ukázaly, že se melanom dědí autosomálně recesivním způsobem. Zatím bylo identifikováno pouze několik genů, podílejících se na vzniku melanomu. Například gen MITF se podílí na proliferaci melanomových buněk (Bourneuf et al., 2011).

Melanom u kmene MeLiM je léčitelný pomocí devitalizace. Devitalizace je jednoduchá chirurgická technika, založená na ischemizaci nádoru pomocí překrývajících se stehů. Rozpad melanomových buněk a přeměna nádorové tkáně na vazivovou, trvá různé dlouhou dobu. Devitalizace jednoho z několika nádorů je dostačující pro úspěšnou terapii. Zbývající kožní melanomy, stejně jako metastáze, zmizí za několik měsíců. Spontánní i devitalizační regrese nádoru je doprovázena kožní depigmentací. Mechanismus regrese melanomu není dosud známý. Předběžné výsledky ukazují zvýšené množství proteinů teplotního šoku a následné zvýšení infiltrace tumoru T lymfocyty. Z toho se dá usoudit, že za regresí melanomu stojí buněčná protinádorová imunita (Hruban et al., 2004). U rychle rostoucích nádorů nastává spontánní regrese ve věku tří až čtyř měsíců, u pomalu rostoucích nádorů ve věku pěti až sedmi měsíců. Kompletní spontánní regrese nádoru nastává u 96 % prasat (Vincent – Naulleau et al., 2004).

U lidí je kompletní spontánní regrese velice vzácná. Uvažuje se o různých mechanismech spouštějících regresi melanomu: imunitní odpověď, virová infekce nádorových buněk, apoptóza indukovaná cytokiny, velké množství stresových hormonů, hypoxie, telomerázové zlomy a genové mutace (Rambow et al., 2008).

## 4 Materiály a metody

### 4.1 Detekce antigen specifických buněk barvením intracelulárních cytokinů

#### 4.1.1 Získávání periferní krve a izolace PBMC

Periferní krev byla odebrána punkcí *vena jugularis* miniaturním prasatům MeLiM s dědičnou formou melanomu ve stadiu progresu a spontánní regrese nádorů. Kvůli zabránění koagulace byla krev odebrána do plastových zkumavek obsahujících K<sub>3</sub>EDTA (Vacuette, Greiner). Odběr krve probíhal v souladu s platnou legislativou dle zákona č. 359/2012 Sb., na „ochranu zvířat proti týrání“, a vyhlášky č. 299/2014 Sb., o „ochraně pokusných zvířat“.

Plná krev byla naředěna s PBS v poměru 1:1, a tato směs následně přepipetována do sterilního Falkonu (Fisher Scientific) na 3 ml hladinu Histopaque roztoku 1077g/l (Sigma). Toto bylo centrifugováno při pokojové teplotě 30 minut při 600g s vypnutou brzdou. Poté byla přenesena zakalená vrstva PBMC (na rozhraní mezi histopaquem a krevní plazmou) do nového sterilního Falkonu. Tato vrstva byla dvakrát promyta minimálně stejným objemem PBS, centrifugována při 400g po dobu 5 minut a byl slit supernatant. Nakonec byly PBMC pelety rozpuštěny v PBS.

#### 4.1.2 Stanovení počtu životaschopných buněk

Bylo smícháno 10  $\mu$ l PBMC suspenze s 10  $\mu$ l 0,4 % Trypanomové modři (Sigma) a důkladně promícháno pipetováním. Takto připravený vzorek byl napipetován do Bürkerovy komůrky a pomocí optického mikroskopu byl spočítán počet životaschopných PBMC ve čtyřech velkých čtvercích. Výpočet PBMC v 1 ml byl prováděn podle vzorce:

$$\frac{\text{PBMC ve všech 4 čtvercích}}{4} \times 10 \times 10^4$$

#### 4.1.3 Stimulace PBMC a barvení povrchových markerů

Bylo přeneseno 200  $\mu$ l buněčné suspenze do 24-jamkové destičky tak, že konečná koncentrace buněk byla 2 x 10<sup>6</sup> /ml. Poté byl přidán roztok PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate, Sigma-Aldrich, konečná koncentrace 50ng/ml), ionomycinu (Sigma-Aldrich, konečná

koncentrace 1 µg/ml) a brefeldinu A (Sigma-Aldrich, konečná koncentrace 10 µg/ml). Toto bylo inkubováno po dobu 4 hodin při 37°C v atmosféře s 5% CO<sub>2</sub>.

Po uplynutí inkubace byly vzorky promyty PBS. Pro identifikaci CD4<sup>+</sup> T lymfocytů byly buňky obarveny protilátkou mouse anti-pig CD4 konjugovanou s PerCP-Cy5.5 (BD Biosciences)

Dále bylo přidáno 50 µl fixačního činidla a byly inkubovány 15 minut při pokojové teplotě. Mezitím byla naředěna protilátka mouse anti-bovine IFN $\gamma$  (Serotec) permeabilizačním roztokem v poměru 1:20 (fixační a permeabilizační roztok z kitu IntraStain, DAKO). Ke vzorkům bylo přidáno 2,5 µl této protilátky a 30 minut inkubováno při 4 °C. Po inkubaci byly vzorky centrifugovány 3 minuty 1200 rpm a promyty 200 µl PBS.

Nakonec bylo ke vzorkům přidáno 200 µl PBS a směs přepipetována do proměřovacích zkumavek pro průtokovou cytometrii. Měření bylo prováděno průtokovou cytometrií (FACS Calibur, Becton Dickinson)

## **4.2 Stanovení exprese cytokinů pomocí PCR**

### **4.2.1 Získávání a zpracování periferní krve**

Periferní krev byla odebrána punkcí *vena jugularis* miniaturním prasatům MeLiM s dědičnou formou melanomu ve stadiu progresu a spontánní regrese nádorů. Kvůli zabránění koagulace byla krev odebrána do plastových zkumavek obsahujících K<sub>3</sub>EDTA (Vacuette, Greiner). Krev byla odebrána 15 prasatům, rozdělených do tří skupin podle stáří. Jako kontrola, byla použita i krev 15 bílých prasat bez melanomu, přibližně stejného stáří, jako byla prasata MeLiM. První skupině bílých i MeLiM prasat byla odebrána krev ve věku cca čtyř týdnů, druhé ve věku devíti týdnů a třetí ve věku šestnácti týdnů. Věkové kategorie byly vybrány tak, aby byly zastoupeny nádory v progresu (u čtyřtýdenních prasat), počátek regrese (u devítitýdenních prasat) a rozvinutá regrese nádorů (u šestnáctitýdenních prasat).

### **4.2.2 Izolace mononukleárních buněk**

Mononukleární buňky (PBMC) byly izolovány z krve za pomoci lyzačního roztoku Easy Lyse (Dako). Izolace byla provedena podle pokynů výrobce přidáním 19 ml destilované vody k 1 ml roztoku Easy Lyse a 2 ml krve. Tato směs byla inkubována v pokojové teplotě po

dobu 10 minut. Dále byla centrifugována 6 minut při 1500 rpm (Hettich, UNIVERSAL 32 R) a propláchnuta 10 ml roztoku PBS, toto bylo ještě jednou zopakováno. Nakonec byly k izolovaným mononukleárním buňkám přidány 3 ml média DMEM obohaceného o 10% fetální bovinní sérum, antibiotika, glutamin a neesenciální aminokyseliny.

#### **4.2.3 Stimulace a inkubace mononukleárních buněk**

Pro stimulaci PBMC byl přenesen 1 ml buněčné suspenze na 24-jamkovou destičku. Každý vzorek byl umístěn do dvou jamek. Dále se předředil roztok média, PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) a ionomycinu (Sigma-Aldrich, USA) v poměru 1:100, který se následně přidal do jedné jamky od každého vzorku v konečném ředění 1:10 000. Ve druhé jamce zůstala čistá buněčná suspenze. Poté se vzorky kultivovaly po dobu 4 hodin při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>. Po inkubaci byly stimulované a nestimulované vzorky zvlášť přeneseny do 1,5 ml zkumavek Eppendorf. Do zkumavek se stimulovanými buňkami bylo dále přidáno 350 µl TRK Lysis Buffer +BME (β – Merkptoethanol) (Omega Bio-Tek E. Z. N. A. Total RNA kit I), které byly předředěny: 1 ml TRK + 20 µl BME. Všechny vzorky byly zamrazeny na - 80 °C.

#### **4.2.4 Izolace RNA a přepis do cDNA**

RNA byla z lyzovaných buněk izolována použitím kitu E. Z. N. A. Total RNA kit I (Omega Bio-Tek). Ke vzorkům bylo přidáno 350µl 100% etanolu, vzorky byly přeneseny na kolonky a centrifugovány. Ve sterilním boxe bylo ke vzorkům napipetováno 500 µl RNA Wash Buffer I, centrifugováno a slito. Dále byl přidán stejným postupem RNA Wash Buffer II a RNA Wash Buffer I. Nakonec byla kolonka přendána do zkumavky Eppendorf a čistá RNA byla eluována 40µl DEPC-water (destilovaná voda ošetřená dietylpyrokarbonátem).

Následně bylo přepipetováno 16,75 µl RNA z každého vzorku do sterilní RNase – free zkumavky a k nim přidáno 1 µl Random Primeru (Promega). Vzorky byly poté zahřáty na 70 °C po dobu 5 minut a následně zchlazeny na ledu, taktéž 5 minut. Ke každému vzorku bylo přidáno 7,25 µl mastermixu složeného z 5 µl M – MLV RT 5x Reaction Buffer, 1,25 µl dNTP a 1 µl M – MLV RT (H-) Point Mutant (vše Promega). Dále se vzorky nechaly inkubovat 10 minut při pokojové teplotě, 50 minut při 50 °C a 15 minut při 70 °C. Následně byly vzorky skladovány při - 80 °C.



#### 4.2.5 Barvení a program PCR

Pro sledování exprese genů byla použita metoda barvení SybrGreen (PCR Master Mix HotFirePol EvaGreen Supermix, Solis Biodyne). Nejprve byl do 1,5 ml zkumavky Eppendorf vytvořen mix z RNA a vzorků, a do druhé zkumavky mix ze stimulovaných cDNA vzorků. Od každého vzorku byl odebrán 1  $\mu$ l. Poté byly vybrány primery pro TGF $\beta$ , IL – 10, IL – 8, IL – 6, IL – 4, IL – 2 a IFN $\gamma$  (Generi Biotech). Tyto primery byly rozředěny s vodou na koncentraci 100 $\mu$ mol/l, dle instrukcí výrobce. Dále byl do 1,5 ml zkumavky Eppendorf připraven Master Mix pro 100 jamek. Master Mix byl složen z 200  $\mu$ l 5 x EvaGreen qPCR Supermix, 0,5  $\mu$ l forward primeru, 0,5  $\mu$ l reverse primeru a 700  $\mu$ l PCR vody. Do každé jamky 96-jamkové destičky bylo napipetováno 9  $\mu$ l Master Mixu a 1  $\mu$ l cDNA. Všechny vzorky byly pipetovány v duplikátech. Na konec destičky byly napipetovány RNA mix, cDNA mix a voda.

Stanovení real – time PCR proběhlo na přístroji Chromo4 s použitím software Opticon Monitor 3.1 (Biorad). PCR program byl složen z iniciálních 15 minut při 95 °C, 45 cyklů (denaturace 15 sekund při 95 °C, annealing 30 sekund při 59 °C, elongace 30 sekund při 72 °C) a kroku stanovení teploty tání. Relativní exprese genů byla normalizována použitím house – keeping genu HPTR (Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase, Generi Biotech).

### 4.3 Měření proliferace buněk

Získání a zpracování periferní krve viz kapitola 4.2.1

Izolace mononukleárních buněk viz kapitola 4.2.2

#### 4.3.1 Značení leukocytů CFSE

Na začátku byl připraven roztok 2  $\mu$ M CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester, Sigma) v 1 x PBS (5 ml PBS + 2  $\mu$ l CFSE). Do zkumavek s izolovanými PBMC bylo přidáno 10 ml PBS. Následně byly zkumavky centrifugovány na 1000 rpm 5 minut a tekutina slita. Poté byl přidán 1 ml PBS a 1 ml připraveného roztoku CFSE. Toto bylo vortexově (BIOSAN BioVortex V1) promícháváno po dobu 8 minut. Dále byly přidány 2 ml FBS (fetální bovinní sérum), stočeno a slito stejným způsobem. Opět byl přidán 1 ml PBS. Do 48-jamkové destičky bylo do čtyř jamek napipetováno 150  $\mu$ l od každého vzorku. První jamka zůstala kontrolní, do druhé bylo přidáno 15  $\mu$ l Concanavalinu A (5  $\mu$ g/ml, Sigma), do třetí jamky byl

přidán 1  $\mu$ l lyzátu nádoru v progresi (L1) a do poslední jamky byl přidán 1  $\mu$ l lyzátu z bílé prasečí kůže (L4). Lyzáty byly připraveny rozmixováním 50 mg tkáně v 1 ml PBS za přítomnosti Complete protease inhibitor (Roche) a třikrát opakovaným zmrazením a rozmrazením při  $-80$  °C. Poté byla destička vložena na 7 dní do inkubátoru při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>.

#### **4.3.2 Značení CD4 T lymfocytů**

Po týdnu inkubace byla destička centrifugována na 1300 rpm 3 minuty, tekutina slita. Dále byla předředěna protilátka PerCP – Cy 5.5 Mouse Anti – Pig CD4a v poměru 1:100 (5  $\mu$ l protilátky + 500  $\mu$ l 0,2 % gelatin/PBS s 0,1 % Na – azid). Následně bylo 20  $\mu$ l této protilátky přidáno do každé jamky a destička byla 20 minut inkubována v lednici při 4 °C. Po inkubaci byly vzorky promyty 150  $\mu$ l gelatin/PBS s 0,1 % Na – azid. Ke vzorkům bylo přidáno 150  $\mu$ l gelatin/PBS s 0,1 % Na – azid a byly přeneseny do cytometrických zkumavek, do kterých bylo přidáno ještě 100  $\mu$ l gelatin/PBS s 0,1 % Na – azid. Takto připravené vzorky byly dále měřeny na průtokovém cytometru FACS Calibur (Becton Dickinson) se softwarem CellQuest. Cytometrická data byla analyzována použitím softwaru FlowJo (Treestar). Nejprve byly na základě rozptylu světla identifikována populace lymfocytů na dot plotu FSC/SSC, a potom byly na dot plotu CFSE/CD4 identifikovány proliferující Th buňky (CD4 – pozitivní buňky s nízkou intenzitou fluorescence CFSE).

#### **4.4 Statistické hodnocení**

Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí softwaru NCSS 10 (NCSS Statistical Software). Na základě výsledků testů normality, byl pro hodnocení vzorků s normální distribucí použit Studentův T test a pro neparametrická data Mann Whitney U test. Za statisticky významné rozdíly mezi experimentálními skupinami bylo považováno  $p < 0,01$ .

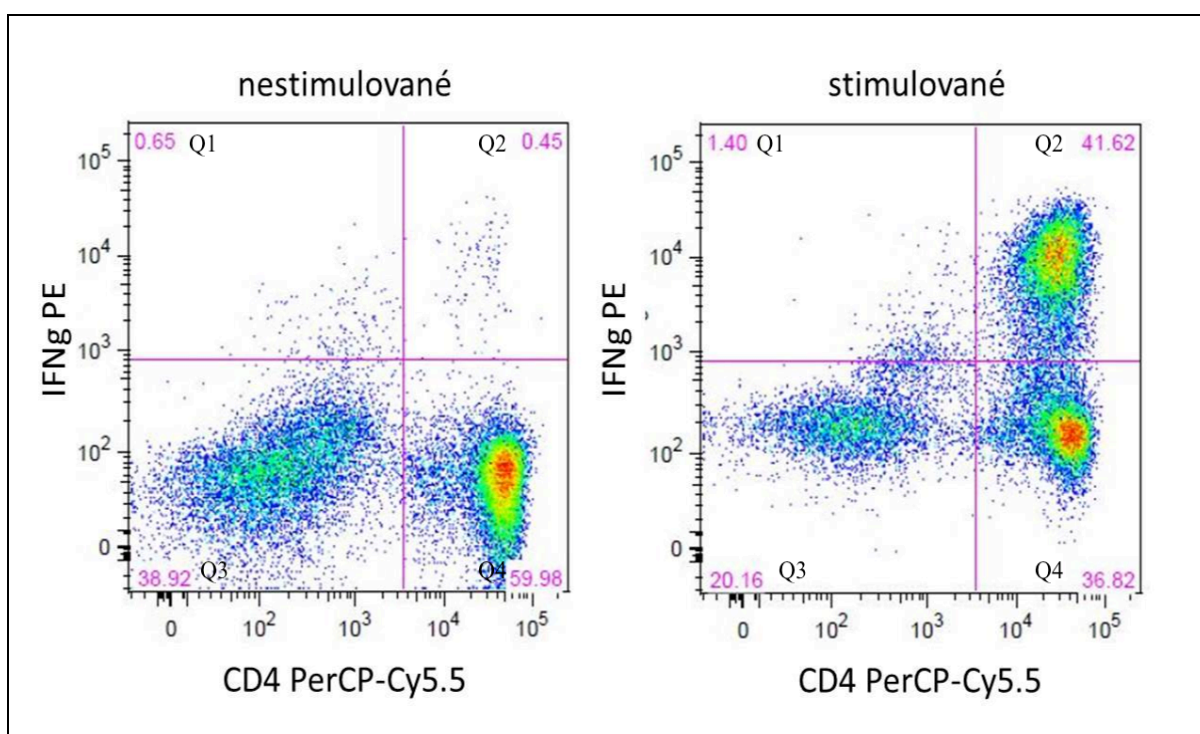
## 5 Výsledky

### 5.1 Detekce antigen specifických buněk barvením intracelulárního IFN $\gamma$

Detekce CD4<sup>+</sup> T lymfocytů byla provedena z mononukleárních buněk stimulovaných PMA a ionomycinem za přítomnosti inhibitoru proteinového transportu brefeldinu A. Pro identifikaci CD4<sup>+</sup> T lymfocytů byly buňky obarveny protilátkou (mouse anti-pig CD4 konjugovanou s PerCP-Cy5.5). Intracelulární IFN $\gamma$  byl taktéž obarven protilátkou (mouse anti-bovine IFN $\gamma$  konjugovanou s PE). K měření byl použit průtokový cytometr FACS Calibur.

Na grafu je zobrazen ilustrační důkaz o funkčnosti této metody. Z grafu je patrné, že procento nestimulovaných buněk CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> (Q2) je mnohem nižší než u buněk stimulovaných.

**Graf 1.** Dot plot z detekce CD4<sup>+</sup> T lymfocytů metodou barvení intracelulárního IFN $\gamma$



Barvení intracelulárního IFN $\gamma$  v PBMC izolovaných z periferní krve pětíměsíčního melanomového prasete. Buňky byly stimulovány PMA a ionomycinem 4 h za přítomnosti brefeldinu A a analyzovány na průtokovém cytometru.

Je zde vyobrazena populace T lymfocytů, v pravém horním kvadrantu (Q2) je zobrazeno procento CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> buněk před a po stimulaci.

## 5.2 Stanovení exprese cytokinů pomocí PCR

Hodnocení exprese cytokinů bylo provedeno na obarvené cDNA (metoda SybrGreen), ke které byly přidány sledované primery. Použitím real – time PCR bylo stanoveno sekretované množství daného cytokinu ve vzorku, jehož relativní exprese byla normalizována použitím house – keeping genu HPRT. Pro účely vyhodnocení, byly vzorky rozděleny do tří skupin podle věku u MeLiM a kontrolních bílých prasat.. Byly porovnány hodnoty exprese cytokinů stimulovanými mononukleárními buňkami mezi stejně starými selaty MeLiM a kontrolními bílými.

### 5.2.1 Rozdělení MeLiM prasat do skupin

V každé skupině se nacházelo pět prasat různého pohlaví. Byly vytvořeny tři skupiny podle věku: čtyřtýdenní (obr. 1), devítitýdenní (obr. 2) a šestnáctitýdenní (obr. 3). Stejným principem byla rozdělena i kontrolní bílá nemelanomová prasata.

**Obr. 1.** MeLiM prase ve věku čtyř týdnů v progresi (upraveno dle Planska et al., 2015)



**Obr. 2.** MeLiM prase ve věku devíti týdnů na začátku spontánní regrese (převzato z ÚŽFG AV ČR Liběchov)



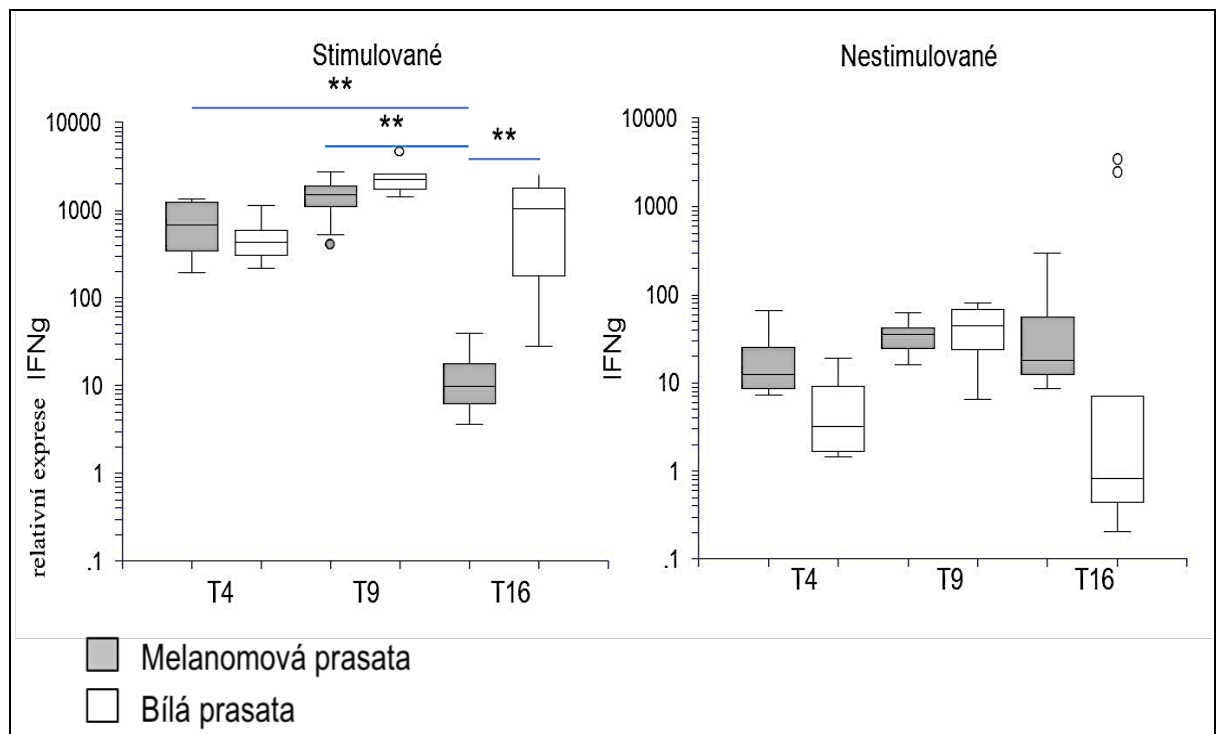
**Obr. 3.** MeLiM prase ve věku šestnácti týdnů (upraveno dle Planska et al., 2015)



### 5.2.2 Exprese cytokinů IFN $\gamma$

Stimulace (PMA/ionomycin) mononukleárních buněk (PBMC) vedla ke zvýšení exprese IFN $\gamma$  u melanomových čtyřtýdenních a devítitýdenních skupin prasat a u všech věkových skupin bílých prasat. U šestnáctitýdenní skupiny melanomových prasat neměla stimulace vliv na expresi daného cytokinu. Při srovnání melanomových a bílých skupin prasat ve věku čtyř a devíti týdnů nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v expresi IFN $\gamma$ . Statisticky významná vyšší exprese byla zjištěna u bílých prasat ve věku šestnácti týdnů. Skupina čtyř a devítitýdenních melanomových prasat vykazovala statisticky významnou vyšší expresi než šestnáctitýdenní melanomová prasata (Graf 2).

**Graf 2.** Hodnocení exprese IFN $\gamma$  mononukleárními buňkami metodou RT – PCR



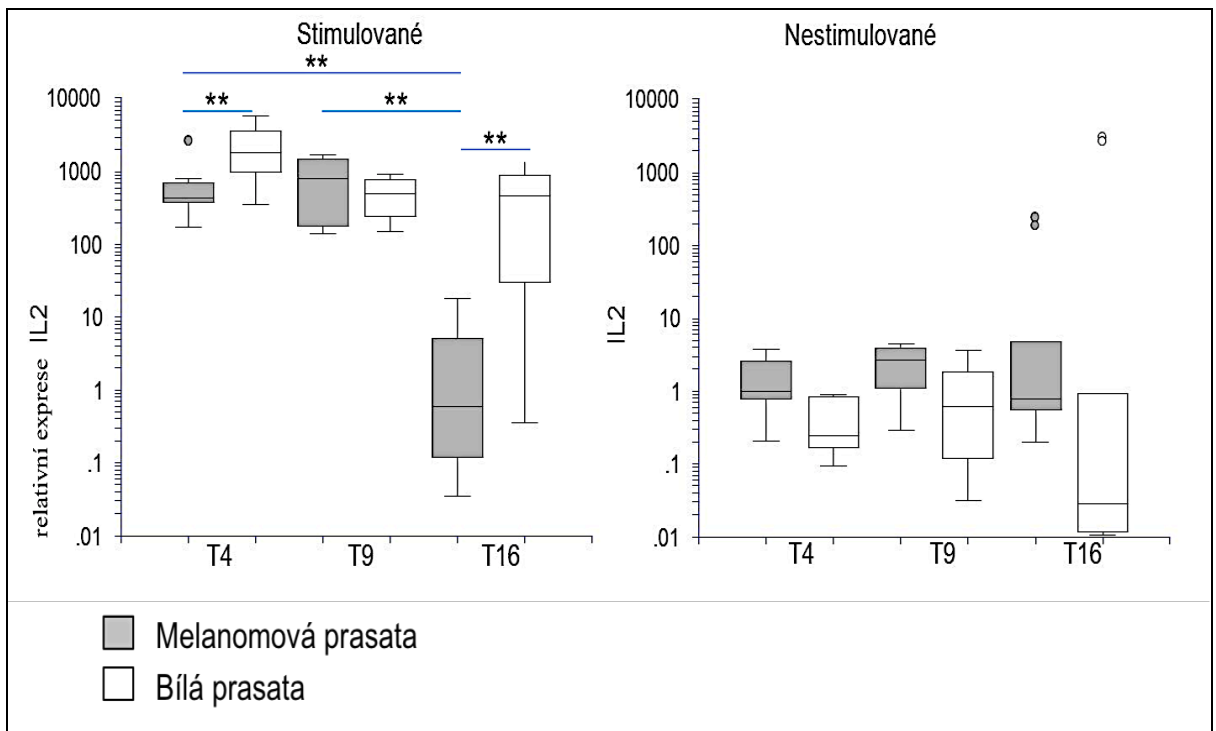
Relativní exprese IFN $\gamma$  měřená na základě přidání příslušných primerů k cDNA, která byla přepsána z RNA PBMC stimulovaných PMA a ionomycinem po dobu 4 h. PBMC byly izolovány z periferní krve melanomových a bílých prasat ve věku čtyř (T4), devíti (T9) a šestnácti (T16) týdnů.

\*\* Statisticky významné rozdíly mezi experimentálními skupinami v podílu prolifерujících CD4<sup>+</sup> T lymfocytů ( $p < 0, 01$ ).

### 5.2.3 Exprese cytokinů IL – 2

Stimulace PBMC u čtyřtýdenních, devítitýdenních a bílých šestnáctitýdenních skupin prasat vedla ke zvýšené expresi IL – 2. Stimulace u melanomové šestnáctitýdenní skupiny prasat neměla vliv na expresi cytokinu. Porovnáním devítitýdenních skupin prasat nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v expresi IL – 2. U čtyřtýdenních a šestnáctitýdenních skupin prasat byly zjištěny statisticky významné vyšší exprese u bílých prasat. Skupina čtyř a devítitýdenních melanomových prasat vykazovala statisticky významnou vyšší expresi než šestnáctitýdenní melanomová prasata (Graf 3).

**Graf 3.** Hodnocení exprese IL - 2 mononukleárními buňkami metodou RT – PCR



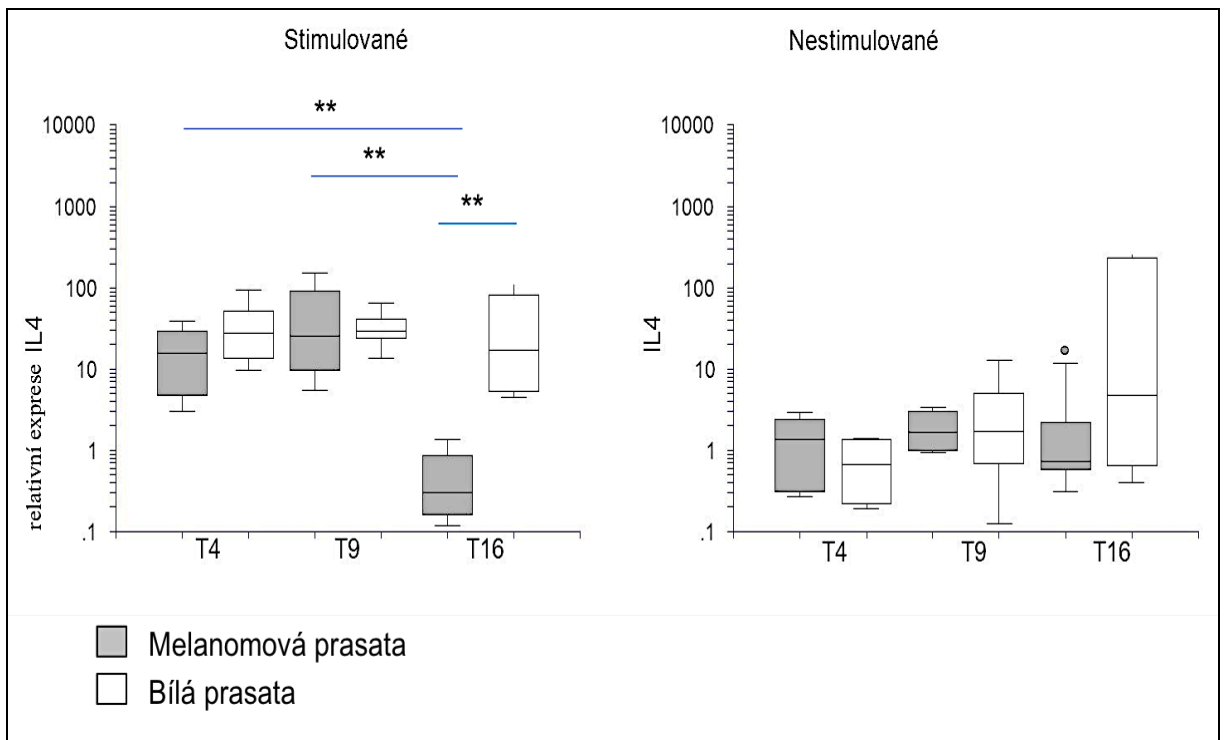
Relativní exprese IL – 2 měřená na základě přidání příslušných primerů k cDNA, která byla přepsána z RNA PBMC stimulovaných PMA a ionomycinem po dobu 4 h. PBMC byly izolovány z periferní krve melanomových a bílých prasat ve věku čtyř (T4), devíti (T9) a šestnácti (T16) týdnů.

\*\* Statisticky významné rozdíly mezi experimentálními skupinami v podílu proliferaujících CD4<sup>+</sup> T lymfocytů (p < 0, 01).

#### 5.2.4 Expresie cytokinů IL – 4

Stimulace PBMC u čtyřtýdenních, devítitýdenních a bílých šestnáctitýdenních skupin prasat vedla ke zvýšené expresi IL – 4. U melanomové šestnáctitýdenní skupiny prasat byla detekována snížená exprese daného cytokinu. Při srovnání exprese cytokinů čtyřtýdenními a devítitýdenními skupinami prasat, nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly. Srovnáním šestnáctidenních skupin prasat byla zjištěna statisticky významná vyšší exprese IL – 4 u bílých prasat. Skupina čtyř a devítitýdenních melanomových prasat vykazovala statisticky významnou vyšší expresi než šestnáctitýdenní melanomová prasata (Graf 4).

**Graf 4.** Hodnocení exprese IL – 4 mononukleárními buňkami metodou RT – PCR



Relativní exprese IL – 4 měřená na základě přidání příslušných primerů k cDNA, která byla přepsána z RNA PBMC stimulovaných PMA a ionomycinem po dobu 4 h. PBMC byly izolovány z periferní krve melanomových a bílých prasat ve věku čtyř (T4), devíti (T9) a šestnácti (T16) týdnů.

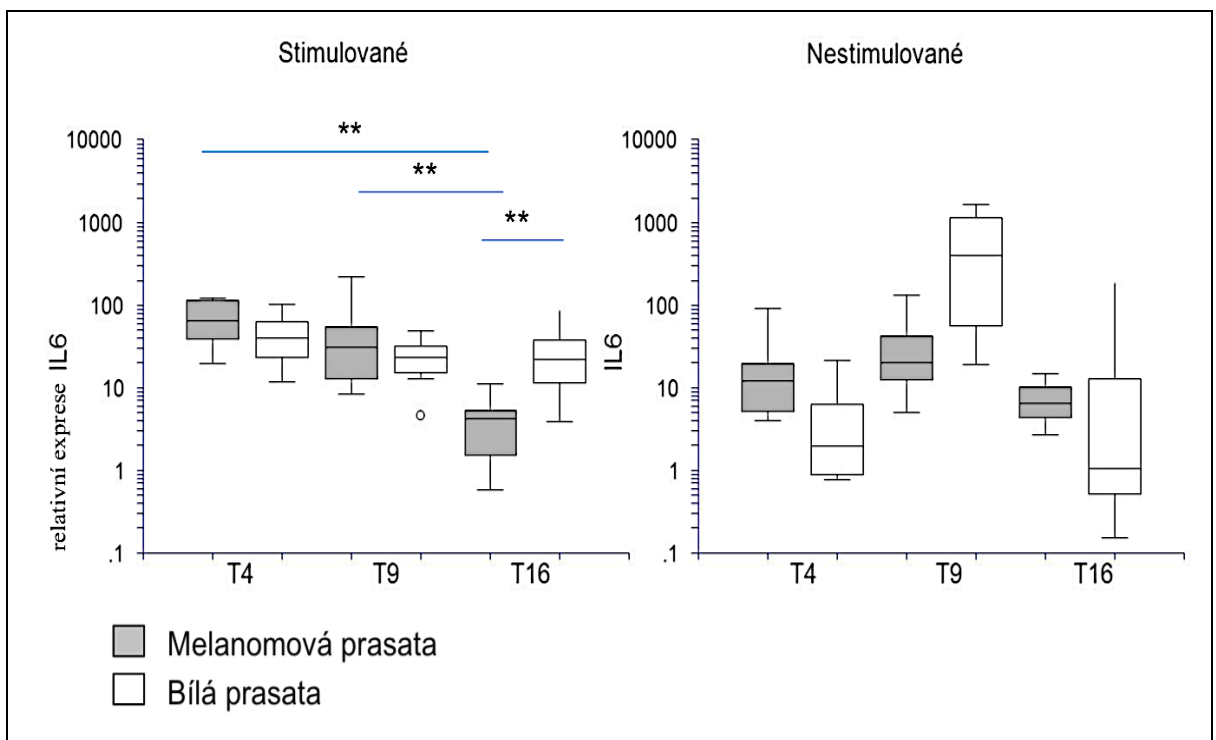
\*\* Statisticky významné rozdíly mezi experimentálními skupinami v podílu prolifерujících CD4<sup>+</sup> T lymfocytů ( $p < 0,01$ ).



### 5.2.5 Exprese cytokinů IL – 6

Stimulace PBMC u obou čtyřtýdenních, melanomových devítitýdenních a bílých šestnáctitýdenních skupin prasat vedla ke zvýšené expresi IL – 6. U bílých devítitýdenních a melanomových šestnáctitýdenních skupin prasat, byla detekována snížená exprese daného cytokinu. Srovnáním čtyř a devítitýdenních skupin prasat nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v expresi IL – 6. U šestnáctitýdenních skupin prasat byla zjištěna statisticky významná vyšší exprese u bílých prasat. Skupina čtyř a devítitýdenních melanomových prasat vykazovala statisticky významnou vyšší expresi než šestnáctitýdenní melanomová prasata (Graf 5).

**Graf 5.** Hodnocení exprese IL – 6 mononukleárními buňkami metodou RT – PCR



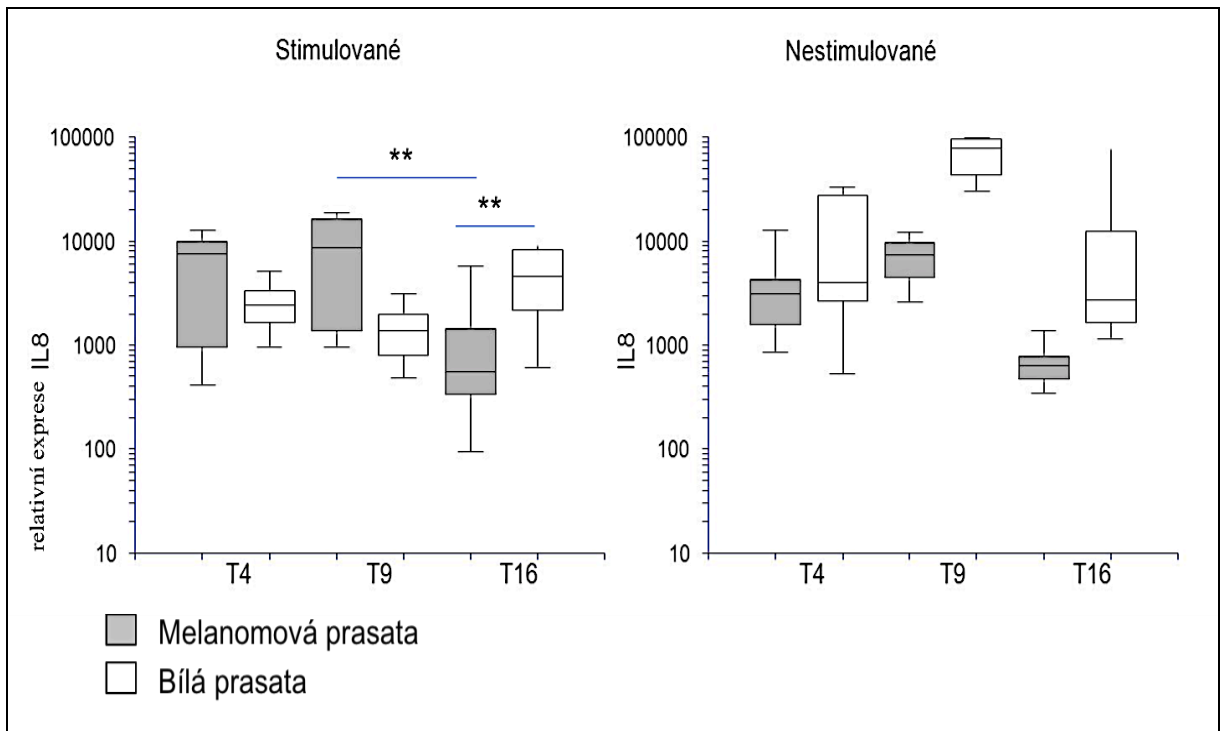
Relativní exprese IL – 6 měřená na základě přidání příslušných primerů k cDNA, která byla přepsána z RNA PBMC stimulovaných PMA a ionomycinem po dobu 4 h. PBMC byly izolovány z periferní krve melanomových a bílých prasat ve věku čtyř (T4), devíti (T9) a šestnácti (T16) týdnů.

\*\* Statisticky významné rozdíly mezi experimentálními skupinami v podílu prolifерujících CD4<sup>+</sup> T lymfocytů (p < 0, 01).

### 5.2.6 Exprese cytokinů IL – 8

Stimulace PBMC u všech věkových skupin melanomových prasat a u bílé šestnáctitýdenní skupiny neměla vliv na expresi IL – 8. U bílých čtyřtýdenních a devítitýdenních skupin byla po stimulaci detekována snížená exprese daného cytokinu. Při srovnání skupin čtyř a devítitýdenních prasat nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v expresi IL – 8. Bílá šestnáctitýdenní prasata vykazovala statisticky významnou vyšší expresi než stejně stará melanomová prasata. Skupina devítitýdenních melanomových prasat vykazovala statisticky významnou vyšší expresi než šestnáctitýdenní melanomová prasata (Graf 6).

**Graf 6.** Hodnocení exprese IL - 8 mononukleárními buňkami metodou RT - PCR



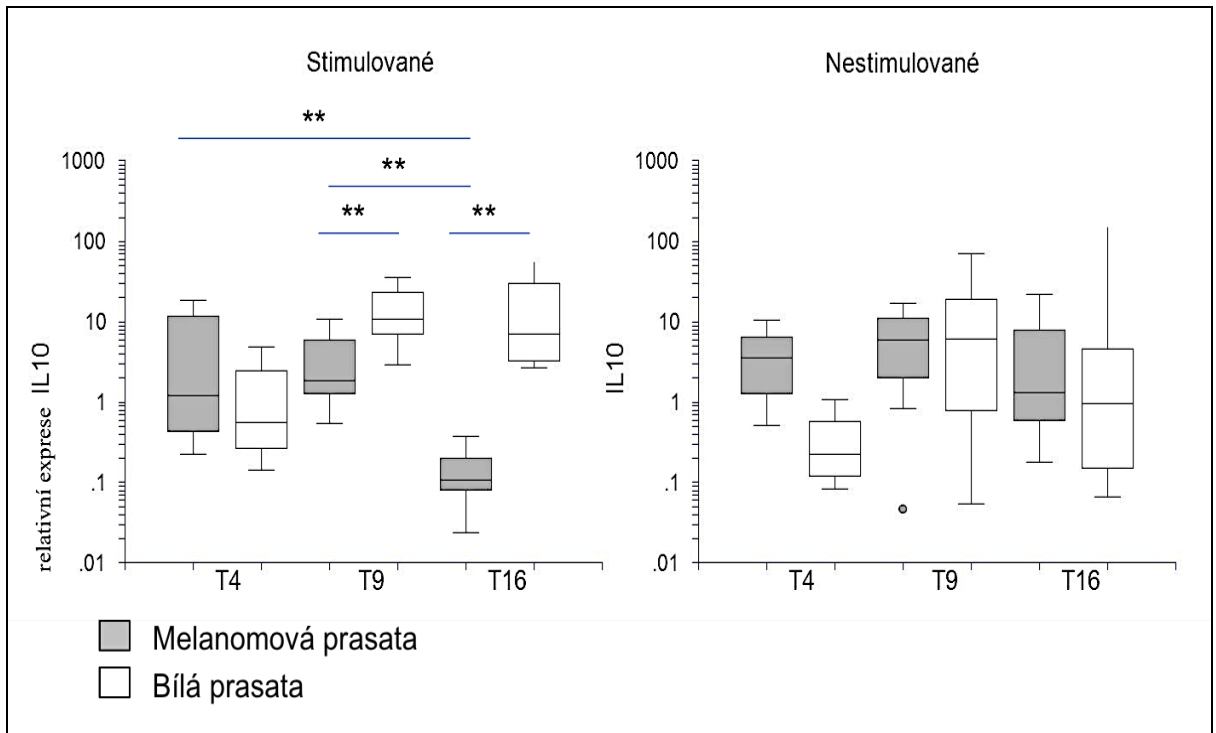
Relativní exprese IL – 8 měřená na základě přidání příslušných primerů k cDNA, která byla přepsána z RNA PBMC stimulovaných PMA a ionomycinem po dobu 4 h. PBMC byly izolovány z periferní krve melanomových a bílých prasat ve věku čtyř (T4), devíti (T9) a šestnácti (T16) týdnů.

\*\* Statisticky významné rozdíly mezi experimentálními skupinami v podílu proliferaujících CD4<sup>+</sup> T lymfocytů ( $p < 0,01$ ).

### 5.2.7 Exprese cytokinů IL – 10

Stimulace PBMC u všech věkových skupin bílých prasat vedla ke zvýšené expresi IL – 10. U melanomových devíti a šestnáctitýdenních prasat byla detekována snížená exprese daného cytokinu. U melanomové čtyřtýdenní skupiny prasat neměla stimulace vliv na expresi cytokinu. Při srovnání čtyřtýdenních skupin prasat nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v expresi IL – 10. Srovnáním devíti a šestnáctitýdenních skupin prasat byla zjištěna statisticky významná vyšší exprese u bílých prasat. Skupina čtyř a devítitýdenních melanomových prasat vykazovala statisticky významnou vyšší expresi než šestnáctitýdenní melanomová prasata (Graf 7).

**Graf 7.** Hodnocení exprese IL – 10 mononukleárními buňkami metodou RT – PCR



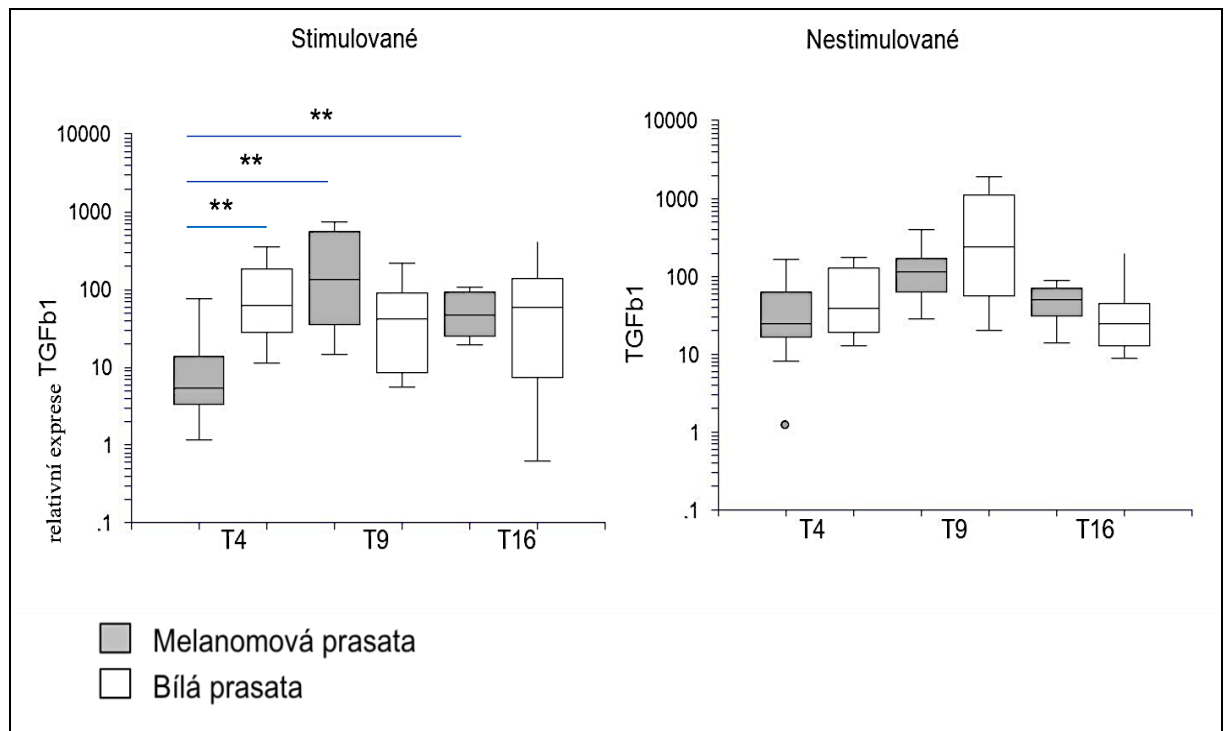
Relativní exprese IL – 10 měřená na základě přidání příslušných primerů k cDNA, která byla přepsána z RNA PBMC stimulovaných PMA a ionomycinem po dobu 4 h. PBMC byly izolovány z periferní krve melanomových a bílých prasat ve věku čtyř (T4), devíti (T9) a šestnácti (T16) týdnů.

\*\* Statisticky významné rozdíly mezi experimentálními skupinami v podílu proliferaujících CD4<sup>+</sup> T lymfocytů (p < 0, 01).

### 5.2.8 Exprese cytokinů TGFβ

Stimulace PBMC bílých čtyřtýdenních a šestnáctitýdenních a melanomových devítitýdenních skupin prasat vedla ke zvýšení exprese TGFβ. U melanomových čtyřtýdenních a bílých devítitýdenních skupin byla detekována snížená exprese daného cytokinu. U melanomové čtyřtýdenní skupiny prasat je exprese cytokinu stimulovaného vzorku srovnatelná s nestimulovaným. Při srovnání devíti šestnáctitýdenních skupin prasat nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v expresi TGFβ. U čtyřtýdenních skupin prasat byla zjištěna statisticky významná vyšší exprese u bílých prasat. Skupina devíti a šestnáctitýdenních melanomových prasat vykazovala statisticky významnou vyšší expresi než čtyřtýdenní melanomová prasata (Graf 8).

**Graf 8.** Hodnocení exprese TGFβ mononukleárními buňkami metodou RT - PCR



Relativní exprese TGFβ měřená na základě přidání příslušných primerů k cDNA, která byla přepsána z RNA PBMC stimulovaných PMA a ionomycinem po dobu 4 h. PBMC byly izolovány z periferní krve melanomových a bílých prasat ve věku čtyř (T4), devíti (T9) a šestnácti (T16) týdnů.

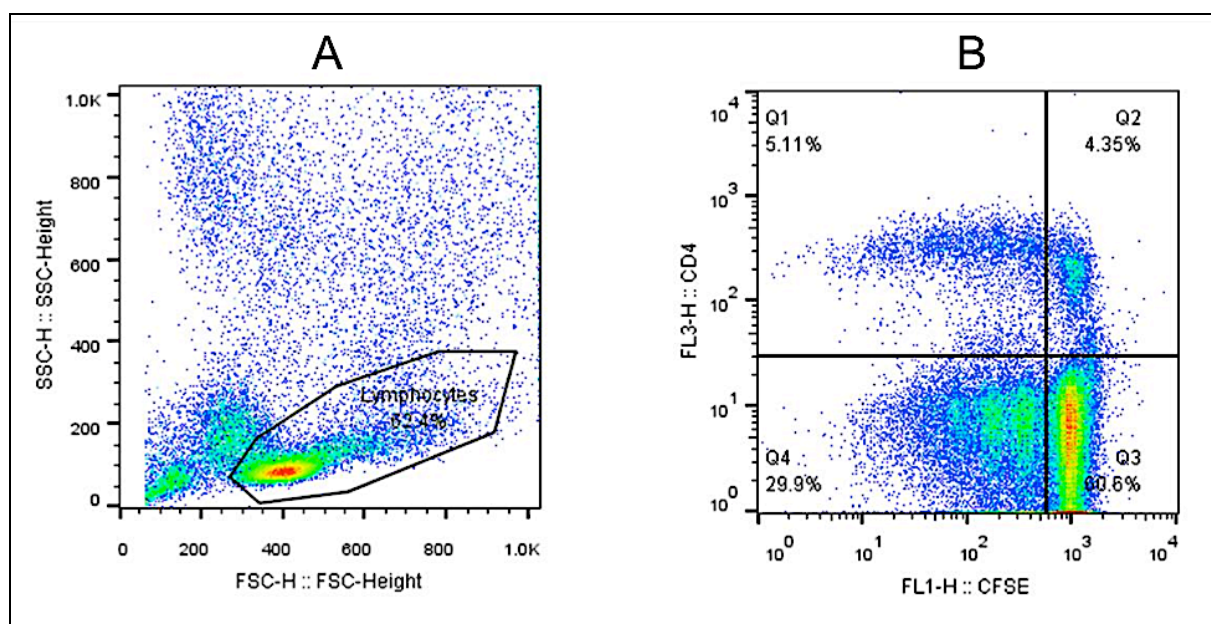
\*\* Statisticky významné rozdíly mezi experimentálními skupinami v podílu prolifерujících CD4<sup>+</sup> T lymfocytů ( $p < 0, 01$ ).

### 5.3 Měření proliferace CD4<sup>+</sup> buněk

Pro zjištění proliferační aktivity CD4<sup>+</sup> T lymfocytů byla použita metoda barvení CFSE. K obarveným buňkám bylo přidáno určené množství Concanavalinu A, lyzátu z nádoru, lyzátu z bílé kůže nebo medium. Po sedmi dnech inkubace, byly buňky obarveny protilátkou (PerCP – Cy 5.5 Mouse Anti – Pig CD4a) a takto připravené vzorky byly proměřeny na průtokovém cytometru FACS Calibur. Pro účely vyhodnocení byly vzorky rozděleny do tří skupin podle věku u MeLiM a kontrolních bílých prasat (viz. 1.1.). Byly porovnány procentuální rozdíly v proliferaci různě stimulovaných CD4<sup>+</sup> T lymfocytů u stejně starých MeLiM a bílých selat.

Na grafu 9 je ukázka dot plotu z měření proliferujících lymfocytů na průtokovém cytometru, ze kterého je dále získán údaj o podílu proliferujících CD4<sup>+</sup> T lymfocytů.

**Graf 9.** Dot plot měření proliferujících CD4<sup>+</sup> T lymfocytů značených CFSE po stimulaci ConA



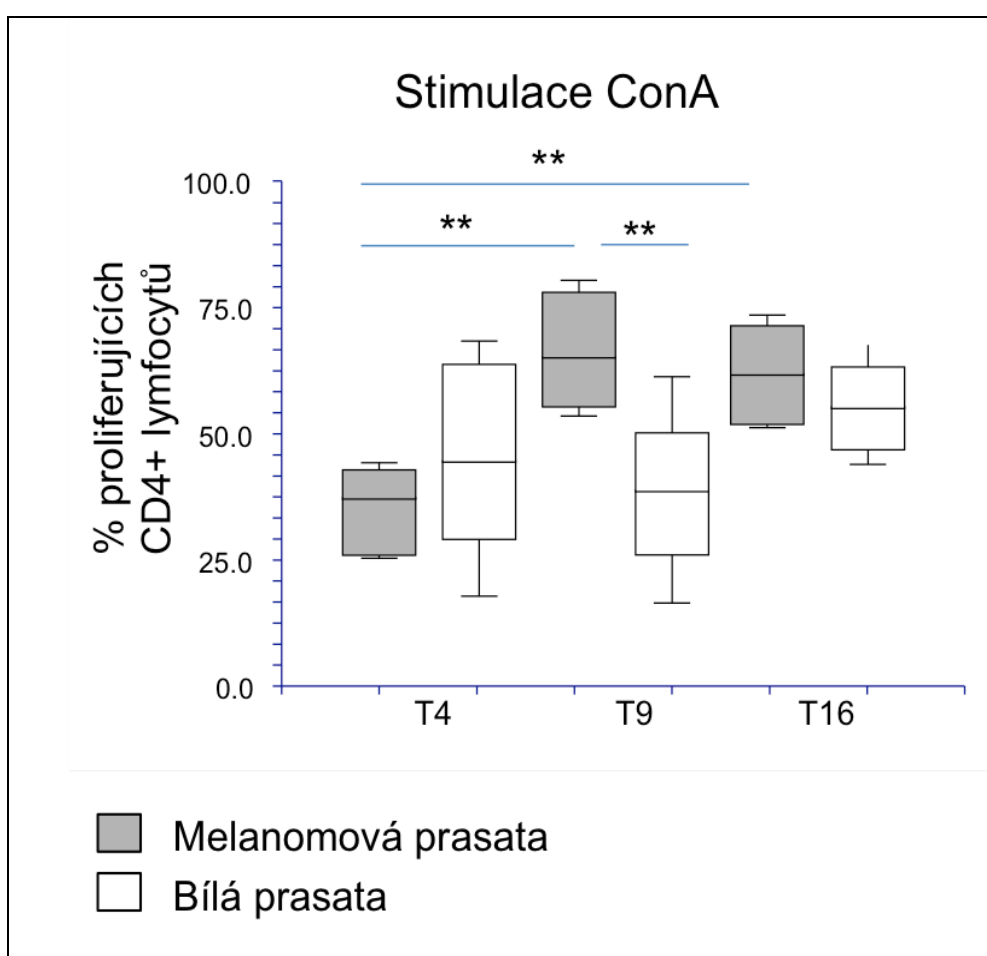
<sup>A</sup> Detekce lymfocytů z mononukleárních buněk periferní krve odebrané prasati MeLiM. Krev byla stimulována PMA a ionomycinem a označena CFSE. Odlišení lymfocytární populace proběhlo na základě rozptylu světla porovnáním FSC (forward scatter) a SSC (side scatter).

<sup>B</sup> Identifikace podílu proliferujících CD4<sup>+</sup> T lymfocytů (Q1) na základě procentuálního zastoupení CD4<sup>+</sup> buněk (Q1) vzhledem k součtu Q1 + Q2 (CD4<sup>+</sup>CFSE<sup>+</sup>).

### 5.3.1 Stimulované ConA

Stimulace ConA, vedla u všech skupin ke statisticky významnému vyššímu procentu proliferujících buněk, než u nestimulovaných vzorků. U bílých prasat nebyly zaznamenány žádné statisticky významné rozdíly v proliferaci mezi kategoriemi. Melanomová prasata vykazovala statisticky významný nárůst proliferujících buněk u prasat starších čtyř týdnů. Mezi devítitýdenními skupinami se našel statisticky významný vyšší podíl proliferujících buněk u melanomových prasat.

**Graf 10.** Měření proliferace CD4<sup>+</sup> T lymfocytů stimulovaných Concanavalinem A



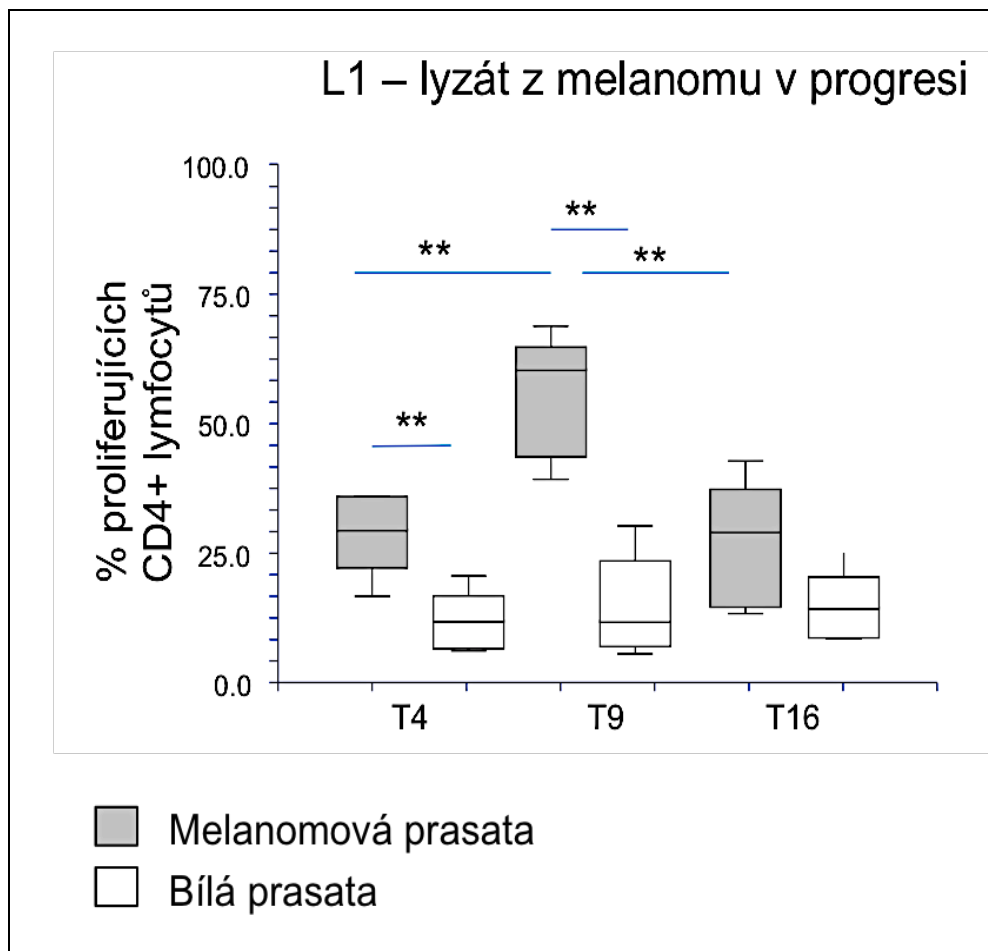
Proliferace CD4<sup>+</sup> T lymfocytů měřená na základě barvení PBMC metodou CFSE po stimulaci Concanavalinem A u melanomových a bílých prasat ve věku čtyř (T4), devíti (T9) a šestnácti (T16) týdnů. PBMC byly po 7 dnech inkubace označeny protilátkou PerCP – Cy 5.5 Mouse Anti – Pig CD4a.

\*\* Statisticky významné rozdíly mezi experimentálními skupinami v podílu proliferujících CD4<sup>+</sup> T lymfocytů ( $p < 0, 01$ ).

### 5.3.2 Stimulované lyzátem L1 (melanom v progresi)

U všech věkových kategorií bílých prasat nebyly zaznamenány statisticky významné rozdíly mezi stimulací lyzátem L1 (z melanomu), L4 (z bílé kůže) a nestimulovanými buňkami. Stimulace nádorovým lyzátem, vedla u všech věkových kategorií melanomových prasat ke statisticky významnému vyššímu procentu proliferujících buněk, než po stimulaci L4 a nestimulovanými vzorky. Skupina devítitýdenních melanomových prasat vykazovala statisticky významný vyšší podíl proliferujících buněk než čtyř a šestnáctitýdenní melanomová prasata. U čtyř a devítitýdenních melanomových prasat se nacházela statisticky významná vyšší procenta proliferujících buněk než u stejně starých bílých prasat.

**Graf 11.** Měření proliferace CD4<sup>+</sup> T lymfocytů stimulovaných lyzátem z melanomu



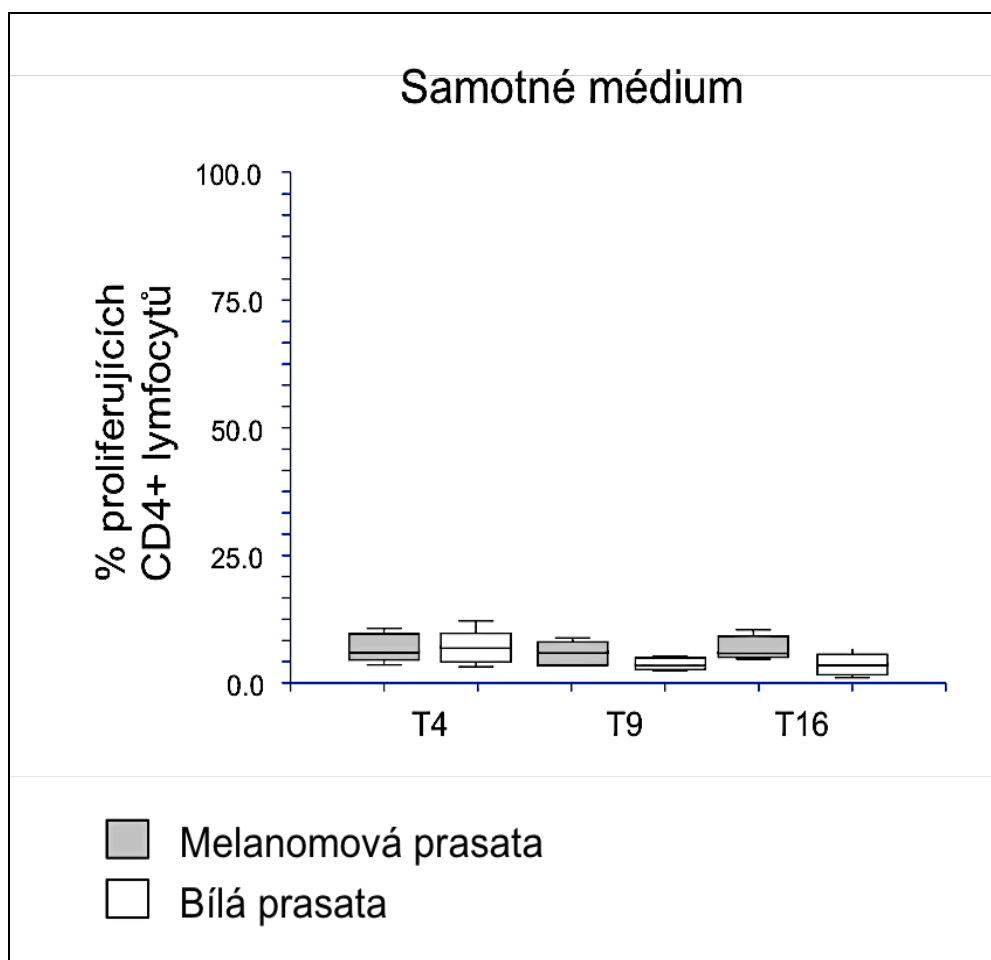
Proliferace CD4<sup>+</sup> T lymfocytů měřená na základě barvení PBMC metodou CFSE po stimulaci lyzátem z melanomu u melanomových a bílých prasat ve věku čtyř (T4), devíti (T9) a šestnácti (T16) týdnů. PBMC byly po 7 dnech inkubace označeny protilátkou PerCP – Cy 5.5 Mouse Anti – Pig CD4a.

\*\* Statisticky významné rozdíly mezi experimentálními skupinami v podílu proliferujících CD4<sup>+</sup> T lymfocytů ( $p < 0, 01$ )

### 5.3.3 Medium

Mezi nestimulovanými skupinami nebyly detekovány žádné statisticky významné rozdíly v buněčné proliferaci.

**Graf 12.** Měření proliferace nestimulovaných CD4<sup>+</sup> T lymfocytů



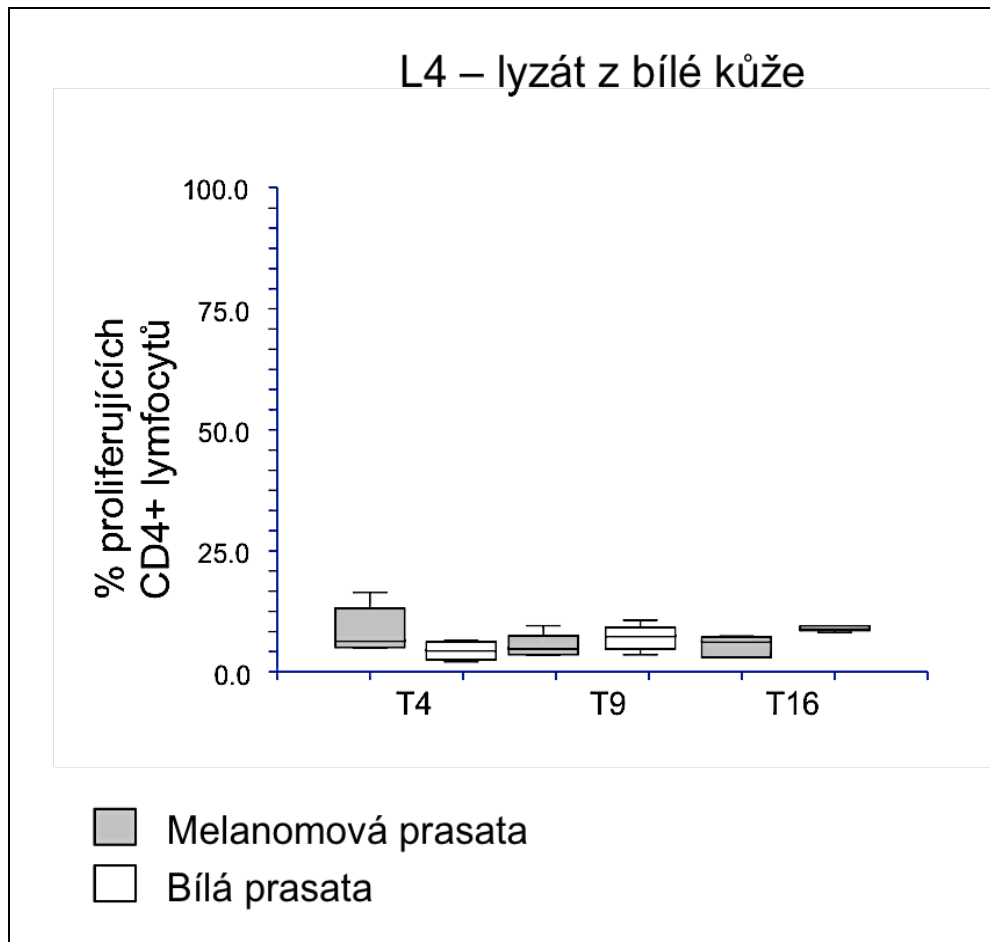
Proliferace CD4<sup>+</sup> T lymfocytů měřená na základě barvení PBMC metodou CFSE bez stimulace u melanomových a bílých prasat ve věku čtyř (T4), devíti (T9) a šestnácti (T16) týdnů. PBMC byly po 7 dnech inkubace označeny protilátkou PerCP – Cy 5.5 Mouse Anti – Pig CD4a.



### 5.3.4 Stimulované L4 (bílá kůže)

Stimulace lyzátem z bílé kůže nevedla u žádné skupiny prasat ke statisticky významným rozdílům v podílu proliferujících buněk oproti nestimulovaným buňkám.

**Graf 13.** Měření proliferace CD4<sup>+</sup> T lymfocytů stimulovaných lyzátem z bílé kůže



Proliferace CD4<sup>+</sup> T lymfocytů měřená na základě barvení PBMC metodou CFSE po stimulaci lyzátem z bílé kůže u melanomových a bílých prasat ve věku čtyř (T4), devíti (T9) a šestnácti (T16) týdnů. PBMC byly po 7 dnech inkubace označeny protilátkou PerCP – Cy 5.5 Mouse Anti – Pig CD4a.

## 6 Diskuze

V této diplomové práci byla sledována aktivita T lymfocytů u prasat s dědičným melanomem v různém stádiu onemocnění. Práce byla zaměřena na hledání rozdílů, na úrovni proliferace CD4<sup>+</sup> T lymfocytů a produkce vybraných cytokinů T lymfocyty, mezi bílými a černými prasaty MeLiM v průběhu progresu a spontánní regrese nádorů.

Melanomové nádorové buňky mají imunogenní povahu, která u lidí vyvolává specifickou imunitní odpověď (Rosenblatt, 2008). U prasat, dosud nebyla příliš zkoumána specifická imunitní odpověď vůči melanomům, jelikož nejsou zavedeny potřebné metody. Jedním z cílů této práce tudíž bylo zavedení imunologických metod, které by se daly využít pro další studium imunitní odpovědi specifické vůči melanomu. Byly využity metody běžně využívané v infekční imunologii – měření exprese vybraných cytokinů a měření proliferace CD4<sup>+</sup> buněk. Dále bylo odzkoušeno barvení intracelulárního IFN $\gamma$  k detekci antigen specifických buněk.

Ke sledování byly vybrány pomocné CD4<sup>+</sup> T lymfocyty, jelikož k jejich aktivaci postačuje inkubace s antigenním proteinem (Krejsek a Kopecký, 2004). Antigen prezentující buňky v krvi jsou schopny protein internalizovat, zpracovat a následně prezentovat v komplexu s MHC II na povrchu buňky. Antigenní peptidy prezentované v komplexu s MHC II jsou specificky rozpoznávány CD4<sup>+</sup> T lymfocyty. Naproti tomu, by ke sledování CD8<sup>+</sup> T lymfocytů byla zapotřebí prezentace antigenů v komplexu s MHC I. Tímto způsobem jsou prezentovány peptidy pocházející z endogenních proteinů. Proto by ke stimulaci CD8<sup>+</sup> T lymfocytů byla zapotřebí buďto inkubace s živými nádorovými buňkami, které se v současné době nedaří kultivovat, nebo by musela být exprese nádorových antigenů v jiných buňkách vyvolána transfekcí (Kässer et al., 2008). K tomu by bylo potřeba znát specifické prasečí melanomové antigeny, jejichž identifikace by měla být předmětem dalších studií. U lidí, na rozdíl od prasat, je známá celá řada specifických melanomových antigenů, např. MelanA/MART – 1, MAGE – 3, gp100/Pmel 17, tyrozináza (Bioley et al., 2006, Tatsumi et al., 2002, Jäger et al., 2001).

Prasečí melanom je v biochemických, imunohistochemických a molekulárně biologických vlastnostech velmi podobný lidským maligním melanomům (Bourneuf et al., 2011). Nádory se vyskytují u obou pohlaví bez rozdílu (Horák et al., 1999). Mechanismus regrese melanomu není dosud známý. Předběžné výsledky ukazují zvýšené množství proteinů teplotního šoku a následné zvýšení infiltrace tumoru T lymfocyty. Bylo popsáno, že se spontánní regresí spojena infiltrace nádoru imunitními buňkami, jeho postupné vymizení a

nahrazení vazivem (Hruban et al., 2004). U rychle rostoucích nádorů nastává spontánní regrese ve věku tří až čtyř měsíců, u pomalu rostoucích nádorů ve věku pěti až sedmi měsíců. Kompletní spontánní regrese nádoru nastává u 96 % prasat (Vincent – Naulleau et al., 2004). U lidí je kompletní spontánní regrese velice vzácná (Rambow et al., 2008). Díky lidské imunoterapii, jsou známá některá data o vývoji imunitní odpovědi proti melanomu v čase, přesto experimentální protinádorovou vakcinací nedochází k významné regresi a vyléčení nádorů (Russo et al., 2014). Geneticky podmíněná produkce melanomových proteinů je shodná u prasat i lidí, avšak dosud nebylo vyzkoumáno, jestli mají při spontánní regresi význam (Shoot et al., 2015). K tomuto zkoumání, by bylo do budoucna zapotřebí zjistit expresi specifických antigenů v nádorech, například použitím real-time PCR pro detekci na úrovni mRNA, nebo imunohistochemicky na úrovni proteinu. Zjištěný antigení protein bude dále nutno nasyntetizovat nebo použít některé molekulárně – biologické metody, například transfekci buněk pro daný antigen. V případě dostatečné homologie mezi lidským a prasečím proteinem by stálo za to vyzkoušet, jestli lymfocyty melanomových prasat reagují na lidský melanomový antigen.

Jednou z možných metod pro detekci specifické imunitní odpovědi je detekce antigen specifických buněk pomocí intracelulárního barvení cytokinů. K tomuto účelu bylo vybráno značení intracelulárního IFN $\gamma$ , který je hlavním cytokinem Th1 a cytotoxických T lymfocytů (Gerner et al., 2008). Cílem práce bylo zavést metodiku tohoto barvení u prasat, aby jí bylo možno využít v dalších studiích, což se podařilo. Z výsledků je patrný nárůst detekovaných CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> po stimulaci PMA a ionomycinem. Tuto metodu by bylo možné využít pro detekci rozdílů v imunofenotypickém profilu mezi různými věkovými skupinami a mezi melanomovými a zdravými prasaty. Výhodou této metody je, že díky měření na průtokovém cytometru, máme možnost sledovat počty jednotlivých typů buněk.

Pro porovnání aktivity lymfocytů Th1 byla měřena relativní exprese cytokinů IFN $\gamma$  a IL – 2, která byla normalizována house – keeping genem HPRT. IFN $\gamma$  je produkován omezeným spektrem buněk. Jedná se zejména o pomocné T lymfocyty – Th1 po antigení stimulaci a NK buňky. IFN $\gamma$  projevuje důležité protinádorové a imunomodulační účinky. Na antigen prezentujících buňkách zvyšuje expresi MHC II. třídy. Kromě toho inhibuje proliferaci Th2 lymfocytů (Bruin et al., 2013). Stimulace mononukleárních buněk (PBMC), pomocí PMA a ionomycinu, vedla ke zvýšení exprese IFN $\gamma$  oproti nestimulovaným buňkám u všech skupin prasat kromě šestnáctitýdenních melanomových. Tento trend sledujeme téměř u všech vybraných cytokinů. Ve věku čtyř měsíců je u MeLiM prasat plně v běhu spontánní regrese melanomů, u některých je již ukončena (Vincent – Naulleau et al., 2004). Možným

vysvětlením nízké reaktivity lymfocytů na stimulaci je anergie v důsledku vyčerpání imunitního systému. Boon et al. (2006) popisuje anergii jako ztrátu spontánní T buněčné protinádorové imunity, jež může nastat v důsledku ztráty citlivosti na efektorové T lymfocyty nebo ztrátu vnímavosti vůči stimulaci antigenem. Tuto hypotézu by bylo nutné ověřit na dalších prasatech, případně zjistit, jak dlouho tento stav přetrvává. V každém případě by bylo potřeba výsledek potvrdit na větším počtu zvířat.

Srovnáním melanomových a bílých skupin prasat ve věku čtyř a devíti týdnů nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v expresi  $IFN\gamma$ . Statisticky významné rozdíly mezi melanomovými a bílými skupinami bylo možné pozorovat u již zmíněných šestnáctitýdenních prasat. Rodríguez-Carreño et al. (2001) zkoumal expresi  $IFN\gamma$  u zdravých prasat různého věku po stimulaci mononukleárních buněk PMA. Z jeho výsledků vyplývá, že exprese cytokinů vzrůstá od tří měsíců věku dál, což se v mé práci částečně potvrdilo.

Kromě Th1 je IL – 2 po antigenní stimulaci produkován i  $CD8^+$  T lymfocyty a NK buňkami (Yui et al., 2004). Působí autokrinně na T lymfocyty  $CD4^+$ . Dále je důležitým aktivačním podnětem subpopulace tlumivých cytotoxických T lymfocytů a NK buněk (Sim and Radvanyi, 2014). IL – 2 je také druhým signálem aktivujícím a diferencujícím B lymfocyty. Stimulování PBMC vedlo, podobně jako u  $IFN\gamma$ , ke zvýšené expresi u všech čtyřtýdenních a devítitýdenních selat. Na PBMC melanomové šestnáctitýdenní skupiny neměla stimulace vliv. Statisticky významné rozdíly v expresi IL – 2 byly nalezeny pouze mezi šestnáctitýdenními skupinami prasat.

Pro porovnání aktivity Th2 lymfocytů byla využita stimulace exprese cytokinu IL – 4. IL – 4 je velmi dobře popsáný regulátor proliferace a je to cytokin, který ovlivňuje výběr produkce imunoglobulinové třídy v B lymfocytech, potlačuje zánětlivé reakce makrofágů, potlačuje aktivitu NK buněk, pomáhá diferenciaci makrofágů a monocytů na dendritické buňky, stimuluje proliferaci T lymfoblastů a inhibuje produkci Th1 (Ito et al., 2009, Murtaug et al., 2009). Stimulace PBMC vedla ke zvýšené expresi IL – 4, avšak jsou zde pozorovány poměrně značné rozdíly mezi jednotlivými vzorky. Rozdíly mezi melanomovými a bílými prasaty stejného věku nejsou statisticky významné, kromě šestnáctitýdenních skupin.

K porovnání aktivity regulačních T lymfocytů byla použita stimulace exprese cytokinů  $TGF\beta$  a IL – 10.  $TGF\beta$  reguluje adhezi buněk, expresi tkáňových metaloproteináz a tkáňových inhibitorů proteolytických enzymů. Podílí se na regulaci obnovy poškozených tkání. Uplatňuje se v inhibici proliferační aktivity T a B lymfocytů. Protizánětlivé cytokiny  $TGF\beta$  a IL – 10 jsou produkovány pomocnými T lymfocyty, které se vyčleňují do podjednotky Tr. Tato podjednotka účinně tlumí nežádoucí aktivitu Th1 (Eickelberg, 2001).

Dysfunkce v signalizaci TGF $\beta$  hrají hlavní roli u různých druhů rakoviny, například melanomu (Hsu et al., 2005). Pravděpodobně vlivem technického selhání nefungovala exprese TGF $\beta$  úplně ideálně. Z výsledků nejsou patrné nijak významné nárůsty hladin cytokinů po stimulaci. Skupina devíti a šestnáctitýdenních melanomových prasat vykazovala statisticky významnou vyšší expresi než čtyřtýdenní melanomová prasata.

IL – 10 je po antigenní stimulaci produkován podjednotkami Th3, které produkují i TGF $\beta$ . Působí hlavně proti Th1 podjednotce a obecně jsou jimi produkovány protizánětlivé cytokiny (Mocellin et al., 2003). I u těchto cytokinů je možné pozorovat velkou variabilitu v jedné skupině. Zvýšená exprese po stimulaci PBMC je pozorována pouze u bílých šestnáctitýdenních prasat. Statisticky významné rozdíly v rámci věkových skupin se nacházejí u devíti a šestnáctitýdenních prasat. Skupina devíti a šestnáctitýdenních melanomových prasat vykazovala statisticky významnou vyšší expresi než čtyřtýdenní melanomová prasata.

Poslední porovnávanou skupinou byly prozánětlivé cytokiny IL – 6 a IL – 8. IL – 6 je produkován zejména T a B lymfocyty, ale mohou ho produkovat i ostatní jaderné buňky. Funguje jako regulátor proliferace a diferenciaci B lymfocytů a syntézy protilátek. Zajišťuje také aktivaci T lymfocytů, diferenciaci a regulaci fenotypu Th2. Prostřednictvím tohoto cytokinu dochází v hepatocytech ke zvýšené tvorbě bílkovin akutní fáze (Kishimoto, 2010). Kromě černých šestnáctitýdenních prasat měla stimulace PBMC jen mírný vliv na zvýšenou expresi cytokinů. Statisticky významný rozdíl v expresi IL – 6 se nachází u šestnáctitýdenních skupin prasat. Skupina devíti a šestnáctitýdenních melanomových prasat vykazovala statisticky významnou vyšší expresi než čtyřtýdenní melanomová prasata.

IL – 8 je chemokinový chemoatraktant a aktivátor granulocytů, zesiluje jejich metabolické vzplanutí a degranulaci (Das et al., 2010). Stimulace PBMC neměla vliv na expresi daného cytokinu. Vzhledem k několikanásobně snížené expresi u stimulovaných bílých devítitýdenních prasat je možné, že byly zaměněny stimulované buňky za nestimulované. Srovnáním devíti a šestnáctitýdenních skupin prasat byly zjištěny statisticky významné rozdíly.

Další metodou bylo měření proliferace CD4<sup>+</sup> lymfocytů. K monitorování imunitní odpovědi bylo použito intracelulární značení fluorescenčním barvivem CFSE. Bylo zjištěno, že CFSE je mimořádně účinné při monitoringu proliferace buněk v různých experimentech. Toto barvivo bylo původně vyrobeno pro sledování lymfocytů *in vivo* po mnoho měsíců, má tedy minimální destruktivní účinky na životnost a funkce buněk. Proliferace lymfocytů může být měřena pomocí průtokového cytometru obvykle až do osminásobného dělení. Poté je fluorescence příliš nízká a buňky jsou neodlišitelné od neobarvených (Quah et al., 2007).

Morgan et al. (1996) mimo jiné porovnával obsah CD4<sup>+</sup> lymfocytů u melanomových prasat Sinclair, u kterých se buďto vyskytovaly nebo nevyskytovaly melanomy. Do pokusu byla vybrána prasata různého stáří a pohlaví a buňky byly po označení FITC měřeny na průtokovém cytometru. V Morganově pokusu nebyl statisticky významný rozdíl mezi prasaty s melanomem nebo bez něj.

V našem pokusu byly buňky nejprve označeny CFSE, poté protilátkou PerCP – Cy 5.5 Mouse Anti – Pig CD4a a stimulovány Concanavalinem A (ConA). ConA je mitogen, aktivující buněčnou proliferaci přednostně u T lymfocytů (Krauss et al., 1999). CD4<sup>+</sup> stimulované buňky u černých devíti a šestnáctitýdenních prasat vykazovaly vyšší proliferaci než buňky čtyřtýdenních prasat. Statisticky významný, je rozdíl mezi bílými a černými devítitýdenními prasaty.

Dalším stimulantem byl lyzát z prasečího melanomu. Nevýhodou tohoto lyzátu je, že obsahuje různé neznámé antigeny. Bylo by potřeba zaměřit se na sledování imunitní odpovědi vůči konkrétním antigenům, tj. identifikovat je a izolovat. Nejvyšší proliferaci po stimulaci vykazovala černá devítitýdenní prasata, což koreluje s počátkem spontánní regrese nádorů. U černých šestnáctitýdenních se proliferace antigen-specifických buněk snižuje. Tento proliferační pokles koreluje s většinou výsledků z detekce exprese cytokinů. Bylo by proto nutné pokus zopakovat, aby se zjistila příčina tohoto poklesu. Možným vysvětlením je vyčerpání imunitního systému, nebo přesun antigen-specifických buněk z krve do regredujících nádorů. Kromě sledování imunitních odpovědí v periferní krvi by proto bylo zajímavé v dalších studiích sledovat stejné parametry i v nádorové tkáni, nebo v lymfocytech izolovaných z nádorů.

K poslednímu stimulantu PBMC patřil nádorový lyzát ze zdravé bílé kůže. Přidání této látky nemělo takřka žádný vliv na spuštění imunitní reakce, a tudíž nenastaly žádné statisticky významné rozdíly v proliferaci CD4<sup>+</sup> T lymfocytů.

Závěrem je nutné zmínit, že tato práce je pouze malá studie na malém počtu zvířat. Výsledky by bylo zapotřebí ověřit na dalších zvířatech, případně přidat další věkové skupiny, aby bylo možné zjistit, kdy přesně dochází ke snížení produkce cytokinů a proliferační aktivity. Případně, jak dlouho toto snížení přetrvává. Dále je zapotřebí zdůraznit, že výskyt T lymfocytů přímo v melanomech může být značně odlišný od periferní krve, například u melanomového prasete Sinclair se v melanomu nachází o pětinu méně CD4<sup>+</sup> T lymfocytů než v periferní krvi (Morgan et al., 1996). Metody intracelulárního barvení cytokinů a měření proliferace specifických T lymfocytů jsou nyní připraveny pro užití v experimentální praxi.

U metody měření exprese cytokinů nebyla dostatečně prokázána její vhodnost k využití v praxi, bylo by zapotřebí dále tuto metodu optimalizovat.

## 7 Závěr

Výsledky ověřily principiální vhodnost použitých metod ve výzkumu specifické imunitní odpovědi vůči prasečímu nádoru. Výhodou použitých metod je relativně snadná dostupnost potřebných reagensů na trhu, které jsou ovšem poměrně nákladné. Velmi nákladné jsou také přístroje používané k vyhodnocování. K širšímu využití v praxi bude nutná další optimalizace, zejména v metodě měření exprese cytokinů.

Byla vyzkoušena metoda intracelulárního barvení cytokinů u prasat. Tato metoda se jeví jako velmi vhodná pro sledování specifické imunitní odpovědi a je připravena k zavedení do praxe. Mohla by být například využita při detekci specifických nádorových antigenů.

K porovnání rozdílů přítomných T lymfocytárních buněk v periferní krvi mezi melanomovými a zdravými prasaty různého stáří, byla sledována exprese vybraných cytokinů. Z výsledků vyplývá, že na rozdíl od devítitýdenních prasat, nejstarší prasata na stimulaci nereagovala, anebo reagovala méně, než mladší a bílá. Metodou real – time PCR nebyly detekovány očekávané rozdíly v expresi jednotlivých cytokinů v krevních lymfocytech, lepších výsledků by se mohlo dosáhnout při měření exprese přímo z nádorové tkáně.

Z důvodu, že nejsou známy specifické prasečí nádorové antigeny, byly buňky pro měření proliferace  $CD4^+$  lymfocytů stimulovány nádorovým lyzátem. Touto stimulací byly objeveny rozdíly v proliferaci buněk ve fázi spontánní regrese nádorů. Snížená proliferace  $CD4^+$  lymfocytů u šestnáctitýdenních prasat koreluje s výsledky v měření exprese cytokinů. Tato metoda bez problémů fungovala a je vhodná pro využití v dalších experimentech.

Vzhledem k tomu, že u nejstarších prasat došlo k poklesu proliferace a exprese cytokinů, byla hypotéza potvrzena jen částečně. Výsledky by bylo dobré ověřit v dalších experimentech. Zajištění dat o rozvoji imunitní odpovědi v čase, by mohlo pomoci při objasňování mechanismu spontánní regrese u prasat a k dalšímu využití v protinádorové léčbě u lidí.



## 8 Seznam literatury

Abbas, A. K., Janeway, C. A. 2000. Immunology: Improving on Nature in the Twenty – First Century. *Cell*. 100 (1): 129 – 138.

Adam, J. K., Odhav, B., Bhoola, K. D. 2003. Immune responses in cancer. *Pharmacology & therapeutics*. 99 (1): 113 – 132.

Adams, J. J., Narayanan, S., Liu, B., Birnbaum, M. E., Kruse, A. C., Bowerman, N. A., Chen, W., Levin, A. M., Connolly, J. M., Zhu, C., Kranz, D. M., Garcia, K. C. 2011. T cell receptor signaling is limited by docking geometry to peptide – major histocompatibility complex. *Immunity*. 35 (5): 681 – 693.

Assarsson, E., Kambayashi, T., Schatzle, J. J., Crame, S. O., von Bonin, A. Jensen, P. E., Ljunggren, H. G., Chambers, B. J. 2004. NK Cells Stimulate Proliferation of T and NK Cells through 2B4/CD48 Interactions. *Journal of Immunology*. 173 (1): 174 – 180.

Barakat, B., Itman, C., Mendis, S. H., Loveland, K. L. 2012. Activins and inhibins in mammalian testis development: New models, new insights. *Molecular and cellular endocrinology*. 359 (1): 66-77.

Bardeesy, N., Wong, K. K., DePinho, R. A., Chin, L. 2000. Animal models of melanoma: recent advances and future prospects. *Advances in cancer research*. 79: 123 – 156.

Barman, N. N., Bianchi, A. T. J., Zwart, R. J., Pabst, R., Rothkötter, H. J. 1996. Jejunal and ileal Peyer's patches in pigs differ in their postnatal development. *Anatomy and embryology*. 195 (1): 41 – 50.

Bárta, O., Codner, E. C., Pickett, J. P., Shell, L. G. 2008. Veterinární klinická imunologie – imunitní choroby domácích zvířat. CERM Akademické nakladatelství. Praha. s. 324. ISBN: 978-80-7204-553-2.

- Bartkova, J., Hořejší, Z., Koed, K., Krämer, A., Tort, F., Zieger, K., Guldborg, P., Sehested, M., Nesland, J. M., Lukas, C., Ørntoft, T., Bartek, J. 2005. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature*. 434 (7035): 864 – 870.
- Beschin, A., Bilej, M., Torreale, E., De Baetselier, P. 2001. On the existence of cytokines in invertebrates. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 58 (5-6): 801 – 814.
- Bi, Y., Guangwei, L., Yang, R. 2007. Th17 cell induction and immune regulatory effects. *Journal of Cellular Physiology*. 211 (2): 273 – 278.
- Bienvenu, J., Monneret, G., Fabien, N., Revillard, J. P. 2000. The clinical usefulness of the measurement of cytokines. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 38 (4): 267 – 285.
- Binns, R. M., Pabst, R. 1994. Lymphoid tissue structure and lymphocyte trafficking in the pig. *Veterinary immunology and immunopathology*. 43 (1): 79 – 87.
- Bioley, G., Jandus, C., Tuyaeerts, S., Rimoldi, D., Kwok, W. W., Speiser, D. E., Tiercy, J. – M., Thielemans, K., Cerottini, J. – C., Romero, P. 2006. Melan-A/MART-1-specific CD4 T cells in melanoma patients: identification of new epitopes and ex vivo visualization of specific T cells by MHC class II tetramers. *The Journal of Immunology*. 177 (10): 6769 – 6779.
- Blumberg, R., Neurath, M. F (eds.). 2006. Immune mechanisms in inflammatory bowel disease. Springer Science & Business Media. New York. p. 243. ISBN: 0-387-30831-8.
- Boismenu, R., Havran, W. L. 1998.  $\gamma\delta$  T Cells in Host Defense and epithelial Cell Biology. *Clinical Immunology and Immunopathology*. 86 (2): 121 – 133.
- Boon, T., Coulie, P. G., van den Eynde, B. J., van der Bruggen, P. 2006. Human T cell responses against melanoma. *Annual Review of Immunology*. 24: 175 – 208.
- Born, W. K., Reardon, C. L., O'Brien, R. L. 2006. The function of  $\gamma\delta$  T cells in innate immunity. *Current Opinion in Immunology*. 18 (1): 31 – 38.

- Bourneuf, E., Du, Z. Q., Estellé, J., Gilbert, H., Créchet, F., Piton, G., Milan, D., Geffrotin, C., Lathrop, M., Demenais, F., Rogel – Gaillard, C., Vincent-Naulleau, S. 2011. Genetic and functional evaluation of MITF as a candidate gene for cutaneous melanoma predisposition in pigs. *Mammalian Genome*. 22 (9-10): 602 – 612.
- Brooks, C. L., Gu, W. 2011. p53 regulation by ubiquitin. *FEBS letters*. 585 (18): 2803 – 2809.
- Castellino, F., Huang, A. Y., Altan-Bonnet, G., Stoll, S., Scheinecker, C., Germain, R. N. 2006. Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8<sup>+</sup> T cells to sites of CD4<sup>+</sup> T cell – dendritic cell interaction. *Nature*. 440 (7086): 890 – 895.
- Coico, R., Sunshine, G. 2009. *Immunology: A short course*. Wiley – Blackwell. New Jersey. p. 392. ISBN: 978-0-470-08158-7.
- Collado, M., Serrano, M. 2010. Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nature Reviews Cancer*. 10 (1): 51-57.
- Cresswell, P., Lanzavecchia, A. 2001. Antigen processing and recognition. *Current Opinion in Immunology*. 13 (1): 11 – 12.
- Curtin, J. A., Fridlyand, J., Kageshita, T., Patel, H. N., Busam, K. J., Kutzner, H., Cho, K. – H., Aiba, S., Bröcker, E. – B., LeBoit, P. E., Pinkel, D., Bastian, B. C. 2005. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *New England Journal of Medicine*. 353 (20): 2135 – 2147.
- Das, S. T., Rajagopalan, L., Guerrero – Plata, A., Sai, J., Richmond, A., Garofalo, R. P., Rajarathnam, K. 2010. Monomeric and dimeric CXCL8 are both essential for in vivo neutrophil recruitment. *PLoS One*. 5 (7).
- Davis, M. M. 2002. A New Trigger for T Cells. *Cell*. 110 (3): 285 – 287.
- de Bruin, A. M., Demirel, Ö., Hooibrink, B., Brandts, C. H., Nolte, M. A. 2013. Interferon –  $\gamma$  impairs proliferation of hematopoietic stem cells in mice. *Blood*. 121 (18): 3578 – 3585.
- de la Rosa, M., Rutz, S., Dorningen, H., Scheffold, A. 2004. Interleukin-2 is essential for CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cell function. *European Journal of Immunology*. 34: 2480 – 2488.

Deauvieux, F., Ollion, V., Doffin, A. C., Achard, C., Fonteneau, J. F., Verronese, E., Durand, I., Ghittoni, R., Marvel, J., Dezutter – Dambuyant, C., Walzer, T., Vie, H., Perrot, I., Goutagny, N., Caux, C., Valladeau–Guilemond, J. 2015. Human natural killer cells promote cross–presentation of tumor cell – derived antigens by dendritic cells. *International Journal of Cancer*. 136 (5): 1085 – 1094.

Deng, L., Langley, R. J., Wang, Q., Topalian, S. L., Mariuzza, R. A. 2012. Structural insights into the editing of germ-line–encoded interactions between T-cell receptor and MHC class II by V $\alpha$  CDR3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109 (37): 14960 – 14965.

Dinarello, C. A. 2000. Proinflammatory cytokines. *Chest Journal*. 118 (2): 503 – 508.

Dinarello, C. A. 2007. Historical insights into cytokines. *European journal of immunology*. 37 (S1): 34 – 45.

Dolivet, G., Merlin, J. L., Barberi-Heyob, M., Ramacci, C., Erbacher, P., Parache, R. M., Guillemin, F. 2002. In vivo growth inhibitory effect of iterative wild – type p53 gene transfer in human head and neck carcinoma xenografts using glucosylated polyethylenimine nonviral vector. *Cancer gene therapy*. 9 (8): 708 – 714.

Dranoff, G. 2003. Coordinated tumor immunity. *Journal of Clinical Investigation*. 111 (8): 1116 – 1118.

Du, Z. – Q., Vincent – Naulleau, S., Gilbert. H., Florence, Vignoles, F., Créchet, F., Shimogiri, T., Yasue, H., Leplat J. – J., Bouet, S., Gruand, J., Horák, V., Milan, D., Le Roy, P., Claudine, G. 2007. Detection of novel quantitative trait loci for cutaneous melanoma by genome – wide scan in the MeLiM swine model. *International journal of cancer*. 120 (2): 303 – 320.

Eickelberg, O. 2001. Endless healing: TGF –  $\beta$ , SMADs, and fibrosis. *FEBS Letters*. 506 (1): 11 – 14.

Farrar, J. D., Asnagli, H., Murphy, K. M. 2002. T helper subset development: roles of instruction, selection, and transcription. *The Journal of Clinical Investigation*. 109 (4): 431 – 435.

Feng, D., Bond, C. J., Ely, L. K., Maynard, J., Garcia, K. C. 2007. Structural evidence for a germline – encoded T cell receptor – major histocompatibility complex interaction ‘codon’. *Nature Immunology*. 8 (9): 975 – 983.

Fernández-Grijalva, A. L., Aguilar-Lemarroy, A., Jave-Suarez, L. F., Gutiérrez-Ortega, A., Godinez-Melgoza, P. A., Herrera-Rodríguez, S. E., Mariscal – Ramírez, I., Martínez – Velázquez, M., Gawinowicz, M. A., Martínez – Silva, M. G., Cruz – Ramos, J. A., Hernández-Gutiérrez, R. 2015. Alpha 2HS-glycoprotein, a tumor-associated antigen (TAA) detected in Mexican patients with early-stage breast cancer. *Journal of proteomics*. 112 (1): 301 – 312.

Fikrle, T., Pizinger, K. 2010. Maligní melanom. *Onkologie*. 4 (4). 225 – 228.

Fleury, C., Bérard, F., Balme, B., Thomas, L. 2000. The Study of Cutaneous Melanomas in Camargue – Type Gray – Skinned Horses (1): Clinical – Pathological Characterization. *Pigment Cell Research*. 13 (1): 39 – 46.

Fortýn, K., Hruban, V., Horák, V., Hradecký, J., Tichý, J. 1998. Exceptional occurrence and extent of malignant melanoma in pig. *Veterinární medicína* 3. 87 – 91.

Frasca, L., Nasso, M., Spensieri, F., Fedele, G., Palazzo, R., Malavasi, F., Ausiello, C. M. 2008. IFN- $\gamma$  arms human dendritic cells to perform multiple effector functions. *The Journal of Immunology*. 180 (3): 1471 – 1481.

Garcia, K. C. 2012. Reconciling views on T cell receptor germline bias for MHC. *Trends in Immunology*. 33 (9): 429 – 436.

Geffrotin, C., Crechet, F., Le Roy, P., Le Chalony, C., Leplat, J. J., Iannuccelli, N., Barbosa, A., Renard, C., Gruand, J., Milan, D., Horak, V., Tricaud, Y., Bouet, S., Franck, M., Frelat, G., Vincent-Naulleau, S. 2004. Identification of five chromosomal regions involved in

predisposition to melanoma by genome – wide scan in the MeLiM swine model. *International journal of cancer*. 110 (1): 39 – 50.

Gerner, W., Käser, T., Pintarič, M., Groß, S., Saalmüller, A. 2008. Detection of intracellular antigens in porcine PBMC by flow cytometry: A comparison of fixation and permeabilisation reagents. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 121 (3 – 4): 251 – 259.

Gerner, W., Käser, T., Saalmüller, A. 2009. Porcine T lymphocytes and NK cells – An update. *Development and Comparative Immunology*. 33 (3): 310 – 320.

Giraldi, M. Immunosurveillance and Immunoregulation by  $\gamma\delta$  T Cells. *Journal of Investigative Dermatology*. 2006. 126: 25-31.

Gupta, S. 2002. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis in T cells from aged humans: a role of TNFR – I and downstream signaling molecules. *Experimental gerontology*. 37 (2): 293 – 299.

Hare, D., Mossman, K. L. 2013. Novel paradigms of innate immune sensing of viral infections. *Cytokine*. 63 (3): 219 – 224.

Heath, W. R., Carbone, F. R. 2009). Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces. *Nature immunology*. 10 (12): 1237 – 1244.

Hill, J. A., Feuerer, M., Tash, K., Haxhinasto, S., Perez, J., Melamed, R., Mathis, D., Benoist, C. 2007. Foxp3 transcription-factor-dependent and –independent regulation of theregulatory T cell transcriptional signature. *Immunity*. 27: 786 – 800.

Hill, N., Sarvetnick, N. 2002. Cytokines: promoters and dampeners of autoimmunity. *Current opinion in immunology*. 14 (6): 791 – 797.

Horák, V., Fortýn, K., Hruban, V., Klauďy, J. 1999. Hereditary melanoblastoma in miniature pigs and its successful therapy by devitalization technice. *Cellular and Molecular Biology*. 45 (7): 1119 – 1129.

- Hruban, V., Horák, V., Fortýn, K., Hradecký, J., Klaudy, J., Smith, D. M., Reisnerová, H., Majzlík, I. 2004. Inheritance of malignant melanoma in the MeLiM strain of miniature pigs. *Veterinary Medicine*. 12: 453 – 459.
- Hsu, M. Y., Rovinsky, S., Penmatcha, S., Herlyn, M., Muirhead, D. 2005. Bone morphogenetic proteins in melanoma: angel or devil?. *Cancer and Metastasis Reviews*. 24 (2). 251 – 263.
- Chareerntanakul, W., Roth, J. A. 2007. Biology of porcine T lymphocytes. *Animal Health Research Reviews*. 7 (1/2): 81 – 86.
- Chen, Z., Herman, A. E., Matos, M., Mathis, D., Benoist, C. 2005. Where CD4+ CD25+ T reg cells impinge on autoimmune diabetes. *The Journal of Experimental Medicine*. 202(10): 1387 – 1397.
- Chial, H. 2008. Proto-oncogenes to oncogenes to cancer. *Nature Education*. 1 (1): 33.
- Chu, J., Deng, Y., Benson, D. M., He, S., Hughes, T., Zhang, J., Caligiuri, M. A., Hofmeister, C. C., Yu, J. 2013. CS1 – specific chimeric antigen receptor (CAR) – engineered natural killer cells enhance in vitro and in vivo antitumor activity against human multiple myeloma. *Leukemia*. 28 (4): 917 – 927.
- Ihle, J. N., Kerr, I. M. 1995. Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends in Genetics*. 11 (2): 69 – 74.
- Ito, T., Suzuki, S., Kanaji, S., Shiraishi, H., Ohta, S., Arima, K., Tanaka, G., Tamada, T., Honjo, E., Garcia, K. C., Kuroki, R., Izuhara, K. 2009. Distinct structural requirements for interleukin – 4 (IL – 4) and IL – 13 binding to the shared IL – 13 receptor facilitate cellular tuning of cytokine responsiveness. *Journal of Biological Chemistry*. 284 (36): 24289 – 24296.
- Jäger, D., Jäger, E., Knuth, A. 2001. Immune responses to tumour antigens: implications for antigen specific immunotherapy of cancer. *Journal of clinical pathology*. 54 (9): 669 – 674.
- Jílek, P. 2002. *Základy imunologie*. ANYWAY. Praha. s. 76. ISBN: 80-238-8594-4.

- Kabelitz, D., Wesch, D., Hinz, T. 1999.  $\gamma\delta$  T cells, their T cell receptor usage and role in human diseases. *Springer Seminars in Immunopathology*. 21 (1): 55 – 76.
- Kässer, T., Gerner, W., Hammer, S. E., Patzl, M., Saalmüller, A. 2008. Detection of Foxp3 protein expression on porcine T lymphocytes. *Veterinary immunology and immunopathology*. 125: 92 – 101.
- Kishimoto, T. 2010. IL – 6: from its discovery to clinical applications. *International immunology*. 22: 347 – 352.
- Koebel, C. M., Vermi, W., Swann, J. B., Zerafa, N., Rodig, S. J., Old, L. J., Smyth, M. J., Schreiber, R. D. 2007. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature*. 450 (7171): 903 – 907.
- Krauss, S., Buttgereit, F., Brand, M. D. 1999. Effects of the mitogen concanavalin A on pathways of thymocyte energy metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*. 1412 (2). 129 – 138.
- Krejsek, J., Kopecký, O. 2004. *Klinická imunologie*. NUCLEUS HK. Pardubice. s. 968. ISBN: 80-86225-50-X.
- Kretschmer, K., Apostolou, I., Jaeckel, E., Khazaie, K., von Boehmer, H. 2006. Making regulatory T cells with defined antigen specificity: role in autoimmunity and cancer. *Immunological Reviews*. 212: 163 – 169.
- Lanier, L. L. 2005. NK cell recognition. *Annual Review of Immunology*. 23: 225 – 274.
- Lanzavecchia, A., Iezzi, G., Viola, A. 1999. From TCR engagement to T cell activation: a kinetic view of T cell behavior. *Cell*. 96: 1 – 4.
- Lavini, C., Moran, C. A., Morandi, U., Schoenhuber, R. 2008. *Thymus Gland Pathology: Clinical, Diagnostic and Therapeutic features*. Springer. p. 273. ISBN: 978-88-470-0827-4.



- Lee, J. H., Wang, C., Kim, C. H. 2009. FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells restrain splenic extramedullary myelopoiesis via suppression of hemopoietic cytokine – producing T cells. *The Journal of Immunology*. 183 (10): 6377 – 6386.
- Lefkowitz, D. L., Lefkowitz, S. S. 2001. Macrophage–neutrophil interaction: a paradigm for chronic inflammation revisited. *Immunology and cell biology*. 79 (5): 502 – 506.
- Lüllmann–Rauch, L. 2012. *Histologie*. Grada Publishing. Praha. s.576. ISBN: 978-80-247-3729-4.
- Lunney, J. K., Ho, C. S., Wysocki, M., Smith, D. M. 2009. Molecular genetics of the swine major histocompatibility complex, the SLA complex. *Developmental & Comparative Immunology*. 33 (3): 362 – 374.
- MacEwan, D. J. 2002. TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cellular signaling*. 14 (6): 477 – 492.
- Massagué, J., Blain, S. W., Lo, R. S. 2000. TGF $\beta$  signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell*. 103 (2): 295 – 309.
- Medzhitov, R., Janeway, C. A. 2002. Decoding the Patterns of Self and Nonself by the Innate Immune System. *Science*. 296 (5566): 298 – 300.
- Mingueneau, M., Kreslavsky, T., Gray, D., Heng, T., Cruse, R., Ericson, J., Bendall, S., Spitzer, M. H., Nolan, G. P., Kobayashi, K., von Boehmer, H., Mathis, D., Benoist, C. 2013. The transcriptional landscape of  $\alpha\beta$  T cell differentiation. *Nature Immunology*. 14: 619 – 632.
- Mironova, K. E., Chernykh, O. N., Ryabova, A. V., Stremovskiy, O. A., Proshkina, G. M., Deyev, S. M. 2014. Highly specific hybrid protein DARPIn-mCherry for fluorescent visualization of cells overexpressing tumor marker HER2/neu. *Biochemistry*. 79 (12): 1391 – 1396.
- Mocellin, S., Panelli, M. C., Wang, E., Nagorsen, D., Marincola, F. M. 2003. The dual role of IL – 10. *Trends in immunology*. 24 (1): 36 – 43.

Morgan, C. D., Measel, J. W., Amoss, M. S., Rao, A., Greene, J. F. 1996. Immunophenotypic characterization of tumor infiltrating lymphocytes and peripheral blood lymphocytes isolated from melanomatous and non – melanomatous Sinclair miniature swine. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 55: 189 – 203.

Moser, B., Wolf, M., Walz, A., Loetscher, P. 2004. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control☆. *Trends in immunology*. 25 (2): 75 – 84.

Müller, S., Wanke, R., Distl, O. 2001. Inheritance of melanocytic lesions and their association with the white colour phenotype in miniature swine. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 118 (4): 275 – 283.

Murphy, P. M., Baggiolini, M., Charo, I. F., Hébert, C. A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L. H., Oppenheim, J. J., Power, C. A. 2000. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacological reviews*. 52 (1): 145 – 176.

Murtaugh, M. P., Johnson, C. R., Xiao, Z., Scamurra, R. W., Zhou, Y. 2009. Species specialization in cytokine biology: Is interleukin-4 central to the TH1–TH2 paradigm in swine?. *Developmental and Comparative Immunology*. 33: 344 – 352.

Nazzal, D., Gradolatto, A., Truffault, F., Bismuth, J., Berrih-Aknin, S. 2014. Human thymus medullary epithelial cells promote regulatory T-cell generation by stimulating interleukin-2 production via ICOS ligand. *Cell Death and Disease*. 5.

Nomiyama, H., Osada, N., Yoshie, O. 2013. Systematic classification of vertebrate chemokines based on conserved synteny and evolutionary history. *Genes to Cells*. 18 (1): 1 – 16.

Ogata, K., Aihara, R., Mochiki, E., Ogawa, A., Yanai, M., Toyomasu, Y., Ando, H., Ohno, T., Asao, T., Kuwano, H. 2011. Clinical significance of melanoma antigen-encoding gene-1 (MAGE-1) expression and its correlation with poor prognosis in differentiated advanced gastric cancer. *Annals of surgical oncology*. 18 (4): 1195 – 1203.

- Opalka, B., Dickopp, A., Kirch, H. C. 2001. Apoptotic genes in cancer therapy. *Cells, tissues, organs*. 172 (2): 126 – 132.
- Penka, M., Tesařová, E., Blatný, J., Bourková, L., Buliková, A., Čech, Z., Jelínková, M., Kissová, J., Kořístek, Z., Kovářová, L., Kuglík, P., Matýšková, M., Novotný, J., Pospíšilová, Š., Slánská, M., Smejkal, P., Trnavská, I., Zapletal, O., Zavřelová, J. 2011. *Hematologie a transfuzní lékařství I*. Grada Publishing. Praha. s. 488. ISBN: 978-80-247-3459-0.
- Piriou – Guzylack, L., Salmon, H. 2008. Membrane markers of the immune cells in swine: an update. *Veterinary research*. 39 (6).
- Povýšil, C., Šteiner, I., Ciprová, V., Dušek, J., Dušková, J., Dvořák, K., Feit, J., Honsová, E., Kodet, R., Kolář, Z., Ludvíková, M., Lukáš, Z., Mačák, J., Mandys, V., Pastrňák, A., Povýšilová, V., Ryška, A., Stříteský, J., Tichý, M. 2007. *Speciální patologie*. Galén. Praha. s. 430. ISBN: 978-80-7262-494-2.
- Quah, B. J. C., Warren, H. S., Parish, C. R. 2007. Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nature Protocols*. 2 (9): 2049 – 2056.
- Rambow, F., Piton, G., Bouet, S., Leplat, J. J., Baulande, S., Marrau, A., Stam, M., Horák, V., Vincent-Naulleau, S. 2008. Gene expression signature for spontaneous cancer regression in melanoma pigs. *Neoplasia*. 10 (7): 714 – 726.
- Raulet, D. H., Melchers, F. 2001. Lymphocyte development. *Current Opinion in Immunology*. 13: 163 – 165.
- Reihner, E., Brismar, B. 1995. Management of splenic trauma-changing concepts. *European Journal of Emergency Medicine*. 2 (1): 47 – 51.
- Rieger, M. A., Schroeder, T. 2012. Hematopoiesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 4 (12): 1 – 17.

- Robb, R. J., Hill, G. R. 2012. The interferon-dependent orchestration of innate and adaptive immunity after transplantation. *Blood*. 119 (23): 5351 – 5358.
- Rodríguez-Carreño, M. P., López-Fuertes, L., Revilla, C., Ezquerro, A., Alonso, F., Domínguez, J. 2002. Phenotypic characterization of porcine IFN- $\gamma$ -producing lymphocytes by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*. 259: 171 – 179.
- Roels, S., Tilmant, K., Ducatelle, R. 1999. PCNA and Ki67 proliferation markers as criteria for prediction of clinical behaviour of melanocytic tumours in cats and dogs. *Journal of comparative pathology*. 121 (1): 13 – 24.
- Romagnani, P., Annunziato, F., Piccinni, M. P., Maggi, E., Romagnani, S. 2000. Cytokines and chemokines in T lymphopoiesis and T-cell effector function. *Immunology Today*. 21 (9): 416 – 418.
- Rosenblatt, J., Avigan, D. 2008. Cellular immunotherapy for multiple myeloma. *Best Practise and Research Clinical Haematology*. 21 (3): 559 – 577.
- Rosser, E. C., Blair, P. A., Mauri, C. 2014. Cellular targets of regulatory B cell – mediated suppression. *Molecular Immunology*. 62 (2): 296 – 304.
- Rothkötter, H. J. 2009. Anatomical particularities of the porcine immune system – a physician's view. *Developmental & Comparative Immunology*. 33 (3): 267 – 272.
- Rothkötter, H. J., Mollhoff, S., Pabst, R. 1999. The influence of age and breeding conditions on the number and proliferation of intraepithelial lymphocytes in pigs. *Scandinavian journal of immunology* 50 (1): 31 – 38.
- Rovenský, J., Bayer, M., Tauchmannová, H., Ferenčík, M. 2006. *Revmatologický výkladový slovník*. Grada Publishnig. Praha. s. 276. ISBN: 80-247-1614-3.
- Rubtsov, Y. P., Rasmussen, J. P., Chi, E. Y., Fontenot, J., Castelli, L., Ye X., Treuting, P., Siewe, L., Roers, A., Henderson, W. R. Jr., Muller, W., Rudensky, A. Y. 2008. Regulatory T

cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity*. 28: 546 – 558.

Rudolph, M. G., Stanfield, R. L., Wilson, I. A. 2006. How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annual Review of Immunology*. 24: 419 – 466.

Russo, A., Ficili, B., Candido, S., Pezzino, F. M., Guarneri, C., Biondi, A., Travali, S., McCubrey, J., Spandidos, D. A., Libra, M. 2014. Emerging targeted therapies for melanoma treatment. *International Journal of Oncology*. 45 (2): 516 – 524.

Santarasci, V., Cosmi, L., Maggi, L., Liotta, F., Annunziato, F. 2013. IL – 1 and T helper immune responses. *Frontiers in immunology*. 4 (182): 1 – 7.

Seliger, B., Cabrera, T., Garrido, F., Ferrone, S. 200. HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells. *Seminars in cancer biology*. 12 (1): 3 – 13.

Sherr, C. J. 2000. Cell cycle control and cancer. *Harvey lectures*. 96: 73 – 92.

Schenk, T., Irth, H., Marko – Varga, G., Edholm, L-E., Tjaden, U. R., van der Greef, J. 2001. Potential of on – line micro – LC immunochemical detection in the bioanalysis of cytokines. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 26 (5 – 6): 975 – 985.

Schmaltz, C., Hardenbergh, P. H., Wells, A., Fisher, D. E. 1998. Regulation of proliferation-survival decisions during tumor cell hypoxia. *Molecular and cellular biology*. 18 (5): 2845 – 2854.

Schmitz, M. L., Weber, A., Roxlau, T., Gaestel, M., Kracht, M. 2011. Signal integration, crosstalk mechanisms and networks in the function of inflammatory cytokines. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research*. 1813 (12): 2165 – 2175.

Schook, L. B., Collares, T. V., Darfour-Oduro, K. A., De, A. K., Rund, L. A., Schachtschneider, K. M., Seixas, F. K. 2015. Unraveling the Swine Genome: Implications for Human Health. *Annual Review of Animal Biosciences*. 3: 219 – 244.

Sim, G. C., Radvanyi, L. 2014. The IL-2 cytokine family in cancer immunotherapy. *Cytokine & growth factor reviews*. 25 (4): 377 – 390.

Sinkora, J., Rehakova, Z., Sinkora, M., Cukrowska, B., Tlaskalova – Hogenova, H. 2002. Early development of immune system in pigs. *Veterinary immunology and immunopathology*. 87 (3): 301 – 306.

Smyth, M. J., Dunn, G. P., Schreiber, R. D. 2006. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Advances in immunology*. 90: 1 – 50.

Solano – Aguilar, G. I., Vengroski, K. G., Beshah, E., Lunney, J. K. 2000. Isolation and purification of lymphocyte subsets from gut-associated lymphoid tissue in neonatal swine. *Journal of immunological methods*. 241 (1): 185 – 199.

Stetler – Stevenson, W. G. 1999. Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *Journal of Clinical Investigation*. 103 (9): 1237 – 1241.

Sun, W., Li, J., Jiang, H. G., Ge, L. P., Wang, Y. 2014. Diagnostic value of MUC1 and EpCAM mRNA as tumor markers in differentiating benign from malignant pleural effusion. *QJM*. 107 (12): 1001 – 1007.

Šterzl, M. 1993. Imunitní systém a jeho fyziologické funkce. *Česká imunologická společnost*. Praha. s. 480.

Štork, J., Arenberger, P., Pizinger, K., Semrádová, V., Vosmík, F. *Dermatovenerologie*. 2008. Galén. Karolinum. s. 502. ISBN: 978-80-7262-371-6.

Tatsumi, T., Kierstead, L. S., Ranieri, E., Gesualdo, L., Schena, F. P., Finke, J. H., Bukowski, R. M., Mueller – Berghaus, J., Kirkwood, J. M., Kwok, W. W., Storkus, W. J. 2002. Disease-associated bias in T helper type 1 (Th1)/Th2 CD4+ T cell responses against MAGE – 6 in HLA – cDRB10401+ patients with renal cell carcinoma or melanoma. *The Journal of experimental medicine*. 196 (5): 619 – 628.

Thomas, R. K., Baker, A. C., DeBiasi, R. M., Winckler, W., LaFramboise, T., Lin, W. M., Wang, M., Feng, W., Zander, T., MacConaill, L. E., Lee, J. C., Nicoletti, R., Hatton, C., Goyette, M., Girard, L., Majmudar, K., Ziaugra, L., Wong, K. – K., Gabriel, S., Beroukhim, R., Peyton, M., Barretina, J., Dutt, A., Emery, C., Greulich, H., Shah, K., sasaki, H., Gazdar, A., Minna, J., Armstrong, S. A., Mellinshof, I. K., Hodi, F. S., Dranoff, G., Mischel, P. S., Cloughesy, T. F., Nelson, S. F., Liau, L. M., Mertz, K., Rubin, M. A., Moch, H., Loda, M., Catalona, W., Fletcher, J., Signoretti, R., Kaye, F., Anderson, K. C., Demetri, G. D., Dummer, R., Wagner, S., Herlyn, M., Sellers, W. R., Meyerson, M., Garraway, L. A. 2007. High-throughput oncogene mutation profiling in human cancer. *Nature genetics*. 39 (3): 347 – 351.

Thorsby, E. 1999. MHC structure and function. *Transplantation Proceedings*. 31 (1-2): 713 – 716.

Toman, M., Bárta, O., Dostál, J., Faldyna, M., Holáň, V., Hořín, P., Hruban, V., Jeklová, E., Knotek, Z., Kopecký, J., Koudela, B., Krejčí, J., Nechvátalová, K., Ondráčková, P., Plachý, J., Pospíšil, R., Pospíšil, Z., Rybníkář, A., Ryšánek, D., Smola, J., Šíma, P., Tlaskalová, H., Trebichavský, I., Veselský, L. 2009. *Veterinární imunologie*. Grada Publishing. Praha. s. 392. ISBN: 978-80-247-2464-5.

Turner, M. D., Nedjai, B., Hurst, T., Pennington, D. J. 2014. Cytokines and chemokines: at the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research*. 1843 (11): 2563 – 2582.

Vaerman, J. P., Langendries, A., Pabst, R., Rothkötter, H. J. 1997. Contribution of serum IgA to intestinal lymph IgA, and vice versa, in minipigs. *Veterinary immunology and immunopathology*. 58 (3): 301 – 308.

Van Laethem, F., Sarafova, S. D., Park, J. H., Tai, X., Pobeziński, L., Guinter, T. I., Adoro, S., Adams, A., Sharrow, S. O., Feigenbaum, L., Singer, A. 2007. Deletion of CD4 and CD8 coreceptors permits generation of  $\alpha\beta$ T cells that recognize antigens independently of the MHC. *Immunity*. 27 (5):735 – 750.

van Leeuwen, J. E. M., Samelson, L. E. 1999. T cell antigen – receptor signal transduction. *Current Opinion in Immunology*. 11 (3): 242 – 248.

- Vence, L., Palucka, A. K., Fay, J. W., Ito, T., Liu, Y. J., Banchereau, J., Ueno, H. 2007. Circulating tumor antigen – specific regulatory T cells in patients with metastatic melanoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104 (52): 20884 – 20889.
- Villarino, A. V., Kanno, Y., Ferdinand, J. R., O’Shea, J. J. 2015. Mechanisms of Jak/STAT Signaling in Immunity and Disease. *The Journal of Immunology*. 194 (1): 21 – 27.
- Vincent-Naulleau, S., Le Chalony, C., Leplat, J. J., Bouet, S., Bailly, Ch., Spatz, A., Vielh, P., Avril, M. F., Tricaud, Y., Gruand, J., Horák, V., Frelat, G., Geffrotin, C. 2004. Clinical and Histopathological Characterization of Cutaneous Melanomas in the Melanoblastoma – Bearing Libechev Minipig Model. *Pigment Cell Research*. 10 (7): 24 – 35.
- Watts, T. H., DeBenedette, M. A. 1999. T cell co – stimulatory molecules other than CD28. *Current opinion in immunology*. 11 (3): 286 – 293.
- Yang, H., Parkhouse, R. M. E. 1996. Phenotypic classification of porcine lymphocyte subpopulations in blood and lymphoid tissues. *Immunology*. 89 (1): 76 – 83.
- Yang, X., Zhang, X., Fu, M. L., Weichselbaum, R. R., Gajewski, T. F., Guo, Y., Fu, Y. X. 2014. Targeting the tumor microenvironment with interferon- $\beta$  bridges innate and adaptive immune responses. *Cancer cell*. 25 (1): 37 – 48.
- Yin, L., Scott-Browne, J., Kappler, J. W., Gapin, L., Marrack, P. 2012. T cells and their eons-old obsession with MHC. *Immunological Reviews*. 250 (1): 49 – 60.
- Yui, M. A., Sharp, L. L., Havran, W. L., Rothenberg, E. V. 2004. Preferential Activation of an IL-2 Regulatory Sequence Transgene in TCR $\gamma\delta$  and NKT Cells: Subset-Specific Differences in IL-2 Regulation. *The Journal of Immunology*. 172 (8): 4691 – 4699.
- Zippelius, A., Batard, P., Rubio-Godoy, V., Bioley, G., Liénard, D., Lejeune, F., Rimoldy, D., Guillaume, P., Meidenbauer, N., Mackensen, A., Rufer, N., Lubenow, N., Spesier, D., Cerottini, J. – C., Romero, P., Pittet, M. J. 2004. Effector function of human tumor – specific CD8 T cells in melanoma lesions: a state of local functional tolerance. *Cancer research*. 64 (8): 2865 – 2873.



Zon, L. I. 1995. Developmental biology of hematopoiesis. *Blood*. 86 (8): 2876 – 2.