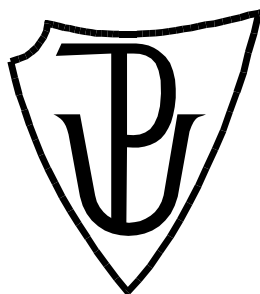


**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Laboratoř růstových regulátorů**



**Změny TCR repertoáru u pacientů s metastazujícím karcinodem  
ledviny a maligním melanomem léčených nivolumabem**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor: Bc. Jan Skácel  
Studijní program: B1501 Experimentální biologie  
Studijní obor: Experimentální biologie  
Forma studia: Prezenční  
Vedoucí práce: Prof. MUDr. Martin Klabusay, Ph.D.  
Termín odevzdání práce: 2019

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Jan Skácel
Název práce	Změny TCR repertoáru u pacientů s metastazujícím karcinomem ledviny a maligním melanomem léčených nivolumabem
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Onkologická klinika FN a UP v Olomouci
Vedoucí práce	Prof. MUDr. Martin Klabusay, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019
Abstrakt	<p>Předmětem předkládané diplomové práce bylo studium změn TCR repertoáru u pacientů s metastazujícím karcinomem ledviny a maligním melanomem léčených anti-PD1 protilátkou nivolumabem. Nivolumab selektivně blokuje interakci mezi PD-1 receptorem a jeho ligandem PD-L1 a umožňuje restartovat imunitní reakci proti nádorovým buňkám. Cílem práce bylo stanovení zastoupení jednotlivých V<math>\beta</math> rodin TCR repertoáru u pacientů a porovnání s kontrolními vzorky zdravých dárců. Pro experimentální část práce byla využita metoda průtokové cytometrie s přímo značenými protilátkami anti-CD3 Pacific Blue, anti-CD4 APC/Cy7, anti-CD8 APC a anti-TCR (FITC a PE). Výsledná data byla podrobena statistické analýze za využití neparametrického Wilcoxonova testu a analýzy hlavních komponent s grafickým znázorněním. Výsledky ukázaly, že u pacientů je složení V<math>\beta</math> rodin značně odlišné než u kontrolní skupiny. Byly zaznamenány významné změny v následujících TCR rodinách (<math>p &lt; 0.001</math>): snížení CD4<sup>+</sup> V<math>\beta</math> 17, CD8<sup>+</sup> V<math>\beta</math> 5.1, V<math>\beta</math> 5.3, V<math>\beta</math> 7.1 a V<math>\beta</math> 22, zvýšení CD4<sup>+</sup> V<math>\beta</math> 16 a V<math>\beta</math> 20. Výsledky také ukázaly odlišné chování určitých V<math>\beta</math> rodin (CD4<sup>+</sup> V<math>\beta</math> 7.1, V<math>\beta</math> 4, V<math>\beta</math> 5.1 a V<math>\beta</math> 22) u pacientů s karcinomem ledviny oproti pacientům s melanomem. V případě rodiny CD4<sup>+</sup> V<math>\beta</math> 21.3 byl pozorován významný nárůst u pacientů s karcinomem ledviny, zatímco u pacientů s melanomem byl pozorován významný úbytek stejné V<math>\beta</math> rodiny. Na základě těchto výsledků jsme došli k následujícím závěrům: 1) Byly zaznamenány změny TCR repertoáru u pacientů s karcinomem ledviny a maligním melanomem léčených nivolumabem. 2) Nivolumab indukuje proliferaci specifických klonotypů V<math>\beta</math> rodin. 3) Nárůst klonotypů V<math>\beta</math> rodin pravděpodobně souvisí s terapeutickou odpovědí na léčbu.</p>
Klíčová slova	TCR repertoár, T lymfocyty, PD-1, anti-PD-1, nivolumab, karcinom ledviny, maligní melanom
Počet stran	66
Počet příloh	2
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Author's first name and surname	Jan Skácel
Title of thesis	Changes of TCR repertoire in patients with metastatic renal cell carcinoma and malignant melanoma treated with nivolumab
Type of thesis	Master thesis
Department	Department of Oncology of University Hospital and Palacky University in Olomouc
Supervisor	Prof. MUDr. Martin Klabusay, Ph.D.
The year of presentation	2019
Abstract	<p>The object of this thesis was to study the changes of TCR repertoire in patients with metastatic renal cell carcinoma and malignant melanoma treated with anti-PD1 antibody nivolumab. Nivolumab selectively blocks the interaction between the PD-1 receptor and its ligand PD-L1 and enables to restart the immune response against cancer cells. The aim of the study was to determine the proportion of individual V<math>\beta</math> families of TCR repertoire in patients and to compare them with healthy donor controls. For the experimental part flow cytometry was used, with directly labeled antibodies anti-CD3 Pacific Blue, anti-CD4 APC / Cy7, anti-CD8 APC and anti-TCR (FITC and PE). The resulting data were subjected to statistical analysis using a non-parametric Wilcoxon test and principal component analysis with resulting plot. The results showed that the composition of V<math>\beta</math> families is significantly different in patients than in the control group. Significant changes in following TCR families (<math>p &lt; 0.001</math>) were confirmed: decrease of CD4<sup>+</sup> V<math>\beta</math> 17, CD8<sup>+</sup> V<math>\beta</math> 5.1, V<math>\beta</math> 5.3, V<math>\beta</math> 7.1 and V<math>\beta</math> 22, increase of CD4<sup>+</sup> V<math>\beta</math> 16 and V<math>\beta</math> 20. The results also showed different behavior of certain V<math>\beta</math> families (CD4<sup>+</sup> V<math>\beta</math> 7.1, V<math>\beta</math> 4, V<math>\beta</math> 5.1 a V<math>\beta</math> 22) for renal cell carcinoma patients versus melanoma patients. In the case of the CD4<sup>+</sup> V<math>\beta</math> 21.3 family, a significant increase was observed in patients with renal cell carcinoma, while a significant decrease in the same V<math>\beta</math> family was observed in melanoma patients. Based on these results, we came to the following conclusions: 1) Changes in TCR repertoire were observed in patients with renal cell carcinoma and melanoma treated with nivolumab. 2) Nivolumab induces proliferation of specific V<math>\beta</math> family clonotypes. 3) The increase in clonotypes of V<math>\beta</math> families is probably related to the therapeutic response to treatment.</p>
Keywords	TCR repertoire, T cells, PD-1, anti-PD1 therapy, nivolumab, renal cell carcinoma, malignant melanoma
Number of pages	66
Number of appendices	2
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením Prof. MUDr. Martina Klabusaye, Ph.D.a za použití citované literatury.

V Olomouci dne

Děkuji Prof. MUDr. Martinu Klabusayi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování diplomové práce věnoval. Mé poděkování patří též Mgr. Petru Čoupkovi za spolupráci při statistické analýze dat pro výzkumnou část práce. Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Jánmu Gurskému, Ph.D. za umožnění a podporu mé práce v laboratoři průtokové cytometrie a také Mgr. Ondřeji Strouhalovi za podporu mé práce v laboratoři Onkologické kliniky FN v Olomouci.

## Obsah:

Seznam zkratk	8
1 Úvod	9
2 Současný stav řešené problematiky	10
2. 1 Karcinom ledviny	10
2. 1. 1 Epidemiologie	10
2. 1. 2 Rizikové faktory	10
2. 1. 3 Symptomy a diagnostika	11
2. 2 Maligní melanom	13
2. 2. 1 Epidemiologie	13
2. 2. 2 Rizikové faktory	14
2. 2. 3 Symptomy a diagnostika	15
2. 3 TCR repertoár	18
2. 3. 1 T lymfocyty	18
2. 3. 1. 1 Druhy T lymfocytů	19
2. 3. 2 T-buněčný receptor TCR	20
2. 3. 2. 1 Diverzita TCR	22
2. 3. 2. 2 TRB lokus a jeho genové V $\beta$ rodiny	23
2. 4 Imunoterapie	26
2. 4. 1 Receptory PD-1, CTLA-4	26
2. 4. 1. 1 Dráha CTLA-4	27
2. 4. 1. 2 Dráha PD-1	29
2. 4. 2 Checkpoint inhibitory	31
2. 4. 2. 1 CTLA-4 blokáda (ipilimumab)	31
2. 4. 2. 2 PD-1 blokáda (nivolumab a pembrolizumab)	34
3 Materiál a metody	37
3. 1 Krevní vzork	38
3. 2 Příprava vzorku pro průtokovou cytometrii	39
3. 2. 1 Izolace leukocytů	39
3. 2. 2 Aplikace přímo značených protilátek na T lymfocty	40
3. 3 Průtoková cytometrie	40
3. 3. 1 Gating	41
3. 4 Metody statistické analýzy	44

3. 4. 1 Jednovýběrový neparametrický Wilcoxonův test .....	45
3. 4. 2 Metoda výběru hlavních komponent.....	45
4 Výsledky .....	46
4. 1 Průměrné zastoupení jednotlivých Vβ rodin u zdravých dárců .....	46
4. 2 Průměrné zastoupení jednotlivých Vβ rodin u pacientů s diagnózou karcinomu ledviny.....	47
4. 3 Průměrné zastoupení jednotlivých Vβ rodin u pacientů s diagnózou maligního melanomu .....	49
4. 4 Statistická analýza dat .....	51
4. 4. 1 Jednovýběrový neparametrický Wilcoxonův test .....	51
4. 4. 2 Metoda výběru hlavních komponent.....	52
5 Diskuze.....	54
6 Závěr .....	57
Citovaná literatura.....	58
Přílohy .....	67

## Seznam zkratek

APC	<i>antigen-presenting cell</i> , antigen prezentující buňka
ASR	<i>Age Standardized Rate</i> , věkově standardizovaná incidence - přímá standardizace
CDR	hypervariabilní úsek určující komplementaritu
CRC	<i>colorectal cancer</i> , kolorektální karcinom
CT	počítačová tomografie
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4</i> , cytotoxický T-lymfocytom asociovaný antigen 4 receptor
IBD	<i>inflammatory bowel diseases</i> , zánětlivá onemocnění střev
IL-2	interleukin-2
irAE	nežádoucí účinky související s imunitou
ITAM	imunoreceptorové aktivační motivy bohaté na tyrosin
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> , hlavní histokompatibilní komplex
MRI	magnetická rezonance
PD-1	<i>programmed death receptor 1</i> , receptor programované buněčné smrti 1
PD-L1/L2	ligand programované buněčné smrti 1/2
RCC	<i>renal cell carcinom</i> , karcinom ledviny
TCR	T-buněčný receptor
TIL	tumor infiltrující lymfocyty
VHL	Von Hippel-Lindauova nemoc



## 1 Úvod

T lymfocyty rozpoznávají své antigenní peptidy prostřednictvím působení heterodimerní molekuly T-buněčného receptoru TCR. Prostřednictvím TCR receptoru dochází k aktivaci T lymfocytů a k jejich proliferaci, diferenciaci a produkci cytokinů. Aktivace T lymfocytu je dále regulována receptorem PD-1, který hraje zásadní roli při procesu zvaném periferní tolerance, což je proces regulující aktivaci T lymfocytů mnoha imunitními kontrolními drahami. Nádorové buňky, které by normálně byly rozpoznávány T lymfocyty, vyvinuly způsoby, jak se vyhnout imunitnímu systému hostitele využíváním periferní tolerance. To vedlo k vývoji nových léků používaných v imunoterapii, k vývoji tzv. checkpoint inhibitorů. Nivolumab je jedním z těchto checkpoint inhibitorů. Jedná se o monoklonální protilátku proti receptoru PD-1. Působí tak, že blokuje interakci mezi inhibičním receptorem PD-1 a jeho ligandy nacházejícími se na nádorových buňkách. Předpokládá se, že proliferace specifických klonů T lymfocytů (V $\beta$  rodin) může být spojena s odpovědí na anti-PD-1 terapii, tedy na nivolumab.

Hlavním cílem předkládané diplomové práce byla analýza TCR repertoárů u pacientů trpících nádorovým onemocněním, u nichž byla využita imunoterapeutická metoda léčby pomocí nivolumabu. Strategií bylo pak stanovení procentuálního zastoupení jednotlivých V $\beta$  rodin u pacientů a porovnání s kontrolními vzorky zdravých dárců. Pro experimentální část byla využita metoda izolace mononukleárních buněk, barvení přímo značenými monoklonálními protilátkami a průtoková cytometrie. Hlavními dvěma zkoumanými skupinami pacientů byli nemocní s diagnózou karcinomu ledviny a maligního melanomu.

Diplomová práce byla prováděna na Onkologické klinice Univerzity Palackého v Olomouci ve spolupráci s Ústavem molekulární a translační medicíny, konkrétně ve skupině pod vedením Prof. MUDr. Martina Klabusaye, Ph.D.

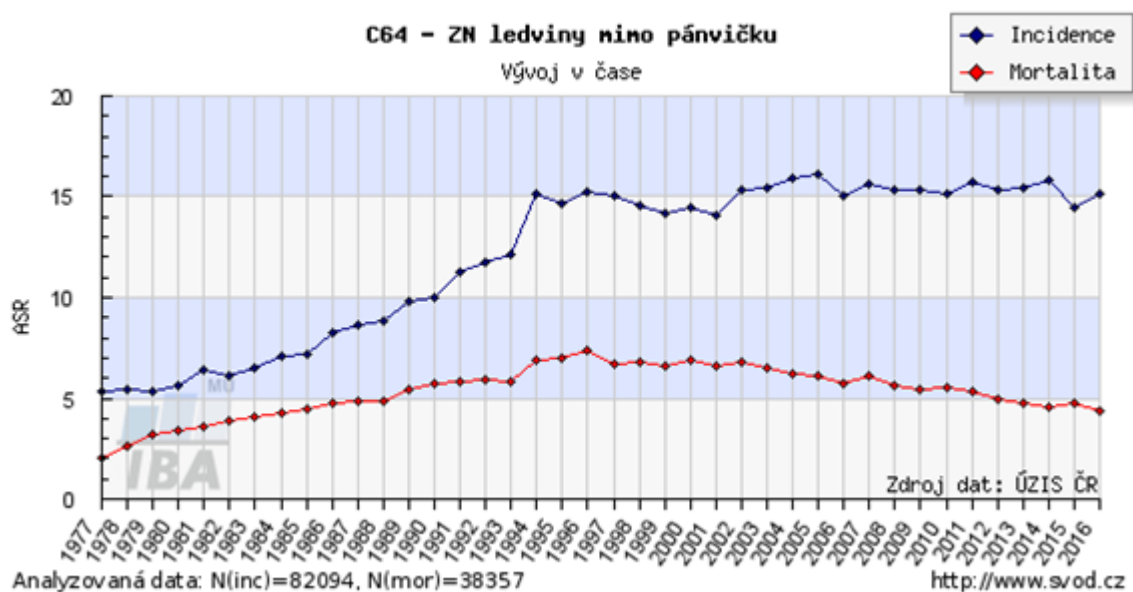
## 2 Současný stav řešené problematiky

### 2. 1 Karcinom ledviny

#### 2. 1. 1 Epidemiologie

Karcinom ledviny (RCC, z *angl. renal cell carcinoma*) je 10. nejčastějším typem nádorového onemocnění u dospělých jedinců. Celosvětově podle pohlaví představuje 6. nejčastěji diagnostikované rakovinové onemocnění u mužů a 10. u žen, což odpovídá 5 % a 3 % všech onkologických diagnóz. Globální incidence je přibližně 337 000 případů, kdy každý rok zemřelo 143 000 pacientů. Jenom ve Spojených státech bylo v roce 2016 odhadováno 62 700 případů RCC, z toho 12 200 úmrtí (Siegel et al., 2018). Průběh incidence a mortality RCC v České republice v letech 1977–2016 je vyobrazen na Obr. 1.

RCC tvoří přibližně 85 % výskytu nádorů ledvin. RCC se u člověka vyskytuje většinou sporadicky, avšak ve 4 % se vytváří familiární (dědičné) karcinomy. V průběhu diagnózy se až u jedné třetiny postižených jedinců vyskytuje v metastatické fázi. K progresi pak dochází u více než poloviny postižených jedinců s původně lokalizovaným onemocněním (Kawaciuk, 2005).



**Obrázek 1.** Průběh incidence a mortality RCC v ČR v letech 1977 – 2016. ASR (z *angl. age standardized incidence/mortality rate*) – věkově standardizovaná incidence/mortalita (převzato a upraveno z Svod.cz)

#### 2. 1. 2 Rizikové faktory

Etiologické faktory vzniku RCC nejsou známy. Mezi nejčastější rizikové faktory RCC patří obezita a hypertenze, ale také užívání tabákových výrobků nebo diabetes (Yuan et

al., 1998). Dalším rizikovým faktorem může být vystavení ropným produktům, těžkým kovům, rozpouštědlům, emisím koksárenských pecí nebo azbestu. V důsledku toho se spojuje vyšší výskyt karcinomu se znečištěním životního prostředí ve východní Evropě (Murai et al., 2004). Zajímavým rizikovým faktorem je také konzumace červeného a uzeného masa. Zahrnujeme sem také dietní návyky, jež mohou přímo působit v etiopatogenezi RCC (Kawaciuk, 2005). Dále byl zjištěn častější výskyt RCC u jedinců s terminálním stadiem chronické renální insuficience, s cystickou renální nemocí a u pacientů na dialýze, kteří podstoupili transplantaci ledvin nebo u pacientů se syndromem tuberózní sklerózy (Chow et al., 2010). Genetické predispozice hrají také významnou roli ve vzniku RCC. Přibližně 2 až 3 % všech RCC jsou dědičné a popisuje se několik autozomálně dominantních syndromů, z nichž každý má odlišnou genetickou základnu a fenotyp. Nejčastější je von Hippelova-Lindauova nemoc (VHL). Markerem genetické závislosti u jedinců trpících VHL a RCC byla změna na 3. chromozomu. (Escudier et al., 2016). RCC primárně postihuje muže a ženy v pátém a šestém desetiletí života. Jsou ovšem známy případy, kdy postihuje i mladé a zdravé jedince ve věku 30–40 let (Rathmell et al., 2004).

### 2. 1. 3 Symptomy a diagnostika

Ve většině případů bývá nádor ledviny asymptomatický. Jedním z prvních a nejčastějších příznaků může být hematurie. Objevuje se průměrně u 60 % pacientů. Jako další příznak se může objevit bolest břicha (průměrně u 45 % pacientů), hmatatelný břišní nádor a paraneoplastické syndromy nebo příznaky způsobené metastatickým onemocněním (Patard et al., 2003).

Mezi paraneoplastické syndromy řadíme například anemii, polycytemii, hypertenzi, amyloidózu nebo Staufferův syndrom. V případě Staufferova syndromu se jedná o hepatopatii, přesněji reverzibilní paraneoplastickou dysfunkci. Tato dysfunkce může ovlivňovat jaterní testy a bývá doprovázena horečkami nebo nekrotickými zónami na játrech. Proto je nutné nejdříve vyloučit, zda se nejedná náhodou o metastatické poškození jater. Příznakem způsobeným metastatickým onemocněním může být bolest kostí či patologická fraktura skeletu. V případě metastatického poškození plic se může objevit trvalý kašel (Patard et al., 2003).

Nedostatek včasných varovných signálů a rozmanitost klinických projevů u RCC je důsledkem obtížného určení diagnózy a léčby nemoci. Vzhledem k tomu, že po většinu svého průběhu zůstává RCC klinicky skryt, je často diagnostikován až v pokročilých

stádiích. Obvykle náhodným radiologickým vyšetřením, které s vyšetřením nádoru vůbec nesouvisí. Příkladem může být vyšetření žlučnickových problémů, při kterých se detekuje nádor na ledvinách nebo nadledvinách (Lam et al., 2005).

Současným přístupem pro detekci a charakterizaci ledvinných nádorů jsou zobrazovací metody, jako je ultrazvuk, počítačová tomografie (CT) nebo zobrazování magnetickou rezonancí (MRI). Ultrazvukem detekujeme většinou náhodně a při jiném vyšetření břicha, ale později může být použit pro určení rozsahu šíření případného nádorového trombu. Oproti tomu využití metody CT s kontrastní látkou nám poskytuje informace o rozšíření primárního nádoru, jeho vztahu k okolním strukturám, morfologii kontralaterální ledviny a hodnocení metastáz (Israel et Bosniak, 2008).

Pokud jsou výsledky analýzy neurčitě, je třeba využít MRI, která nám poskytuje ještě přesnější informace týkající se renální hmoty a lokálního růstu nádoru. MRI se bezpečně používá u těhotných pacientů a pacientů se zvýšenou hladinou kreatininu nebo majících alergii na kontrastní látku (Putra et al., 2009).

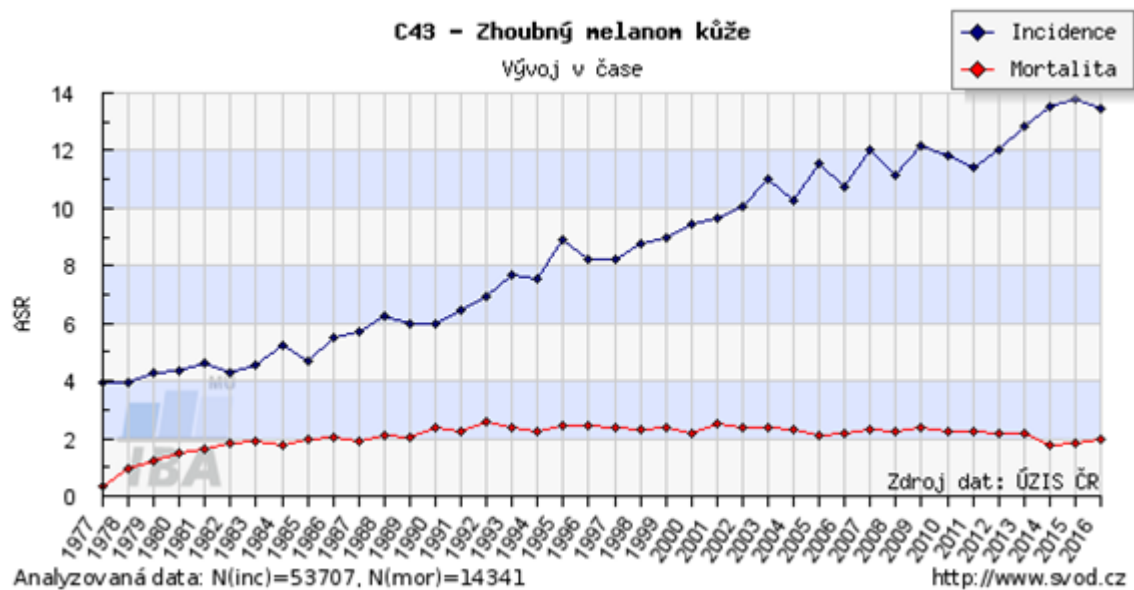
K diagnóze nádorů se standardně využívá renální biopsie. Většinou se provádí před chirurgickou a systémovou terapií bez předchozí histopatologie (Shannon et al., 2008). Cílem biopsie je stanovení histologie malignity, subtypu a stupně infiltrace renální hmoty. Ve většině případů vykazuje biopsie vysokou specifickou a citlivost na přítomnost malignity. Ve zbylých 10–20 % případů nejsou výsledky biopsie zcela přesvědčivé. U rozsáhlejších nádorů ledviny, které jsou určeny k nefrektomii (tj. chirurgickému odstranění ledviny), lze od biopsie upustit (Remzi et al., 2009).

## 2. 2 Maligní melanom

### 2. 2. 1 Epidemiologie

Melanom je maligní nádor, který vzniká z nekontrolované proliferace melanocytů – buněk produkujících pigmenty. Nejběžnější forma melanomu je kožní, ale může se objevit také melanom v mukózních površích, uveálním traktu a leptomeningách (Tsatmali et al., 2002). Melanom kůže tvoří 5 % všech kožních malignit, ale přesto bývá jednou z hlavních příčin úmrtí způsobených rakovinou kůže. Na rozdíl od jiných druhů nádorů kůže má tendenci rychle metastázovat k jiným orgánům (Linos et al., 2009).

Historicky se jednalo o poměrně vzácný druh nádoru, ale v posledních 50 letech jeho incidence vzrostla rychleji než u téměř jakéhokoliv jiného druhu nádoru (Guy et al., 2015). Nejvíce postiženými jsou obyvatelé žijící v slunečných zemích, jako je Nový Zéland a Austrálie. Toto má přímou souvislost i s přítomností populace bývalých imigrantů bílé barvy kůže a s výskytem ozonové díry. Výskyt melanomu je sice vyšší v zemích blízkých rovníku, ale mnoho případů se vyskytuje i v Evropě. Nejvyšší počet případů je zaznamenán v Německu, Nizozemsku, Dánsku, Norsku a Švédsku. Zvýšení míry výskytu se výrazně liší u obyvatel různých etnik, geografických oblastí, a dokonce i v rámci populací skrze věk a pohlaví. Prevalence melanomu v hispánské populaci v USA je asi šestkrát nižší než u kavkazského obyvatelstva (Bränström et al., 2010). V afroamerické populaci je prevalence dokonce dvacetkrát nižší (de Vries et al., 2003). Epidemiologické údaje ukazují konstantní 4–6 % nárůst případů incidence melanomu ročně (Hollestein et al., 2012). Průběh incidence a mortality maligního melanomu v České republice v letech 1977–2016 je vyobrazen na Obr 2.



**Obrázek 2.** Průběh incidence a mortality maligního melanomu v ČR v letech 1977–2016. ASR (z angl. *age standardized incidence/mortality rate*) – věkově standardizovaná incidence/mortalita (převzato a upraveno z Svod.cz)

## 2. 2. 2 Rizikové faktory

Hlavním rizikovým faktorem vzniku melanomu je expozice slunečnímu záření (Schadendorf et al., 2018). Podíl melanomu připsaného na expozici slunečnímu záření byl v Austrálii, Kanadě, severských zemích, Švýcarsku a USA odhadován na více než 90 % a mezi 78–90 % v několika dalších evropských zemích včetně Velké Británie s odhadem 86 % (Parkin et al. 2011). Expozici slunečnímu záření můžeme běžně rozdělit na několik druhů, přičemž každá nese jinak vysoké riziko vzniku melanomu. Patří sem přerušovaná (krátká, intenzivní jako například opalování nebo rekreace ve slunečním klimatu), chronická (kontinuální, pracovní) a celková expozice (dohromady přerušovaná a chronická) (Elwood et al., 1997). Nicméně největším rizikem pro vznik melanomu je přerušovaná expozice. Celková expozice je také spojena se vznikem melanomu, ale riziko zde není až tak velké jako u přerušované. Nejmenším rizikem pro vznik melanomu je chronická expozice, což je způsobeno podporou zhuštění epitelu společně s účinkem opalování, což může poskytnout mírnou ochranu před pozdější expozicí slunečnímu záření (Gandini et al., 2005). Riziko melanomu se liší nejen podle typu expozice slunečnímu záření, ale také podle místa na těle, věku a fenotypu hostitele. Melanomy krku a hlavy se objevují spíše u starších osob a při chronické expozici. Oproti tomu melanomy trupu a končetin se objevují více u mladších osob a při přerušované expozici. Bylo zjištěno, že expozice slunci může způsobit melanom na všech místech těla, avšak rizika

jsou obvykle častější u míst přímo vystavených slunečnímu záření než u příležitostně vystavených míst (Caini et al., 2009).

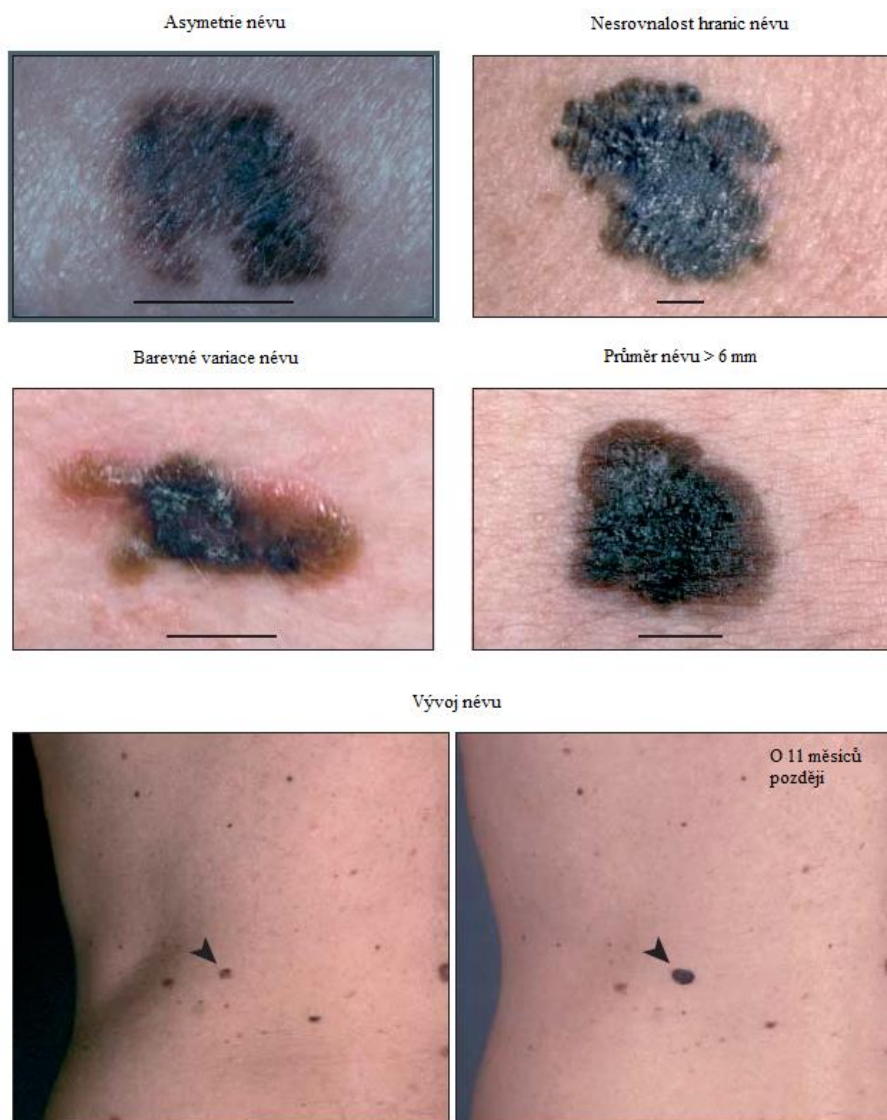
Jeden z dalších hlavních rizikových faktorů vzniku melanomu je počet a typ pigmentových névů. Névy (lidově znaménka) jsou benigní soubory melanocytů o různé velikosti. Se zvýšeným počtem névů se zvyšuje riziko vzniku melanomu. Studie ukázaly, že jedinci s více než 100 névy mají téměř sedmkrát vyšší riziko vzniku melanomu než jedinci s méně než 15 névy. Velikost névu také zvyšuje riziko vzniku melanomu, zejména těch, které mají průměr větší než 2,0 mm. Dále mohou vznikat dysplastické nebo atypické névy. Tato podskupina névů se vyznačuje cytologickými abnormalitami jako například špatně definované hranice névu, změna barvy nebo velikost větší než 5 mm. Konkrétním příkladem výše uvedených abnormalit je tzv. syndrom dysplastických névů (též familiární, vícečetný, melanomový syndrom), jež se vyznačuje výskytem alespoň dvou atypických névů, většího počtu normálních névů (>100) a névy na neobvyklých místech těla (chodidla, hýždě, prsa nebo kůže na hlavě) (Markovic et al., 2007).

Bylo také prokázáno, že k predikci rizika vzniku melanomu mnohem více přispívají genetické než klasické rizikové faktory (Cust et al., 2013). V roce 1994 byly identifikovány dva geny (*CDKN2A* a *CDK4*), které svědčí o náchylnosti k melanomu (Kamb et al., 1994). *CDKN2A* kóduje dva odlišné proteiny p16INK4A a p14ARF, jež se podílejí na kontrole buněčného cyklu, potlačení nádorů a stárnutí melanocytů. Protein p16INK4A se váže na cyklin-dependentní kinázy CDK4 a CDK6, inhibuje fosforylaci proteinu retinoblastomu a progresi buňky přes kontrolní bod buněčného cyklu G1. Protein p14ARF indukuje zastavení buněčného cyklu nebo apoptózu cestou tumor supresorového proteinu p53 (Hayward, 2003). Jen asi 2 % všech případů melanomu v populaci nesou mutaci genu *CDKN2A*, avšak pravděpodobnost je mnohem vyšší, pokud je přítomna silná rodinná anamnéza melanomu nebo více primárních nádorů (Goldstein et al., 2007). Mutace v genu *CDK4* jsou také spojeny s velmi vysokým rizikem vzniku melanomu. Nicméně *CDK4* mutace jsou velmi vzácné a celosvětově se nacházejí pouze u několika melanomových rodin (Hayward, 2003).

### 2. 2. 3 Symptomy a diagnostika

Klíčem zvýšení míry uzdravení je včasná vizuální diagnostika. Ve 20–40 % případů se melanom vyvine z existujících névů, ale ve zbylých 60–80 % případů se většinou vyvine *de novo*. Včasná identifikace melanomu zahrnuje vyšetření přímých vlastností povrchového rozšiřujícího se melanomu, a to podle kritérií ABCDE pro rozpoznávání

melanomu. Každé písmeno značí jeden druh abnormality névu, A – asymetrie névu (z *angl. asymetry*), B – nesrovnalost hranic névu (z *angl. border irregularity*), C – barevné variace névu (z *angl. color variegation*), D – průměr (z *angl. diameter*), E – vývoj névu (z *angl. evolving*). Jednotlivé druhy abnormalit jsou názorně zobrazeny na obr 3. (Abbasi et al., 2004).



**Obrázek 3.** ABCDE kritéria pro rozpoznání melanomu. Panel 1 ukazuje fotky kožního melanomu, které zdůrazňují znaky ABCD. Panel 2 ukazuje vývoj jednoho névu v kožní melanom v průběhu 11 měsíců a je zde možné pozorovat zvýšení průměru a změnu barvy névu (převzato a upraveno od Abbasi et al., 2004).

Jednou z metod, která se k diagnostice melanomu využívá, je dermoskopie. Umožňuje nám rychlé a zvětšené (až 10×) pozorování kožních névů *in vivo*. Použití dermoskopie snižuje počet nepotřebných biopsií. Pro diagnostiku se také využívá



celotělové fotografování, ale jen v případě, že se u pacientů vyskytuje velké množství atypických névů. Studie ukázaly, že až 40 % melanomů zjištěných celotělovým fotografováním nebylo nalezeno klasickým vyšetřením pomocí dermoskopie. Velmi obtížné je však diagnostikovat nodulární či amelanotický melanom (tj. bez přítomnosti pigmentu). Jedná se o rychle rostoucí druh melanomu, jež narušuje hlubší struktury kůže a neprojevuje se varovnými abnormalitami ABCDE. Klinicky podezřelé névy by měly být zcela excidovány, včetně několika milimetrů od hranice névu, pro histologické vyšetření (Salerni et al., 2012).

## 2. 3 TCR repertoár

### 2. 3. 1 T lymfocyty

T lymfocyty jsou centrálními prvky imunitního systému obratlovců a zodpovídají za prezentování vysoce specifické a dlouhodobé buněčné imunitní odpovědi vůči patogenům. Aby se vyrovnaly obrovské variabilitě environmentálních antigenů, zahrnují T lymfocyty skupinu buněčných klonů, z nichž každý má schopnost rozpoznat specificky daný antigen. Fyziologickými znaky T lymfocytů jsou antigenní specifita, schopnost pamatovat si a aktivace až po setkání se určitým antigenem. Tyto vlastnosti jsou získávány během dozrávání T lymfocytů, které probíhá v brzlíku neboli thymu (odtud název T lymfocyty) a později v sekundárních lymfatických orgánech (slezině, lymfatických uzlinách a lymfoidní tkáň spojenou s mukózou) (von Boehmer, 1997).

T lymfocyty jsou odvozeny z lymfoidních prekurzorů, které se produkují v kostní dřeni a diferencují se v thymu, kde se začnou od sebe odlišovat. Specifita rozpoznávání antigenu je zprostředkována polymorfním membránovým heterodimerem, T-buněčným receptorem TCR (z *angl. T cell receptor*), který je tvořen při genové rekonstrukci během vývoje T lymfocytů v thymu a určuje jim specifitu pro jediný antigen po celou dobu jejich života. Oproti ostatním protilátkám, které rozpoznávají volné antigeny, TCR rozpoznává pouze ty antigeny, které jsou navázány na molekulu hlavního histokompatibilního komplexu MHC (z *angl. major histocompatibility complex*) exprimovaného na plazmatické membráně antigen prezentující buňky APC (z *angl. antigen-presenting cell*) (Viret et Janeway, 1999). Proces prezentace antigenu zajišťují 2 typy MHC molekul; MHCI (molekuly MHC I. třídy) a MHCII (molekuly MHC II. třídy). Přičemž MHCI molekuly jsou exprimovány skoro na všech jaderných buňkách organismu. Oproti tomu MHCII molekuly jsou exprimovány pouze na několika buněčných typech, které se specializují na prezentaci antigenu (Nossal, 1994). Důležitou komponentou MHCI komplexu je  $\beta$ 2-mikroglobulin. Je přítomen na povrchu jaderných buněk a trombocytů. Strukturně se jedná o polypeptid s molekulovou hmotností 11 800 Da (Liabeuf et al., 2012). U člověka je  $\beta$ 2-mikroglobulin kódován genem *B2M*. Patří mezi nádorové markery. Pro diagnózu například mnohočetného myelomu je sérová hladina  $\beta$ 2-mikroglobulinu jedním z prognostických faktorů začleněných do mezinárodního systému stagingu. Sérová hladina  $\beta$ 2-mikroglobulinu je v době diagnózy zvýšena ( $>2,7$  mg/l) u 75 % pacientů. Pacienti s vysokými hodnotami mají kratší dobu přežití. U myelomu je prognostická hodnota sérových hladin  $\beta$ 2-mikroglobulinu pravděpodobně způsobena dvěma faktory; vysoká hladina je spojena s větší zátěží nádorem a se selháním ledvin,

keré nese nepříznivou prognózu. V případě lymfomu, hladiny  $\beta$ 2-mikroglobulinu obvykle korelují s fází onemocnění a zátěží nádorem u pacientů trpící chronickou lymfocytární leukémií. Zvyšující se hladiny jsou spojeny s horší prognózou.  $\beta$ 2-mikroglobulin může být alespoň částečně regulován exogenními cytokiny. Nicméně hladiny  $\beta$ 2-mikroglobulinu také vzrůstají se zhoršující se renální dysfunkcí (Dasgupta et Wahed, 2014).

Vzhledem k tomu, že jsou MHC komplexy vysoce polymorfní, nezralé T lymfocyty musí být během vývoje selektovány pro svou schopnost interagovat s vlastní MHC molekulou. Tento proces se nazývá pozitivní selekce. Může nastat proces zvaný negativní selekce, kdy po získání antigen-specifického TCR se všechny T lymfocyty reagující na vlastní antigeny vyloučí apoptózou. Tento proces hraje zásadní roli v centrální toleranci organismu a zabraňuje tak vzniku autoimunitních onemocnění (Nossal, 1994).

### 2. 3. 1. 1 Druhy T lymfocytů

T lymfocyty dělíme na hlavní dva typy; pomocné T lymfocyty  $T_h$  (z *angl. helper*), které zajišťují celkovou imunitní odpověď a cytotoxické T lymfocyty  $T_c$  (z *angl. cytotoxic*), které přímo eliminují antigeny. Později byly popsány ještě regulační T lymfocyty  $T_{reg}$  (z *angl. regulation*), které regulují imunitní systém, udržují toleranci vůči vlastním antigenům a zabraňují vzniku autoimunitních onemocnění.  $T_h$  a  $T_c$  rozlišujeme podle přítomnosti membránových molekul CD4 a CD8 (z *angl. cluster of differentiation*), přičemž  $CD4^+$  T lymfocyty patří mezi pomocné a  $CD8^+$  T lymfocyty mezi cytotoxické. CD4 a CD8 jsou definovány také jako ko-receptory, protože určují, jaký typ MHC komplexu bude rozpoznán TCR receptorem.  $CD4^+$  T lymfocyty rozpoznávají antigeny vázané s molekulami MHCII, zatímco  $CD8^+$  T lymfocyty rozpoznávají antigeny vázané s molekulami MHCI (Fabbri et al., 2003).

T lymfocyty, které se nikdy nesetkaly s antigeny, jsou označovány jako „naivní“ T lymfocyty, na rozdíl od paměťových T lymfocytů, které zajišťují rychlejší imunitní odpověď při opětovném setkání se stejným antigenem. Adaptivní imunita závisí na každém naivním T lymfocytu nesoucím jedinečný prototyp antigenního receptoru rozpoznávajícího antigeny, které jsou předkládány jinými buňkami. Těmito buňkami mohou být například buňky podílející se na vrozené imunitě (dendritické buňky), jež přímo rozpoznávají určité molekulární struktury spojené s patogenem tzv. PAMP (z *angl. pathogen-associated molecular patterns*) a jsou odpovědné za počáteční zachycení

antigeny na periférii a jeho prezentaci T lymfocytům v proximálních lymfatických uzlinách (Janeway, 2002). Po prvním kontaktu naivního T lymfocytu se specifickým antigenem navázaným na MHC molekulu, dochází k jeho proliferaci a diferenciaci do paměťových nebo efektorových buněk. Efektorové buňky mají odlišné funkční schopnosti (Husmann et Bevan, 1988). Po interakci  $CD4^+$  T lymfocytu s antigenem navázaným na MHCII molekulu dojde k jejich aktivaci a vzniknou dvě hlavní podskupiny  $T_{h1}$  a  $T_{h2}$ . Tyto podskupiny se liší na základě exprese cytokinů. Produkované cytokiny pak podporují další buňky účastnící se imunitní odpovědi (B lymfocyty, makrofágy či cytotoxické T lymfocyty) (Lanzavecchia et Sallusto, 2000).  $T_{h1}$  lymfocyty produkují  $IFN-\gamma$  (interferon- $\gamma$ ) a  $TNF-\beta$  (z *angl. tumor necrosis factor-beta*), a tím mobilizují buněčné rameno imunitního systému k boji s intracelulárními patogeny.  $T_{h2}$  lymfocyty vylučují interleukiny IL-4, IL-13 a IL-25, které jsou nezbytné pro tvorbu vhodných tříd protilátek a pro eliminaci extracelulárních patogenů (Mosmann et Coffman, 1989). Existuje ještě třetí skupina pomocných T lymfocytů, která je označována jako  $T_{h17}$  lymfocyty. Efektorové funkce  $T_{h17}$  lymfocytů jsou od  $T_{h1}$  a  $T_{h2}$  odlišné. Produkují IL-17 a zdají se být kritické pro zvýšení ochrany hostitele proti extracelulárním bakteriím a houbám, které nejsou efektivně vylučovány odpověďmi  $T_{h1}$  a  $T_{h2}$ . Kromě toho bylo zjištěno, že se mohou chovat jako silné induktory autoimunitních onemocnění (Korn et al., 2007).

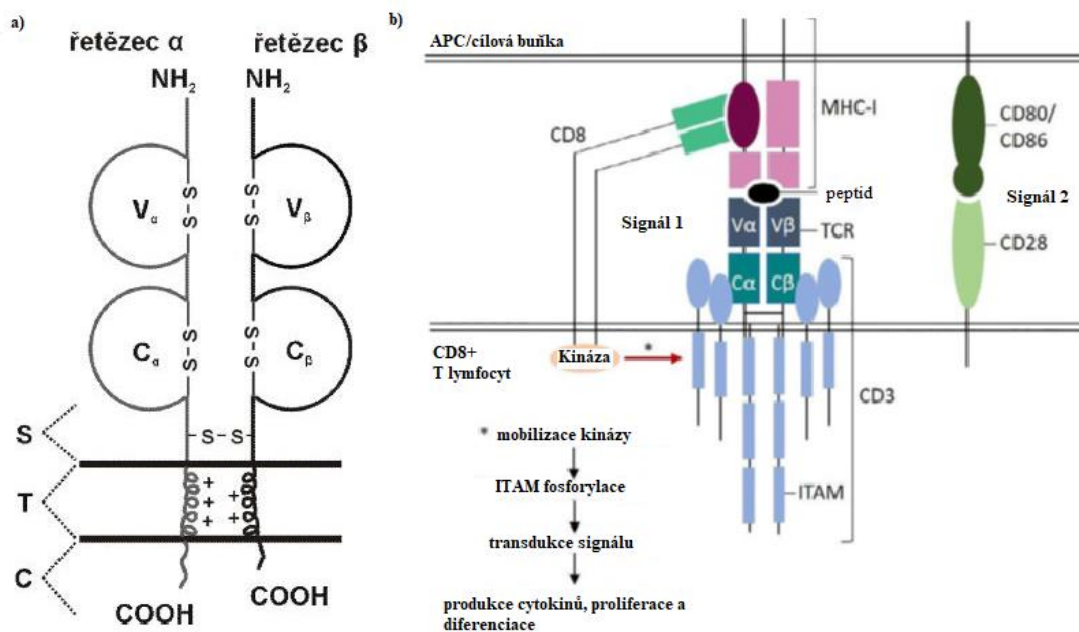
V případě  $CD8^+$  T lymfocytů se při interakci s antigenem navázaným na MHCI molekulu tvoří jedna skupina efektorových buněk, tedy skupina cytotoxických T lymfocytů. Cytotoxické T lymfocyty kontrolují buňky organismu a pomocí cytolytických proteinů odstraňují ty, které exprimují cizí nebo nežádoucí antigeny. Přispívají tak k eliminaci nádorových buněk, virem infikovaných buněk, ale i buněk transplantované tkáně. U těchto buněk vyvolávají apoptózu za využití proteinu FasL nebo systému perforin/granzym B (Lanzavecchia et Sallusto, 2001).

### 2. 3. 2 T-buněčný receptor, TCR

T lymfocyty rozpoznávají své antigenní peptidy prostřednictvím působení heterodimerní molekuly T-buněčného receptoru TCR. TCR je vázán v membráně T lymfocytů. Tento způsob adaptivní imunity je charakteristický pro většinu obratlovců (Hofmann et al., 2010). U většiny zralých T lymfocytů je TCR tvořen ze dvou polypeptidových řetězců ( $\alpha$  a  $\beta$ ). Existuje ale i malá část (asi 10 %) zralých T lymfocytů, u kterých se vyskytuje TCR tvořen řetězcí  $\gamma$  a  $\delta$ .

Podle toho je TCR rozdělován na dva druhy  $\alpha\beta$  TCR a  $\gamma\delta$  TCR (Richards et Nelson, 2000). Podobně jako imunoglobuliny je TCR tvořen dvěma extracelulárními doménami (Obr. 4a). Jedná se o variabilní (V) a konstantní (C) doménu tvořící neúplné prstence spojené disulfidickou vazbou. Variabilní doména řetězce TCR je tvořena N-koncovou oblastí a zajišťuje vysokou sekvenční variabilitu, kde se nacházejí tři úseky určující komplementaritu, tzv. hypervariabilní úseky – CDR1, CDR2, CDR3 (z *angl. complementarity determining region*). Variabilní oblast řetězce TCR pak přímo interaguje s antigen-MHC komplexem. Následuje konstantní doména, která se vyznačuje konzervativní sekvencí. Její součástí je také krátká spojovací oblast (S), pomocí které se oba řetězce TCR spojují disulfidickou vazbou. Řetězec je k membráně T lymfocytů přichycen hydrofobní transmembránovou oblastí (T), která je tvořena pozitivně nabitými zbytky aminokyselin lysinu a argininu zajišťující interakci TCR s komplexem CD3. Na karboxylovém konci řetězce se nachází ještě krátká cytoplazmatická oblast tvořená 5 až 12 aminokyselinami, která plynule navazuje na (T) oblast (Weiss et al., 1995).

Aktivace T lymfocytů závisí na vazbě mezi TCR/CD3 komplexem a antigen-MHC komplexem, následně na správné iniciaci, amplifikaci signálu a procesech zahrnujících řadu ligandů a receptorů. Protože  $\alpha\beta$  heterodimer postrádá vlastní intracelulární signalizační doménu, musí se spojit s CD3 komplexem, který obsahuje celkem deset imunoreceptorových aktivačních motivů bohatých na tyrosin (ITAMs, z *angl. immunoreceptor tyrosine-rich activation motifs*) odpovědných za přenos signálů (Harris et Kranz, 2016). Spojení TCR a CD3 komplexu je nutné, ale není dostatečné k úplné aktivaci T lymfocytů a spuštění efektorové funkce (proliferace, diferenciaci, přežití a produkce cytokinů). Je vyžadován druhý signál, který je poskytován ko-stimulujícími molekulami - CD28, CD80 a CD86 (Esensten et al., 2016) (Obr. 4b). K převodu aktivačního signálu a interakci mezi T lymfocyty a cílovou buňkou přispívají svým působením také CD4 a CD8 koreceptory. Koreceptor CD4 je exprimován na povrchu pomocných  $T_h$  a regulačních  $T_{reg}$  lymfocytech a je vyžadován pro rozpoznání molekuly MHCII. Oproti tomu koreceptor CD8 je exprimován na cytotoxických T lymfocytech a je vyžadován pro rozpoznání molekuly MHCI. Funkční synergie mezi TCR a koreceptory je založená na vazbě s invariantní oblastí MHC molekul a na spojení cytoplazmatických konců s proteinovými kinázami (např. *Lck* z *angl. lymphocyte-specific tyrosine kinase*), které se podílejí na ITAM zprostředkované transdukci signálu, jakmile jsou přivedeny do těsné blízkosti TCR/CD3 komplexu (Artyomov et al. 2010).



**Obrázek 4.**

- a) Schematické zobrazení molekuly T-buněčného receptoru a jeho α a β řetězce, obsahující variabilní (V) a konstantní (C) doménu a spojovací (S), transmembránovou (T) a cytoplazmatickou (C) oblast (převzato a upraveno od Kindt et al., 2007).
- b) Schematické zobrazení převodu signálu receptorem TCR. Na obrázku je zobrazena aktivace CD8<sup>+</sup> T lymfocytu. Aktivace T lymfocytu je proces závislý na antigenu, který vede k proliferaci a diferenciaci naivních T lymfocytů do efektorových T lymfocytů. Tento proces vyžaduje primární a koaktivací signály spouštějící intracelulární fosforylační kaskády a novou genovou expresi. Signál 1 nastane, když se TCR váže na cizí antigen prezentovaný molekulou hlavního histokompatibilního komplexu MHC-I na povrchu antigen-presentující buňky (APC) / cílové buňky a koreceptor CD8 váže molekulu MHC-I. Signál 2 vzniká koaktivací molekuly CD28 u T lymfocytu s molekulami ko-stimulujících proteinů (CD80 / CD86) na APC / cílové buňce. Kinázy asociované s koreceptorem CD8 jsou potom přivedeny do blízkosti CD3 komplexu a dochází k fosforylaci ITAM motivů, které pak interagují s jinými kinázami, podporující signální transdukcí vedoucí k produkci cytokinů, stejně jako proliferaci a diferenciaci buněk (převzato a upraveno od Tendeiro et al., 2018)

### 2. 3. 2. 1 Diverzita TCR

TCR diverzita je somaticky generována pomocí genových přestaveb, které umožňují, aby z omezené sady genů bylo produkováno několik různých receptorů. Existují celkem čtyři genové lokusy, které kódují TCR – *TRA*, *TRB*, *TRD*, *TRG*. Každý z nich kóduje jeden ze čtyř TCR řetězců α, β, γ a δ. U každého lokusu můžeme nalézt tři nebo čtyři genové

segmenty – variabilní (V), spojovací (J), diverzifikační (D) a konstantní (C). K produkci funkčního TCR genu dochází při brzké diferenciaci T lymfocytů a při procesu zvaném V(D)J rekombinace. Jedná se o genové přeskupení výše zmíněných segmentů na základě rekombinace (Davis et Bjorkman, 1988). Variabilní doména molekuly TCR vzniká přeskupením V, D, a J segmentů, zatímco konstantní oblast je kódována C segmenty. Ke zprostředkování V(D)J rekombinace je potřeba enzymatického komplexu obsahujícího 2 specifické proteiny – RAG1 a RAG2 (z *angl. recombinase-activating gene*), které rozpoznávají a štěpí DNA v oblastech rekombinačních signálních sekvencí. Tyto oblasti se nachází na okrajích V, D, J segmentů, konkrétně na 3' konci V segmentů, 5' konci J segmentů a obou koncích D segmentů. (Olaru et al., 2005).

V rámci TRA lokusu jsou V a J segmenty rekombinovány a vzájemně srovnány s C segmentem vedle sebe. Rekombinace u TRB lokusu je obdobná jako u TRA lokusu s tím rozdílem, že je zde přítomen ještě D segment. D segment je obsažen také u TRD lokus, který se nachází uvnitř TRA lokusu, a proto se v případě TRA lokusu spíše užívá označení TRA/TRD lokus. Variabilita TCR je omezena převážně třemi krátkými vlásenkovými smyčkami (CDR1, CDR2, CDR3) na každém řetězci. CDR1 a CDR2 smyčky jsou kódovány v zárodečné linii variabilními segmenty  $\alpha$  a  $\beta$  řetězce (TRAV, TRBV). Naopak CDR3 smyčky jsou generovány náhodnou delecí nebo adicí templátových nukleotidů ve spojích mezi rekombinačními genovými segmenty V, (D) a J (Gras et al., 2010).

$\gamma\delta$  TCR jsou také generovány V(D)J rekombinací. Předpokládá se, že v důsledku začlenění více segmentů D, které lze přeložit do libovolného čtecího rámce, je řetězec TCR-  $\delta$  nejrozmanitějším řetězcem TCR. Z toho vyplývá, že teoretický počet různých  $\gamma\delta$  TCR, který by mohl být produkován, je potenciálně mnohem větší než pro  $\alpha\beta$  TCR (Attaf et al., 2015).

Ke zvýšení diverzity TCR repertoáru přispívá jednak polymorfismus v TRBV segmentu a možnost využití více než jednoho genového D segmentu současně u TRD lokusu (Girardi, 2006). U lidí může teoreticky samotná V(D)J rekombinace genových segmentů produkovat až  $10^{18}$  TCR (Sewell, 2012).

### 2. 3. 2. 2 TRB lokus a jeho genové V $\beta$ rodiny

Lidský TRB lokus se v rámci genomu nachází v oblasti 7q35 a dosahuje velikosti 620 kb. Skládá se ze 64 až 67 genů TRBV, které se dále dělí do 32 podskupin. Skoro všechny TRBV geny jsou umístěny po směru transkripce před duplikovaným DJC-clusterem,

který se dělí na dvě části obsahující pro první část jeden TRBD gen, šest TRBJ genů a jeden gen *TRBC1*, a pro druhou část jeden TRBD gen, osm TRBJ genů a jeden gen *TRBC2*. Oproti tomu gen *TRBV30* je jako jediný lokalizovaný v invertovaném směru transkripce hned za genem *TRBC2*. Většina TRBV genů zaujímá centromerickou pozici, zatímco *TRBV30* gen nacházející se na 3' konci lokusu je nejvíce telomerním genem v TRB lokusu. Potenciální repertoár se skládá ze 40 až 48 funkčních genů TRBV, které patří do 21 až 23 podskupin, dvou TRBD genů, třinácti TRBJ genů (6 z prvního klastru a 7 z druhého klastru) a dvou TRBC genů. Bylo lokalizováno šest samostatných nefunkčních TRBV, které se nachází na chromozomu 9 v oblasti 9p21. Celkový počet lidských TRB genů na haploidní genom je 82 až 85, respektive 88 až 91, pokud jsou zahrnuty geny na 9. chromozomu, z nichž 57 až 65 je funkčních (Lefranc, 2001).

Segmenty V $\beta$  genů jsou od sebe odlišeny specifickým pojmenováním podle své rodiny, a podle toho, jak úzce souvisí s ostatními členy rodiny. Tradičně 75 % shoda na úrovni nukleotidů byla použita jako mezní hodnota mezi podrodinami (Toyonaga et Mak, 1987; Wilson et al. 1988). Velké množství V $\beta$  genových segmentů má za následek určitý počet nedorozumění v literatuře, protože existuje mnoho případů, kdy různé skupiny vědců daly stejnému genu různé názvy nebo různé geny pojmenovaly stejným názvem. K vyřešení těchto problémů byla vytvořena mezinárodní skupina, která přiřazuje konzistentní názvy všem variabilním genovým segmentům. Jedním z prvních způsobů pojmenovávání je podle Světové zdravotnické organizace WHO-IUIS Nomenclature Sub-Committee on TCR Designation (Kazatchkine, 1995), kdy jsou jednotlivé V $\beta$  genové segmenty a jejich alely označeny číslem podle pořadí objevu. Srovnáním dosavadních V $\beta$  genových segmentů a odlišením jejich společných alel byla ze 138 specifických sekvencí získána skupina 65 V $\beta$  genových segmentů (Arden et al., 1995). Na základě sekvenční homologie pak bylo těchto 65 V $\beta$  genových segmentů rozděleno do 34 V $\beta$  genových rodin, přičemž každý člen dané rodiny je z více než 75 % homologní na úrovni nukleotidů s alespoň jedním dalším členem stejné rodiny (Rowen et al., 1996). V jedné V $\beta$  genové rodině nemusí být vždy jen jeden nebo dva typy V $\beta$  genových segmentů. Existují V $\beta$  genové rodiny, které jsou vícečlenné, například V $\beta$ 8 a V $\beta$ 13, které obsahují 5 a 8 V $\beta$  segmentů (Arden et al., 1995).

Dalším způsob pojmenovávání je podle Rowen et al., kdy jsou přiřazována čísla jednotlivým V $\beta$  genovým segmentům podle svého pořadí v TRB lokusu. Za využití této nomenklatury jsou V $\beta$  genové segmenty rozděleny do 30 V $\beta$  genových rodin. Vychází



z ní genomová databáze genů pro TCR a imunoglobuliny vyvinutá za účelem organizace znalostí o genech a jejich klasifikace, IMGT (Folch et Lefranc, 2000).

65 V $\beta$  genových segmentů lze snadno rozdělit na funkční geny a pseudogeny výpočtovou analýzou na úrovni DNA. Pseudogenní léze mohou vzniknout z chyb v genové expresi (selhání transkripce, sestřihu RNA, translace nebo přeskupení DNA) nebo proteinové struktury (předčasné ukončení, nesprávné překlady čtecího rámce nebo substituce kompromitující funkci proteinu). Podle těchto kritérií se 46 V $\beta$  genových segmentů jeví jako funkční a 19 z nich představují pseudogeny (Rowen et al., 1996).

Diversitu V $\beta$  genových segmentů zvyšuje jejich polymorfismus. Na rozdíl od vysokého stupně polymorfismu MHC antigenů, je polymorfismus detekovaný ve V $\beta$  genových segmentech TRB lokusu omezený. Existují omezené počty alel pro jednotlivé V $\beta$  genové segmenty, řádově do 10 alel. Tyto alely se liší v jednom nebo několika málo nukleotidech (Day et al. 1994).

## 2. 4 Imunoterapie

### 2. 4. 1 Receptory PD-1 a CTLA-4

Klíčovým požadavkem imunitního systému je odlišit sebe od ostatních. I když je tento koncept jednoduchý, jeho implementace je velice složitá. V centru tohoto procesu je rozpoznávání a vazba TCR na antigen připojený k MHC komplexu na povrchu APC buněk. Mnohé další faktory pak ovlivňují, zda tato vazba vede k aktivaci T lymfocytů nebo anergii (tj. nedostatečná imunitní reakce na antigen). Diferenciace T lymfocytů začíná v brzlíku, kde nezralé buňky proliferují a vytvářejí široký repertoár TCR prostřednictvím rekombinace genových segmentů TCR. Poté začíná selekční proces a T lymfocyty se silnou reaktivitou vůči vlastním peptidům jsou v brzlíku odstraněny, aby se zabránilo autoreaktivitě v procesu nazývaném centrální tolerance (Goldrath et Bevan, 1999). T lymfocyty s nedostatečnou vazbou s MHC komplexem podléhají apoptóze, ale ty, které mohou slabě reagovat na molekuly MHC a vlastní peptidy, nejsou eliminovány a jsou uvolňovány jako naivní buňky pro cirkulaci krví, slezinou a lymfatickými orgány. Jsou zde vystaveny profesionálním APC, které vykazují cizí antigeny (v případě infekce) nebo mutované vlastní proteiny (v případě malignity). Některé TCR mohou mít specifitu, která je zkříženě reaktivní s vlastními antigeny. Aby se zabránilo autoimunitě, během imunitní reakce dochází v několika krocích k regulaci aktivace T lymfocytů mnoha imunitními kontrolními drahami, což je proces nazývaný periferní tolerance (Fife et Bluestone, 2008). Patří sem dráha receptoru CTLA-4 (z *angl. cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*) a dráha receptoru PD-1 (z *angl. programmed death receptor 1*) (Greenwald et al., 2005). Předpokládá se, že CTLA-4 a PD-1 dráhy působí v různých stádiích imunitní reakce. CTLA-4 je považován za „vůdce“ inhibitorů imunitního kontrolního bodu, protože zastavuje potenciálně autoreaktivní T lymfocyty v počátečním stadiu aktivace naivních T lymfocytů v lymfatických uzlinách (Krummel et Allison, 1995). PD-1 dráha reguluje dříve aktivované T lymfocyty v pozdějších stádiích imunitní reakce, především v periferních tkáních (Fife et Bluestone, 2008). Klíčovým konceptem v imunoterapii nádorů je, že nádorové buňky, které by normálně byly rozpoznávány T lymfocyty, vyvinuly způsoby, jak se vyhnout imunitnímu systému hostitele využíváním periferní tolerance (Dunn et al., 2004). Inhibice drah imunitního kontrolního bodu vedla k vývoji několika nových léků: ipilimumab (anti-CTLA-4), nivolumab a pembrolizumab (anti-PD-1). Existují klíčové podobnosti a rozdíly v těchto cestách, což má dopad na terapii zhoubných nádorů (Buchbinder et Desai, 2016).

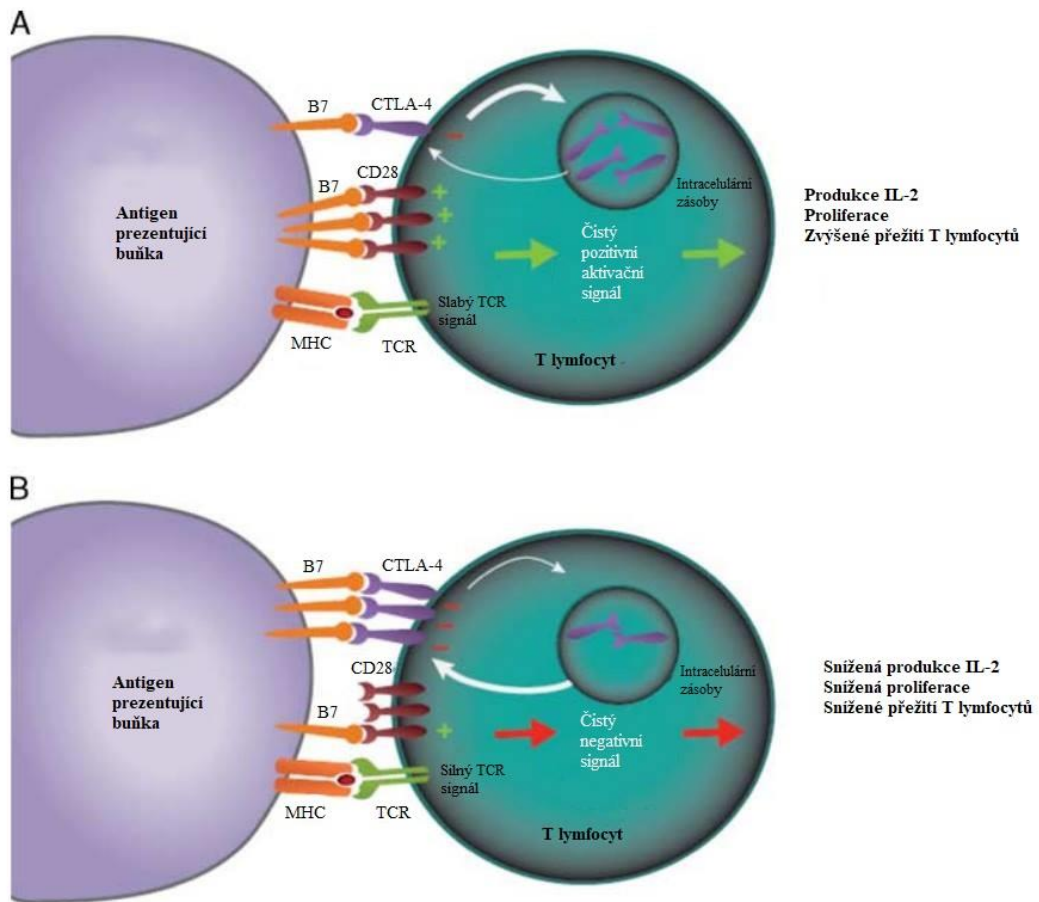
#### 2. 4. 1. 1 Dráha CTLA-4

Aktivace T lymfocytů je komplexní proces, který vyžaduje více než jeden stimulační signál. Vazba TCR na MHC poskytuje specifitu k aktivaci T lymfocytů, ale jsou zapotřebí další kostimulační signály. Ty jsou zprostředkovány vazbami molekul B7-1 (CD80) nebo B7-2 (CD86) vyskytujícími se na APC s molekulami CD28 vyskytujícími se na T lymfocytu. Dostatečné hladiny vazby CD28:B7-1/2 vedou k proliferaci a zvýšení přežití T lymfocytů, diferenciaci a produkci cytokinů, jako je například IL-2 (Buchbinder et Desai, 2016).

CTLA-4 (CD152) je homolog CD28 s mnohem vyšší vazebnou afinitou pro B7; na rozdíl od CD28 však vazba CTLA-4 na B7 nevyvolává stimulační signál. Tato kompetitivní vazba tak může zabránit vzniku kostimulačního signálu normálně poskytovaným vazbou CD28:B7 (Obr. 5) (Chambers et al., 2001). Relativní velikost vazby CD28:B7 versus vazba CTLA-4:B7 určuje, zda bude T lymfocyt podroben aktivaci nebo anergii (Krummel et Allison, 1995). Dále některé důkazy naznačují, že vazba CTLA-4 na B7 může ve skutečnosti produkovat inhibiční signály, které působí proti stimulačním signálům poskytovaným vazbami CD28:B7 a TCR:MHC. Navrhované mechanismy pro takové inhibiční signály zahrnují přímou inhibici TCR, inhibici CD28 nebo jeho signální dráhy nebo zvýšenou mobilitu T lymfocytů vedoucí ke snížené schopnosti interakce s APC buňkami (Masteller et al., 2000). CTLA-4 samotný podléhá regulaci, zejména podle lokalizace v buňce. V klidových naivních T lymfocytech se CTLA-4 nachází primárně v intracelulárním kompartmentu. Stimulační signály vzešlé jak z vazby TCR:MHC, tak CD28:B7, indukují upregulaci CTLA-4 na buněčném povrchu exocytózou vezikulů obsahujících CTLA-4 (Linsley et al., 1996). Silnější signalizace TCR vyvolává více CTLA-4 translokací na buněčný povrch. V případě čistého negativního signálu prostřednictvím vazby CTLA-4:B7 je plná aktivace T lymfocytů zabráněna inhibicí produkce IL-2 a progresí buněčného cyklu (Krummel et Allison, 1996).

CTLA-4 se také podílí na dalších aspektech imunitní kontroly. Regulační T lymfocyty ( $T_{reg}$ ) kontrolují funkce efektorových T lymfocytů a jsou klíčovými hráči při udržování periferní tolerance. Na rozdíl od efektorových T lymfocytů,  $T_{reg}$  podstatně exprimuje CTLA-4, což je považováno za důležité pro jejich supresivní funkce. Ve zvířecích modelech genetický deficit CTLA-4 u  $T_{reg}$  zhoršil jejich supresivní funkce. Jedním z mechanismů, o kterých se předpokládá, že jimi  $T_{reg}$  regulují efektorové T buňky,

je downregulace B7 ligandů na APC, což vede ke snížení kostimulace CD28 (Wing et al., 2008).

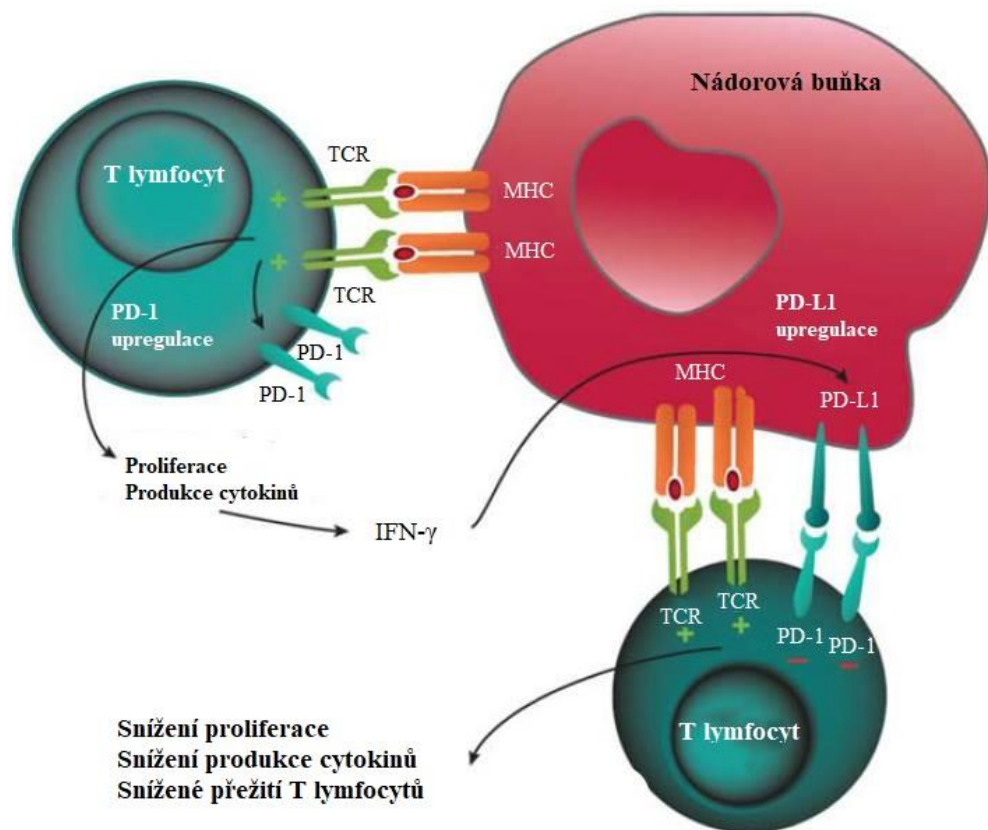


**Obrázek 5.** Inhibice T lymfocytů zprostředkovaná CTLA-4. T lymfocyty jsou aktivovány, když TCR váže antigen, který je představen MHC komplexem na APC buňkách společně s kostimulací zprostředkovanou vazbou CD28: B7.

- a) V případě slabého stimulu TCR, převažuje vazba CD28:B7, což má za následek čistý pozitivní aktivací signál a produkci IL-2, proliferaci a zvýšené přežití T lymfocytů.
- b) V případě silného stimulu TCR je zvýšena exprese CTLA-4. To je zapříčiněno zvýšeným transportem CTLA-4 na buněčný povrch z intracelulárních zásob a sníženou internalizací (tj. přesun molekuly z vnějšího povrchu buňky do nitra buňky). CTLA-4 soutěží s CD28 o vazbu B7 molekul. Zvýšení vazby CTLA-4: B7 má za následek čistý negativní signál, který omezuje produkci IL-2, proliferaci a přežití T lymfocytů (převzato a upraveno od Buchbinder et Desai, 2016).

#### 2. 4. 1. 2 Dráha PD-1

PD-1 (CD279) je členem skupiny kostimulačních receptorů B7/CD28. Reguluje aktivaci T lymfocytů prostřednictvím vazby na vlastní ligandy, ligand programované buněčné smrti 1 (PD-L1, CD274) a ligand programované buněčné smrti 2 (PD-L2, CD273). Podobně jako signalizace CTLA-4, vazba s PD-1 inhibuje proliferaci T lymfocytů a produkci IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  (z *angl. tumor necrosis factor- $\alpha$* ), IL-2 a snižuje přežití T lymfocytů (Obr. 6) (Keir et al., 2008). Pokud T lymfocyt vykazuje souběžné vázání TCR a PD-1, signály generované PD-1 zabraňují fosforylaci klíčových meziproduktů signalizace TCR, což ukončuje jeho časnou signalizaci a snižuje se aktivace T lymfocytů (Bennett et al., 2003). Exprese PD-1 je charakteristickým znakem „vyčerpaných“ T lymfocytů, které vykazovaly vysokou úroveň stimulace nebo sníženou pomoc CD4<sup>+</sup> T lymfocytů. Tento stav vyčerpání, ke kterému dochází během chronických infekcí a nádorového onemocnění, je charakterizován dysfunkcí T lymfocytů, což vede k suboptimální kontrole infekcí a nádorů (Buchbinder et Desai, 2016).



**Obrázek 6.** Inhibice T lymfocytů zprostředkovaná PD-1. T lymfocyty rozpoznávající nádorové antigeny mohou být aktivovány pro proliferaci, vylučování zánětlivých cytokinů a odolávání buněčné smrti. Prodloužená stimulace TCR během probíhající imunitní reakce může způsobit zvýšení exprese PD-1. Nádorové buňky mohou exprimovat PD-L1 a PD-L2 jako důsledek zánětlivých cytokinů nebo onkogenních signálních drah. PD-1:PD-L1 vazba inhibuje pozitivní signalizaci zprostředkovanou TCR, což vede ke snížené proliferaci, snížené sekreci cytokinů a sníženému přežití T lymfocytů (převzato a upraveno od Buchbinder et Desai, 2016)

CTLA-4 i PD-1 má podobné negativní účinky na aktivitu T lymfocytů. Nicméně časování downregulace, odpovědné signální mechanismy a anatomická místa imunitní inhibice se liší. Na rozdíl od CTLA-4, který je omezen na T lymfocyty, je PD-1 více exprimován na aktivovaných T lymfocytech, B lymfocytech a myeloidních buňkách. CTLA-4 funguje během primární fáze aktivace T lymfocytů, naopak PD-1 funguje během fáze efektoru, převážně v periferních tkáních (Keir et al., 2008). Distribuce ligandů PD-1 se také liší od distribuce ligandů CTLA-4. Ligandy B7 pro CTLA-4 jsou exprimovány profesionálními APC buňkami, které se obvykle nacházejí v lymfatických uzlinách nebo slezině (Fife et Bluestone, 2008). PD-L1 je exprimován na leukocytech, na

nehematopoetických buňkách a v nelymfoidních tkáních. Dále může být indukován na parenchymálních buňkách pomocí zánětlivých cytokinů (IFN- $\gamma$ ) nebo nádorových signálních drah (Chen, 2004). K expresi PD-L1 také dochází na mnoha různých typech nádorů, a to bývá spojováno se zvýšeným množstvím lymfocytů infiltrujících nádor (TIL, z *angl. tumor-infiltrating lymphocytes*) (Taube et al., 2014). PD-L2 je primárně exprimován na dendritických buňkách a monocytech, ale může být indukován i u jiných imunitních a neimunitních buněk v závislosti na místním mikroprostředí (Rozali et al., 2012). PD-1 má vyšší vazebnou afinitu pro PD-L2 než pro PD-L1 a tento rozdíl může být zodpovědný za rozdílné efekty těchto ligandů k imunitní odpovědi. Vzhledem k tomu, že ligandy PD-1 jsou exprimovány v periferních tkáních, předpokládá se, že jejich interakce s PD-1 udržují toleranci v lokálně infiltrovaných tkáních (Fife et Bluestone, 2008).

Rozmanitost ligandů pro PD-1 vede k různým biologickým účinkům v závislosti na tom, který ligand je vázán. Tyto různé biologické účinky pravděpodobně přispívají k rozdílu v aktivitě a toxicitě mezi protilátkami namířenými proti PD-1 (zabraňující vazbě na oba ligandy), na rozdíl od protilátek namířených přímo proti PD-L1 (Buchbinder et Desai, 2016).

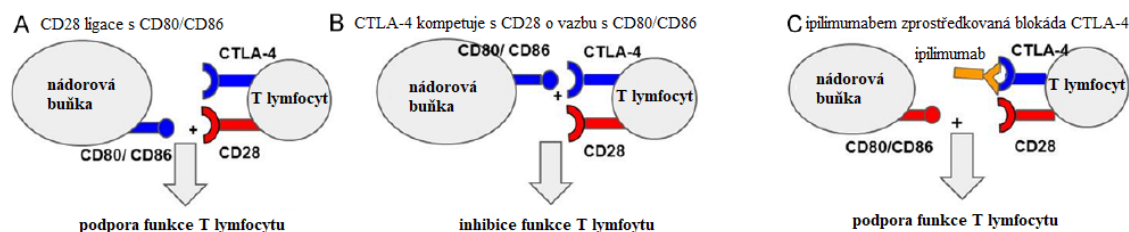
#### 2. 4. 2 Checkpoint inhibitory

Checkpoint inhibitory jsou novou třídou protinádorových léčiv. Tyto protilátky se zaměřují na normální imunitní buňky, aby stimulovaly protinádorovou odpověď. Pracují tak, že blokují interakce mezi inhibičními receptory exprimovanými na T lymfocytech a jejich ligandy. V onkologii jsou dvě hlavní třídy checkpoint inhibitorů, které jsou v klinickém vývoji nejpokročilejší, anti-CTLA-4 a anti-PD-1/PD-L1 protilátky. Šest z těchto protilátek (ipilimumab, nivolumab, pembrolizumab, avelumab, atezolizumab a durvalumab) bylo schváleno úřadem pro kontrolu potravin a léčiv FDA (z *angl. Food and Drug Administration*) pro klinické použití. Checkpoint inhibitory mohou mít účinnost u celé řady typů nádorů. Na tyto léky však reagují pouze určité podskupiny pacientů. Navíc mohou vyvolat toxicitu podobnou autoimunitě (Manson et al., 2016).

##### 2. 4. 2. 1 CTLA-4 blokáda (Ipilimumab)

Inhibice dráhy CTLA-4 je typem imunoterapie, která indukuje nebo zvyšuje protinádorové imunitní reakce. Ipilimumab je prvním checkpoint inhibitorem schváleným úřadem FDA (Azoury et al., 2015). Jedná se o monoklonální protilátku rekombinantního lidského imunoglobulinu IgG1 zaměřenou na receptor CTLA-4.

Ipilimumab je tím, že se váže na receptor CTLA-4, schopen blokovat jeho interakci s molekulami CD80 nebo CD86 a umožňuje tak optimální interakci mezi molekulami CD28 na T lymfocytech s molekulami CD80/86 na APC buňkách, což vede k optimální aktivaci T lymfocytů (Obr. 7) (Patel et Woodman, 2011).



**Obrázek 7.** CTLA-4 blokáda při léčbě melanomů (převzato a upraveno od Jazirehi et al., 2016).

- Za normálních podmínek ligace CD28 s CD80 nebo CD86, jsou T lymfocyty aktivovány. Negativní regulační signální molekula CTLA-4 soutěží s CD28 ve vazbě na ligandy rodiny B7.
- CTLA-4 ligace ligandů rodiny B7 inhibuje funkčnost T lymfocytů (proliferace, aktivace, sekreci cytokinů).
- Protilátka namířená proti receptoru CTL-4 inhibuje jeho vazbu k ligandům rodiny B7, čímž podporuje funkčnost T lymfocytů.

Ipilimumab prokázal významný přínos ve zlepšování celkového přežití u pacientů postižených metastatickým melanomem ve dvou studiích fáze III, a to ve studii MDX010-20, která porovnávala ipilimumab s vakcínou proti glykoproteinu 100 a studii CA184-024, ve kterém byla standardní léčba (dakarbazin) srovnána s léčbou, při které byl dakarbazin podáván společně s ipilimumabem. V rámci studie MDX010-20 bylo 676 pacientů randomizováno do 3 skupin, které se lišily užíváním jednotlivých léčiv. V první skupině dostávali ipilimumab v dávce 3 mg/kg v kombinaci s gp100 vakcínou, ve druhé skupině 3 mg/kg ipilimumabu samotně a ve třetí skupině samotně gp100 vakcínou. Ipilimumab prokázal, že medián doby celkového přežití je 10 měsíců. Pacienti, kteří měli progresi onemocnění a vykazovali dlouhodobou odpověď nebo částečnou/úplnou odpověď byli následně léčeni reindukcí ipilimumabu (Scarpati et al., 2014). V rámci studie CA184-024 byli pacienti randomizováni do dvou skupin. V první skupině dostávali ipilimumab v kombinaci s dakarbazinem, ve druhé kontrolní skupině byl podáván jen dakarbazin. Ipilimumab byl podáván v dávce 10 mg/kg v podobě 4 infuzí a v intervalu 3 týdnů, následně po dobu 12 týdnů do progresse onemocnění. Tato studie podpořila myšlenku, že ipilimumab je závislý na dávce a že zvyšující se dávky od 0,3 do 10 mg/kg



zvysují procento odezvy u pacientů. Přidání ipilimumabu k dakarbazinu tak zlepšilo celkové přežití pacientů. Medián doby celkového přežití byl zvýšen na 11,2 měsíce (Robert et al., 2011). Ipilimumab dále prokázal neobvykle dlouhodobé odezvy u jednotlivých pacientů a relativně vyšší míru odezvy (od 10 % do 15 %) než u tradičních léčiv nebo inhibitorů BRAF (Tarhini, 2013).

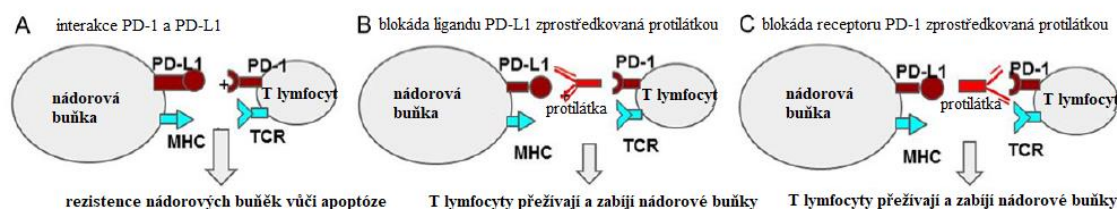
Přesný mechanismus, kterým ipilimumab indukuje protinádorovou odpověď, je nejasný, i když výzkum doposud naznačuje, že blokáda CTLA-4 ovlivňuje fázi imunitního primingu podporou aktivace a proliferace vyššího počtu efektorových T lymfocytů bez ohledu na TCR specificitu, a snížením T<sub>reg</sub>-zprostředkované suprese odpovědi T lymfocytů (Buchbinder et Desai, 2016). Bylo ovšem zjištěno, že CTLA-4 blokáda u pacientů s melanomem, zvyšuje diverzitu periferních T lymfocytů (Robert et al., 2014). Studie s ipilimumabem u pacientů s melanomem nebo karcinomem prostaty poskytla důkazy, že základní profil T lymfocytů může být také důležitý. Při počáteční léčbě a následně dalším pokračování léčby byl prokázán okamžitý obrat repertoáru T lymfocytů. Byly identifikovány jak expanze, tak i ztráty jednotlivých klonotypů T lymfocytů, ovšem stále docházelo k čistému zvýšení diverzity TCR repertoáru (Cha et al., 2014). Celkové přežití však bylo spojeno s udržováním klonů přítomných ve vysoké frekvenci na výchozích hodnotách. U pacientů s kratším celkovým přežitím se počet těchto nejvyšších frekvencí klonů snížil společně při aplikování léčby. Tato zjištění naznačují, že účinná blokáda CTLA-4 může záviset na schopnosti zachovat již existující T lymfocyty s vysokou aviditou (Buchbinder et Desai, 2016).

Léčba plně humánní anti-CTLA-4 monoklonální protilátkou ipilimumabem je typicky spojena s nástupem nežádoucích účinků souvisejících s imunitou (irAE, z *angl. immune-related adverse events*), které silně souvisejí s jeho mechanismem účinku založeným na imunitě. CTLA-4 blokáda odstraňuje ochranu zprostředkovanou CTLA-4 před autoimunitou a je zodpovědná za široké spektrum autoimunitně-zánětlivých vedlejších účinků (Di Giacomo et al., 2010). Ačkoli dávky 3 mg/ kg produkují slabší reakce než dávky 10 mg/kg, vyšší dávky vedou k vyšším úrovním toxicity (Simeone et al., 2014). Retrospektivní analýza několika studií léčby ipilimumabem u pacientů s pokročilým melanomem ukázala, že irAE se vyskytly u přibližně 64,2 % léčených pacientů z čehož z 1 % vyústily v úmrtí (Scarpati et al., 2014). Nejběžnější irAE jsou vyrážka, kolitida, hepatitida a hypofyzitida. Tyto irAE se projevily zejména během indukční fáze. Více než 50 % pacientů mělo těžké vyrážky, které byly spojeny s hlubokými dermálními a perivaskulárními infiltráty lymfocytů. V 16 % případech se

u pacientů objevila také enterokolitida 3.–4. stupně. Přestože jsou irAE nevyhnutelné, mohou korelovat s regresí tumoru u pacientů s nádorovým onemocněním. U pacientů léčených ipilimumabem, u kterých se vyskytly irAE 3.–4. stupně, bylo hlášeno, že mají významně vyšší míru regrese tumoru než pacienti bez irAE (36 % oproti 5 % pacientů). U pacientů s diagnózou melanomu, kteří byli léčeni ipilimumabem bylo zjištěno, že míra objektivní odezvy byla významně vyšší než u pacientů, u kterých nedošlo k enterokolitidě (36 % oproti 11 %) (Luke et Ott, 2015).

#### 2. 4. 2. 2 PD-1 blokáda (nivolumab a pembrolizumab)

Blokáda PD-1 (Obr. 8) funguje během efektorové fáze a dochází k obnovení imunitní funkce T lymfocytů na periferii, které byly vypnuty po prodloužené nebo vysoké hladině expozice antigenu, jako tomu je u pokročilých nádorů. Ligandy pro PD-1 mohou být exprimovány nádorovými buňkami. Exprese PD-L1 v nádorových buňkách se liší podle typu nádoru. Avšak zdá se, že exprese je zvláště vysoká u melanomu, nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC, z *angl. non-small cell lung cancer*) a nádoru vaječníků. Ukázalo se, že exprese PD-L1 na nádorových buňkách je významně asociovaná s expresí PD-1 na TIL a byla lokálně asociovaná s expresí PD-L2, kdy byl tento ligand také exprimován (Taube et al., 2014). Mezi monoklonální protilátky, které cílí na PD-1 můžeme zahrnout nivolumab a pembrolizumab (Tsai et al., 2014).



**Obrázek 8.** PD-1 blokáda při léčbě melanomu (převzato a upraveno od Jazirehi et al., 2016).

- Za normálních podmínek ligace PD-1 s PDL-1 nebo PDL-2 dochází k negativní stimulaci T lymfocytů, takže i v přítomnosti TCR, který rozpoznává peptid/MHC komplex jsou T lymfocyty neaktivní k usmrcení nádorových buněk.
- Protilátka namířená proti receptoru PD-1 nebo c) ligandu PD-L1 navázáním podporuje funkčnost T lymfocytů a eradikaci nádorových buněk.

Nivolumab je plně humánní IgG4 monoklonální protilátka proti receptoru PD-1. V roce 2010 byly publikovány výsledky první studie fáze I u člověka s anti-PD-1 látkou, která hodnotila jeho bezpečnost a snášenlivost v souboru 39 pacientů s pokročilými refrakterními (tj. nereagujícími na léčbu) solidními nádory. Nivolumab byl pacientům

podáván ve zvyšujícím se dávkování od 0,3 mg/kg až po 10 mg/kg. Výsledky ukázaly, že nivolumab byl velice dobře tolerován až na jeden případ, kdy se u pacienta objevil závažný nežádoucí účinek (kolitida). Účinnost nivolumabu byla posuzována podle kritéria RECIST (z *angl. Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*). U jednoho pacienta došlo k úplné remisi nemoci, následně u dvou dalších pacientů k částečné remisi a u dvou jiných pacientů bylo pozorováno jen zmenšení nádoru (Brahmer et al., 2010). V roce 2014 byly publikovány výsledky větší studie fáze I, do které bylo zařazenou 296 pacientů, z toho 107 pacientů s melanomem. Byl testován vícedávkový režim s dávkami v rozmezí 0,1 až 10 mg/kg podávanými jednou za 2 týdny v 8týdenním léčebném cyklu. Celková míra odezvy na nivolumab u pacientů s melanomem byla 31 %, avšak při dávce 3 mg/kg byla pozorována až 41 % míra odezvy. Medián doby přežití bez progresse nemoci byl 3,7 měsíců (9,7 měsíce při dávce 3 mg/kg), medián doby trvání odezvy u 33 reagujících pacientů byl 24 měsíců (17,3 měsíců při dávce 3 mg/kg) a medián doby celkového přežití byl 16,8 měsíců (20,3 měsíce při dávce 3 mg/kg) (Topalian et al., 2014). Co se týče toxicity, mezi nejběžnější nežádoucí účinky patřila únava (32 %), vyrážka (23 %) a průjem (18 %), přičemž u 22 % pacientů došlo vyvinutí irAE 3. až 4. stupně. U pacientů s melanomem nebyla pozorována žádná úmrtí související s nivolumabem, ale v celkové populaci pacientů byla zaznamenána 3 úmrtí, která byla spojena s pneumonitidou, a to u dvou pacientů s NSCLC a jednoho s kolorektálním karcinomem (Topalian et al., 2012).

Pembrolizumab je humanizovaná monoklonální IgG4 protilátka proti PD-1. Počáteční studie fáze I hodnotící pembrolizumab zahrnovala 135 pacientů s metastatickým melanomem a léčila je dávkami v rozmezí od 2 mg/kg každé 3 týdny do 10 mg/kg každé 2 týdny. Byla pozorována slibná protinádorová aktivita (celková míra odezvy byla 38 % ve všech dávkách) a přijatelná bezpečnost (Hamid et al., 2013). Hlavní klinický přínos byl však zaznamenán až v následné kohortové studii, kdy bylo randomizováno 173 pacientů s progresivním, neresekovatelným melanomem, kteří dostali alespoň předchozí 2 dávky ipilimumabu a pak každé 3 týdny následně 2 nebo 10 mg/kg pembrolizumabu (Tsai et al., 2014). Celková míra odezvy u obou dávek byla 26 %. Medián doby přežití bez progresse nemoci byl pro dávku 2 mg/kg 22 týdnů a pro dávku 10 mg/kg 14 týdnů. Pembrolizumab byl dobře snášen a profily nežádoucích účinků byly podobné mezi oběma dávkovými skupinami. Nežádoucí účinky související s pembrolizumabem se objevily u 82 % pacientů v obou dávkových skupinách. Nejčastěji se objevila únava, svědění a vyrážka. irAE 3.–4. stupně se vyskytly pouze u 3 pacientů, a to autoimunitní hepatitida, makulopapulární vyrážka a pankreatitida (Tsai et al., 2014).

V rámci dvou studií fáze I, u pokročilého melanomu byla také prokázána slibná aktivita protilátek anti-PD-L1, i když s obecně nižší mírou odpovědi než protilátky anti-PD-1. Patří sem protilátka MDX-1105, která je vysoce afinitní, plně humánní, PD-L1-specifická, imunoglobulinová IgG4 monoklonální protilátka, která také inhibuje vazbu PD-L1 na PD-1. Další příkladem je lidská monoklonální protilátka známá jako atezolizumab, která má geneticky upravenou Fc-doménou cílicí PD-L1 (Tsai et al., 2014) a má schválenou terapeutickou indikaci. Další léčiva proti PD-L1 durvalumab a avelumab jsou předmětem výsledků klinických studií a také mají schválené terapeutické indikace. V současné době se vyvíjí i jedna protilátka proti PD-L2 (AMP- 224), která je zatím používána v rámci monoterapie (Tsai et al.,2014).

### 3 Materiál a metody

#### Přístroje:

centrifuga

průtokový cytometr BD FACSVersé (BD Biosciences, EU)

vortex

počítač se specializovaným programem pro průtokový cytometr (program - BD FACSuite)

#### Pomůcky:

automatická pipeta (5 µl, 200 µl, 1 ml), sterilní špičky k pipetám, 10 ml sterilní zkumavky, 1,5 µl sterilní mikrozukavky

#### Chemikálie:

PBS pufr (1× ředěný; 7,4 pH, Thermo Fisher Scientific, USA), Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, USA), přímo značené protilátky anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 (SONY, Japonsko) viz tab. 1, Beta Mark TCR Vβ Repertoire Kit (Beckman Coulter, USA) viz tab. 2.

**Tabulka 1:** Seznam přímo značených protilátek anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8

Název	Fluorochrom	Katalogové číslo	Klon	Isotyp (druh)
Pacific Blue™ anti-human CD3	Pacific Blue	2102155	UCHT1	IgG1, κ (mouse)
APC/Cy7 anti-human CD4	APC/Cy7	2102590	RPA-T4	IgG1, κ (mouse)
APC anti-human CD8	APC	2323610	SK1	IgG1, κ (mouse)

APC – alophycocyanin

Cy7 – cyanin 7

**Tabulka 2:** Seznam přímo značených protilátek TCR V $\beta$  Repertoire Kitu

Testová lahvička	V $\beta$ rodina	Fluorochrom	Klon	Isotyp (druh)
A	5.3	PE	3D11	IgG1 (mouse)
	7.1	PE+FITC	ZOE	IgG2a (mouse)
	3	FITC	CH92	IGM (mouse)
B	9	PE	FIN9	IgG2a (mouse)
	17	PE+FITC	E17 .5F3	IgG1 (mouse)
	16	FITC	TAMAYA1.2	IgG1 (mouse)
C	18	PE	BA62.6	IgG1 (mouse)
	5.1	PE+FITC	IMMU157	IgG2a (mouse)
	20	FITC	ELL1.4	IgG (mouse)
D	13.1	PE	IMMU222	IgG2b (mouse)
	13.6	PE+FITC	JU74.3	IgG1 (mouse)
	8	FITC	56C5.2	IgG2a (mouse)
E	5.2	PE	36213	IgG1 (mouse)
	2	PE+FITC	MPB2D5	IgG1 (mouse)
	12	FITC	VER2.32	IgG2a (mouse)
F	23	PE	AF23	IgG1 (mouse)
	1	PE+FITC	BL37.2	IgG1 (rat)
	21.3	FITC	IG125	IgG2a (mouse)
G	11	PE	C21	IgG2a (mouse)
	22	PE+FITC	IMMU546	IgG1 (mouse)
	14	FITC	CAS1.1.3	IgG1 (mouse)
H	13.2	PE	H132	IgG1 (mouse)
	4	PE+FITC	WJF24	IgM (rat)
	7.2	FITC	ZIZOU4	IgG2a (mouse)

Nomenklatura od Wei et al. (1994)

PE – phycoerythrin

FITC - fluoresceinisothiokyanát

### 3. 1 Krevní vzorky

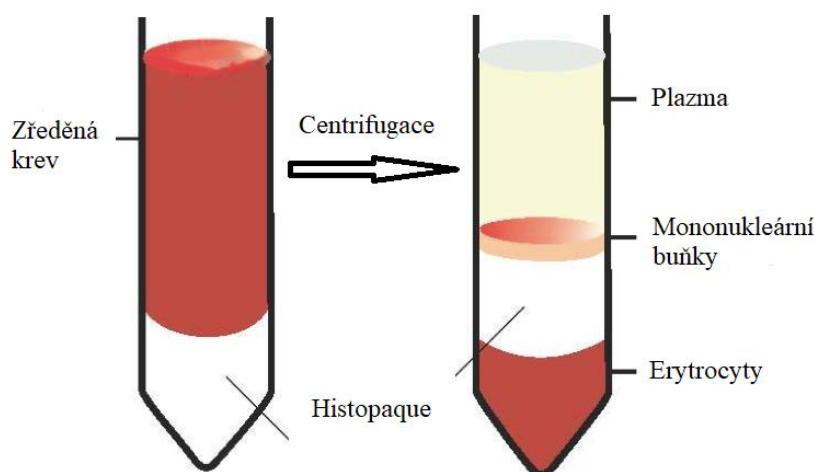
Odběry krevních vzorků pro výzkum byly prováděny specializovanou sestrou při normálním rutinním vyšetření na onkologické klinice Fakultní nemocnice Olomouc. Pacienti i dobrovolníci podepsali protokol informovaného souhlasu s vyšetřením. Krevní vzorky byly odebírány v časovém období od února 2018 do února 2019. Pro zabránění koagulace byly krevní vzorky odebírány do antikoagulačních zkumavek s ethylendiamintetraacetátem tridraselným (K<sub>3</sub>EDTA). Všechny krevní vzorky byly zpracovány do 24 hodin po odebrání. Celkově bylo pro analýzu změn v TCR repertoáru

měřeno 9 vzorků pacientů ve věkovém rozmezí 53 až 72 let, kteří byli léčeni pro karcinom ledviny, 12 vzorků pacientů ve věkovém rozmezí 26 až 89, kteří byli léčeni pro maligní melanom 2 vzorky pacientů ve věkovém rozmezí 24 až 54 let, kteří byli léčeni pro kolorektální karcinom. Všichni pacienti byli léčeni nivolumabem, jako 2. až 5. linie po předchozím podání INF- $\alpha$ , sunitinibu, pazopanibu, everolimu nebo axitinibu. Krevní vzorky všech pacientů byly hodnoceny a porovnávány s 14 kontrolními vzorky zdravých dárců.

### 3. 2 Příprava vzorku pro průtokovou cytometrii

#### 3. 2. 1 Izolace leukocytů

Pro izolaci mononukleárních buněk (lymfocyty, monocyty, granulocyty) z periferní krve byl použit Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, USA). Izolace proběhla podle následujícího postupu: Do sterilní plastové zkumavky (10 ml) byl napipetován 1 ml nesrážlivé periferní krve pacientů s diagnózou karcinomu ledviny, maligního melanomu nebo kolorektálního karcinomu. Následně v poměru 1 : 1 byl přidán 1 ml PBS pufru. Naředěné 2 ml roztoku krve byly přepipetovány do druhé sterilní plastové zkumavky (10 ml), která obsahovala 2 ml Histopaque, a to tím způsobem, že bylo nutné opatrně nadvrstvit naředěnou krev na Histopaque tak, aby nedošlo ke smísení obou roztoků (smísení roztoků by mělo za následek špatné rozseparování vzorku krve na jednotlivé fáze – erytrocyty, mononukleární buňky, plasma, Histopaque). Následně byla provedena gradientová centrifugace při 400×g po dobu 30 minut při teplotě 22 °C. Rozseparování na jednotlivé fáze po centrifugaci je zobrazeno na Obr. 9. Následně byl proveden sběr mononukleárních buněk; do další sterilní plastové zkumavky (10 ml) byl přepipetován prstenec mononukleárních buněk (cca 0,5 ml). Tento objem byl doplněn PBS pufrem do 4 ml a byla provedena opětovná centrifugace při 200×g po dobu 10 minut při teplotě 22 °C. Po centrifugaci byl odpipetován přebytečný PBS supernatant a peleta mononukleárních buněk byla naředěna a doplněna čistým PBS pufrem do 0,5 ml.



**Obrázek 9.** Rozseparované fáze periferní krve pomocí Histopaque (převzato a upraveno od Reeves et Sinclair, 2014)

### 3. 2. 2 Aplikace přímo značených protilátek na T lymfocty

K obarvení buněk byly použity přímo značené protilátky anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 (viz tab. 1) a Beta Mark TCR V $\beta$  Repertoire Kit (Beckman Coulter, USA), který obsahoval 24 přímo značených protilátek anti-TCR seskupených do 8 testových lahviček (test A- H). Každá ze 24 protilátek byla specifická pro určitou V $\beta$  rodinu (viz tab. 2). Tento kit kvantifikující 24 různých V $\beta$  rodin pokrývá přibližně 70 % normálního lidského TCR V $\beta$  repertoáru (Brewer et Ericson 2005). Aplikace protilátek proběhla podle následujícího postupu: Byla vytvořena řada osmi 1,5 ml mikrozkušavek (každá pro jinou testovou lahvičku). Do každé z nich bylo z předem vyizolované a naředěné suspenze buněk napipetováno 50  $\mu$ l suspenze buněk, ke které bylo přidáno 2,5  $\mu$ l anti-CD3 Pacific Blue, 2,5  $\mu$ l anti-CD4 APC/Cy7, 2,5  $\mu$ l anti-CD8 APC protilátky a 5  $\mu$ l anti-TCR protilátky (test A-H). Celkově bylo připraveno 8 mikrozkušavek pro 1 vzorek krve 1 pacienta (dárce). Následně byly vzorky inkubovány ve tmě po dobu 20 minut při laboratorní teplotě (25 °C). Po inkubaci bylo do každé z 8 mikrozkušavek přidáno 0,5 ml PBS pufru. Takto připravené vzorky byly následně měřeny na průtokovém cytometru.

### 3. 3 Průtoková cytometrie

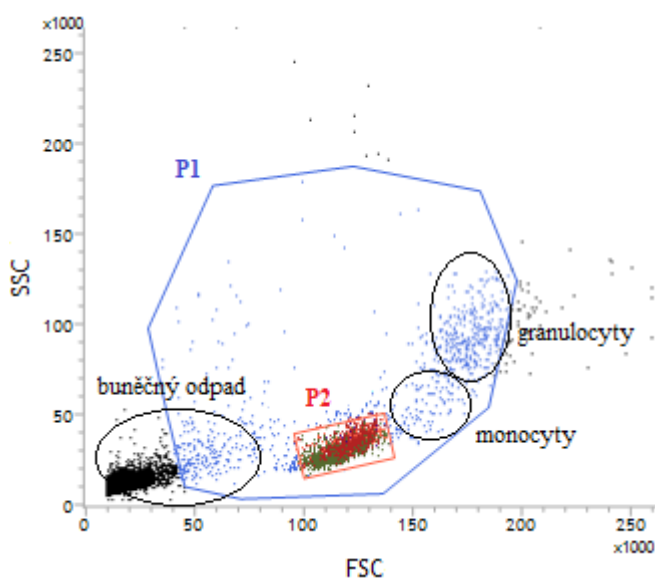
Celkově bylo analyzováno 24 V $\beta$  rodin CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> subpopulace u každého pacienta i zdravého dárce. Analýza probíhala pomocí průtokového cytometru BD FACSverse (BD Biosciences, EU) a programu BD FACSuite. Průtokový cytometr byl pravidelně každý týden kalibrován pomocí mikrosfér BD FACSverse CS&T Research Beads. Před



analýzou byly provedeny kompenzace jednotlivých fluorescečních barev podle standardního protokolu.

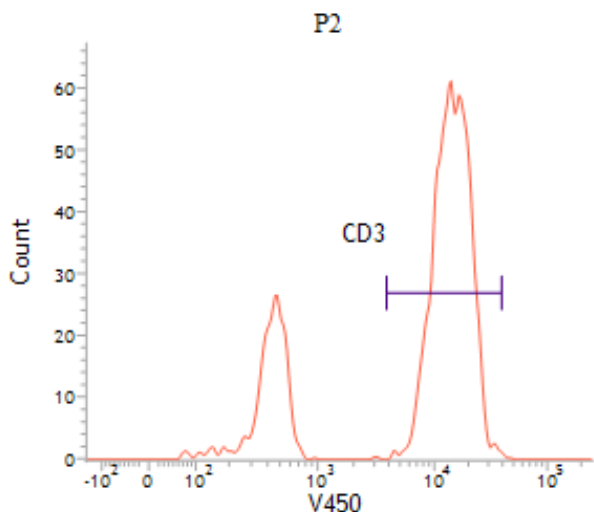
### 3. 3. 1 Gating

Gating probíhal podle následujícího postupu: Nejdříve byla ve forward/side scatter (FSS/SSC) módu vyselektována oblast výskytu mononukleárních buněk označená v našem případě jako gate P1 (Obr. 10). Následně byla vyselektována oblast lymfocytů jako podmnožina gate P1 označená jako gate P2 (Obr. 10). Na Obr. 10 jsou také uvedeny pozice výskytu ostatních skupin leukocytů (granulocytů a monocytů).



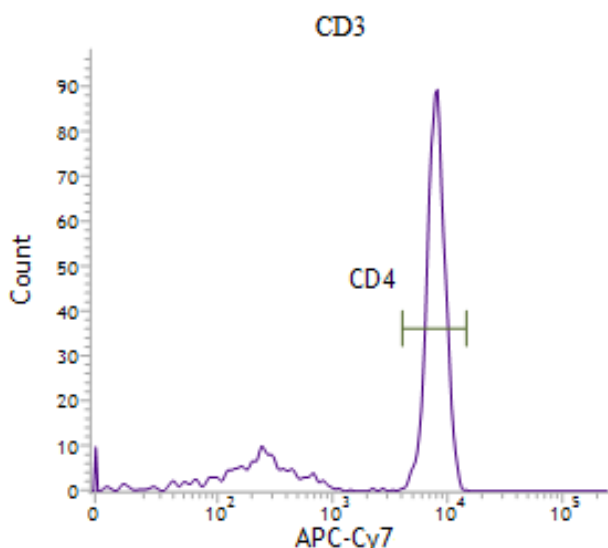
**Obrázek 10.** FS/SS Dot plot zobrazující vyselektovanou populaci lymfocytů a ostatní podskupiny leukocytů

Následně byl z gate P2 odvozen histogram intenzity fluorescence  $CD3^+$  T lymfocytů obarvených anti-CD3 Pacific Blue protilátkou, kde byla zobrazena pozitivní a negativní populace buněk, přičemž pozitivní populace byla značena gatem CD3 ( $CD3^+$  T lymfocyty) (Obr. 11).

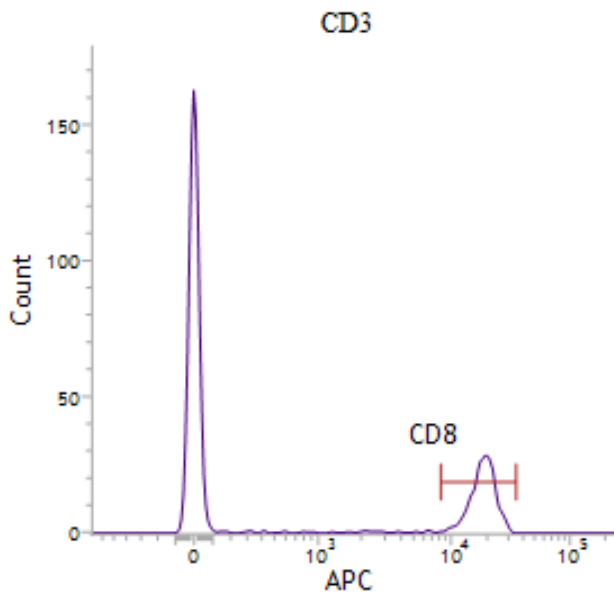


**Obrázek 11.** Histogram intenzity fluorescence  $CD3^+$  T lymfocytů. V450 na ose x značí fluorescenční barvu Pacific Blue. Gate CD3 značí intenzitu fluorescence pozitivní populace  $CD3^+$  T lymfocytů.

Z gate CD3 byly následně odvozeny 2 histogramy intenzity fluorescence. První zobrazoval intenzitu fluorescence pozitivní populace  $CD4^+$  T lymfocytů obarvených protilátkou anti-CD4 APC/Cy7, kde byla zobrazena pozitivní a negativní populace buněk, přičemž pozitivní populace byla značena gatem CD4 (Obr. 12) a druhý intenzitu fluorescence pozitivní populace  $CD8^+$  T lymfocytů obarvených protilátkou anti-CD8 APC, kde byla také zobrazena pozitivní a negativní populace buněk, přičemž pozitivní populace byla značena gatem CD8 (Obr. 13).

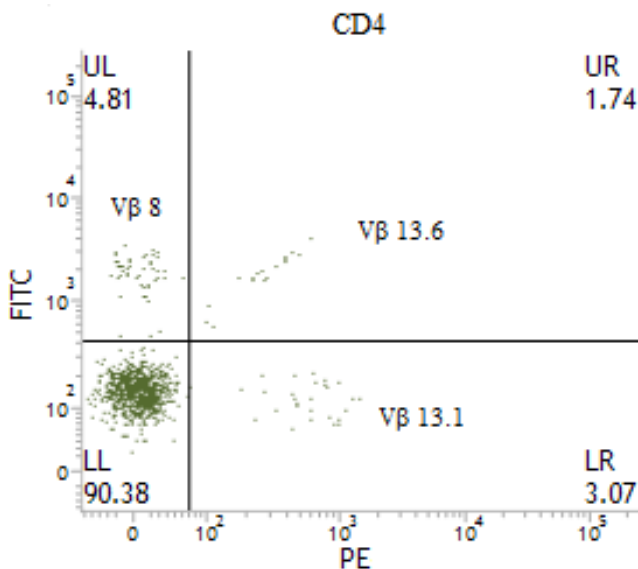


**Obrázek 12.** Histogram intenzity fluorescence  $CD4^+$  T lymfocytů. Gate CD4 značí intenzitu fluorescence pozitivní populace  $CD4^+$  lymfocytů.

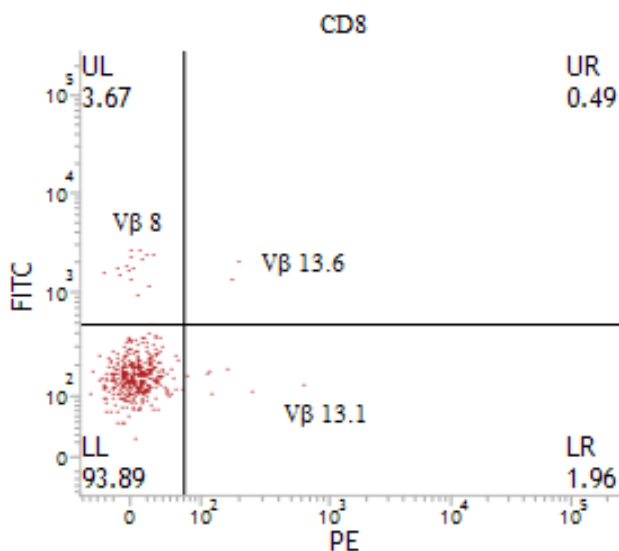


**Obrázek 13.** Histogram intenzity fluorescence CD8<sup>+</sup> T lymfocytů. Gate CD3 značí intenzitu fluorescence pozitivní populace CD8<sup>+</sup> T lymfocytů.

Následně byly z gatů CD4 a CD8 odvozeny 2 dot-ploty, které zobrazovaly individuální reprezentaci V $\beta$  rodin. Na Obr. 14 je zobrazeno procentuální zastoupení V $\beta$  rodin CD4<sup>+</sup> T lymfocytů (V $\beta$  8, V $\beta$  13.6, V $\beta$  13.1). Na Obr. 15 je zobrazeno procentuální zastoupení V $\beta$  rodin CD8<sup>+</sup> T lymfocytů (V $\beta$  8, V $\beta$  13.6, V $\beta$  13.1).



**Obrázek 14.** Dot-plot zobrazující individuální reprezentaci CD4<sup>+</sup> V $\beta$  rodin (V $\beta$  8, V $\beta$  13.6, V $\beta$  13.1)



**Obrázek 15.** Dot-plot zobrazující individuální reprezentaci  $CD8^+$  V $\beta$  rodin (V $\beta$  8, V $\beta$  13.6, V $\beta$  13.1)

### 3. 4 Metody statistické analýzy

Naměřená data pomocí průtokové cytometrie byla podrobena statistické analýze. Byla využita analýza pomocí základního neparametrického testu metodikou bootstrap přístupu (jednovýběrový Wilcoxonův test) a dále byla data analyzována vícerozměrnou metodou výběru hlavních komponent.

Základní soubor, který byl analyzován, obsahoval údaje o individuálním zastoupení V $\beta$  rodin  $CD4^+$  a  $CD8^+$  T lymfocytů u pacientů léčených nivolumabem. U některých pacientů byla provedena opakovaná měření, celkem bylo zahrnuto 26 měření u 23 pacientů. U každého pacienta bylo sledováno celkem 48 V $\beta$  rodin, z toho 24 ze subpopulace  $CD4$  a 24 subpopulace  $CD8$ . Dohromady určené rodiny tvoří přibližně 70 % z dané subpopulace (Brewer et Ericson, 2005), což je ve shodě s námi naměřenými daty. Soubor nemocných zahrnoval pacienty s karcinomy ledviny (12 měření/9 pacientů), s kolorektálním karcinomem (2) a s maligním melanomem (12). Shodné údaje byly zjišťovány u anonymní kontrolní skupiny zdravých dárců, obsahující 14 měření.

Vzhledem k charakteru dat, která jsou jednak vzájemně závislá, a nepříliš velkému souboru, byla zvolena analýza pomocí základního neparametrického testu metodikou bootstrap přístupu a dále byla data analyzována metodou hlavních komponent. Závislost dat v souboru mezi sebou vychází z toho, že úbytek jedné hodnoty V $\beta$  rodiny implikuje nárůst jiné – po doplnění fiktivním údajem do 100 procent lze na data nahlížet jako na uzavřený 48rozměrný simplex v 49rozměrném prostoru pozorování. Rovněž opakování

údajů měřených na stejném subjektu je příčinou závislosti jednotlivých pozorování. Statistické analýzy byly zpracovány softwarem R-language verze 3.3.

#### 3. 4. 1 Jednovýběrový neparametrický Wilcoxonův test

Pro porovnání hodnot V $\beta$  rodin mezi nemocnými a kontrolní skupinou bylo zvoleno neparametrické porovnání dané hodnoty V $\beta$  u pacienta s množinou hodnot naměřených u kontrol. Toto uspořádání experimentu testu odstraňuje obě zmíněné závislosti dat vstupujících do testu uvedeného v předchozím odstavci. Pro testování, zda hodnota pacienta by mohla zapadnout mezi naměřené hodnoty kontrol, byl použit jednovýběrový Wilcoxonův test (Bauer, 1972). Tento přístup je robustní vůči situaci, kdy ze 14 hodnot si nejsme jisti samotným statistickým rozložením hodnot dané veličiny ve zdravé populaci, takže nejsme schopni věrohodně použít některé známé statistické rozložení, jak by vyžadoval parametrický přístup. Prostou analýzou souboru lze nahlédnout, že u řady hodnot je výskyt konkrétní V $\beta$  rodiny značně individuální, takže tato hodnota bude vždy u nezanedbatelného množství jedinců například pod úrovní detekce. Pro testování byla zvolena hladina s p-value=0.001. Testovala se vždy nulová hypotéza, že hodnota u konkrétního pacienta je v souladu s výsledky kontrolní skupiny.

Pro každé p-value bylo provedeno 48×26 takových statistických testů. Byla použita oboustranná verze testu – pokud test zamítl nulovou hypotézu, je v příslušném políčku údaj o tom, zda hodnota byla výrazně pod (down) nebo nad (up) výsledky kontrolní skupiny.

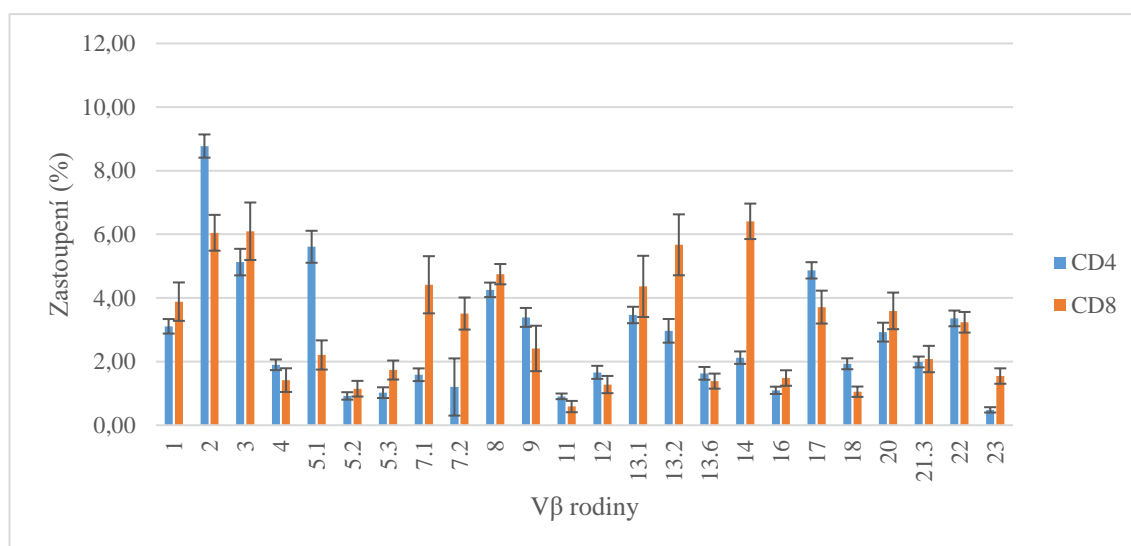
#### 3. 4. 2 Metoda výběru hlavních komponent

Jiný analytický přístup spočíval v pokusu o vizualizaci vícerozměrného prostoru dat vhodnou projekcí. Byla využita metoda výběru hlavních komponent (*z angl. principal component analysis*). Byl vytvořen biplot, který zobrazoval jak porovnání TCR spekter pacientů v rámci diagnóz, tak i odlišné chování jednotlivých V $\beta$  rodin. Čím byla hodnota pacienta nebo určité V $\beta$  rodiny vzdálenější od středu biplotu a ostatních hodnot, tím byla více odlišná.

## 4 Výsledky

Cílem experimentální části bylo stanovit TCR repertoár jak  $CD4^+$  T lymfocytů, tak  $CD8^+$  T lymfocytů u pacientů léčených nivolumabem při léčbě karcinomu ledviny a maligního melanomu. K tomu byla využita metoda průtokové cytometrie a gatovací strategie viz kapitola Gating. Celkově bylo analyzováno 24  $V\beta$  rodin z každé subpopulace T lymfocytů u každého pacienta. Pro pojmenování jednotlivých  $V\beta$  rodin byla využita nomenklatura podle Wei et al. (1994) viz kapitola Materiál a metody (tab. 2).

### 4. 1 Průměrné zastoupení jednotlivých $V\beta$ rodin u zdravých dárců



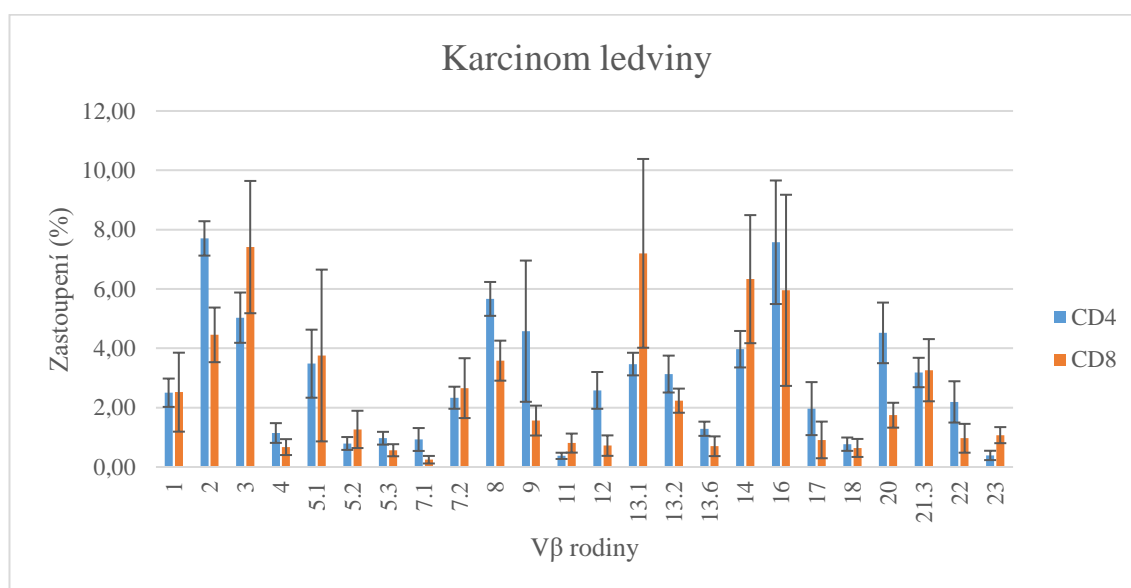
**Graf 1.** Porovnání průměrných hodnot zastoupení (osa y) jednotlivých  $V\beta$  rodin obou sledovaných subpopulací T lymfocytů (osa x) u zdravých kontrolních dárců. Chybové úsečky zde značí standardní chybu.

Nejprve byly analyzovány  $V\beta$  rodiny u 14 kontrolních vzorků, které byly získány od zdravých dárců. Bylo hodnoceno průměrné zastoupení jednotlivých  $V\beta$  rodin. Jednotlivé hodnoty  $V\beta$  rodin jsou procentuální hodnoty z celkového počtu T lymfocytů. Celkový součet se u kontrol pohyboval kolem 66,3 % v rámci  $CD4^+$  subpopulace a 74 %  $CD8^+$  subpopulace, u pacientů pak 69,5 %  $CD4^+$  subpopulace a 65,6 %  $CD8^+$  subpopulace. U kontrol je tedy sledovaný výběr  $CD8^+$  zastoupen o něco silněji než u pacientů, u  $CD4^+$  je rozdíl celkového součtu neznatelný. Výsledky grafu 1 ukazují, že v rámci subpopulace  $CD4^+$  T lymfocytů se hodnoty průměrného zastoupení jednotlivých  $V\beta$  rodin pohybují mezi 0,48–8,78 %. Výsledky dále dokumentují, že v rámci subpopulace  $CD8^+$  T lymfocytů se průměrné hodnoty zastoupení jednotlivých  $V\beta$  rodin pohybují mezi 0,59–

6,41 %. Na základě těchto výsledků získaných u kontrolních vzorků zdravých dárců byla hodnocena diverzita zastoupení V $\beta$  rodin u obou subpopulací T lymfocytů u pacientů.

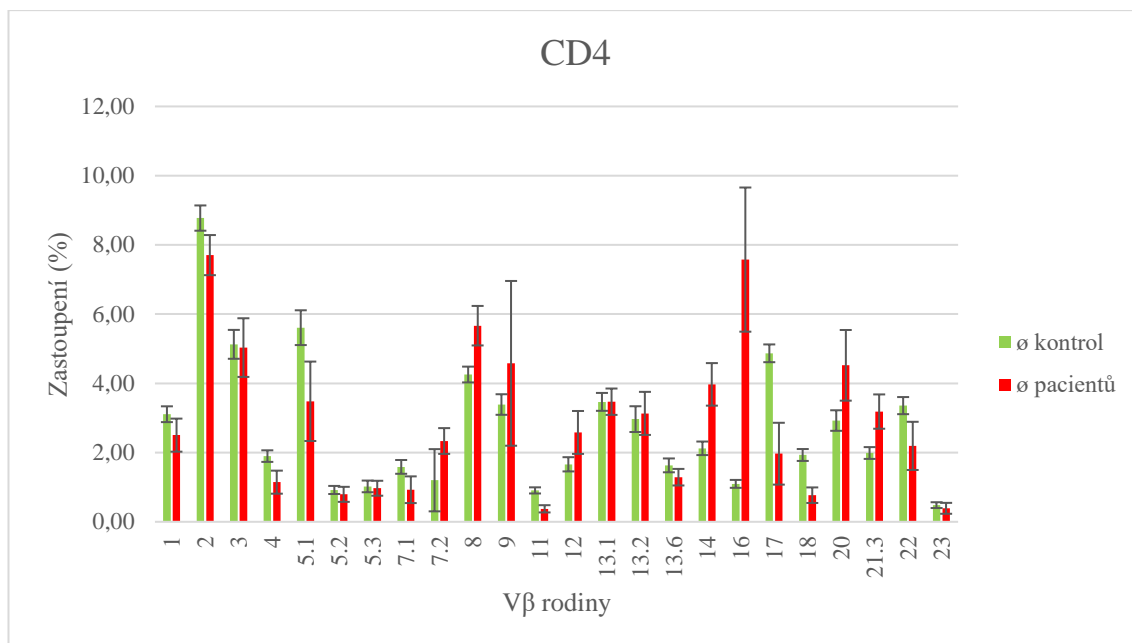
#### 4. 2 Průměrné zastoupení jednotlivých V $\beta$ rodin u pacientů s diagnózou karcinomu ledviny

Hodnoty v grafu 2 ukazují rozdíly průměrných hodnot zastoupení jednotlivých V $\beta$  rodin obou subpopulací CD4/CD8 T lymfocytů, u 10 pacientů, kteří byli diagnostikováni s karcinomem ledviny a následně léčeni nivolumabem.



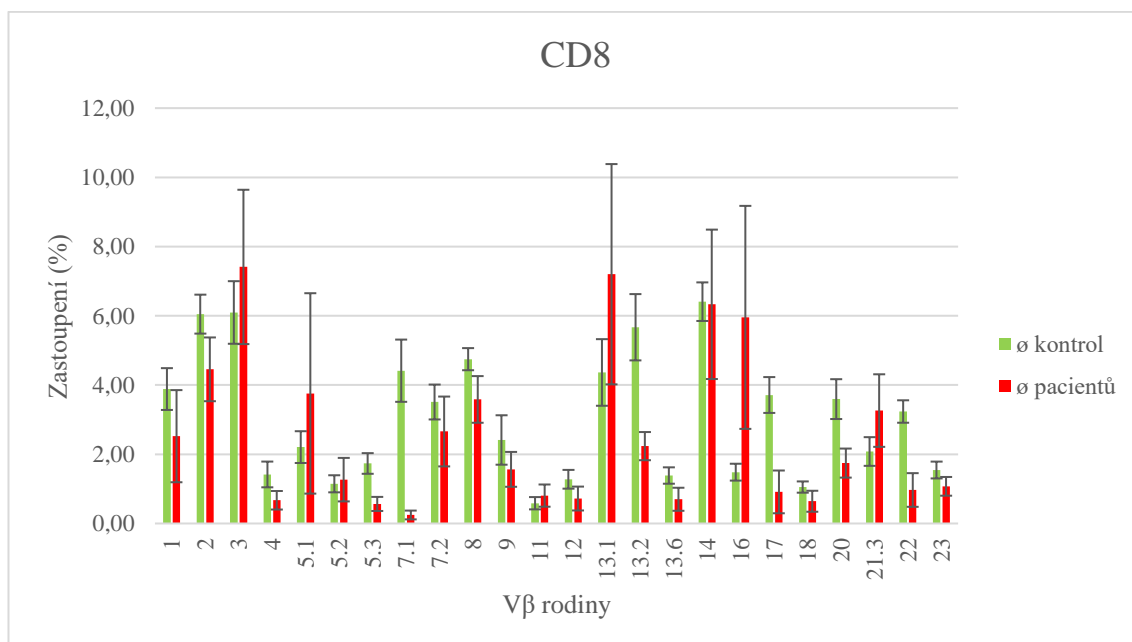
**Graf 2.** Porovnání průměrných hodnot zastoupení (osa y) jednotlivých V $\beta$  rodin obou sledovaných subpopulací T lymfocytů (osa x) u pacientů s diagnózou karcinomu ledviny léčených nivolumabem. Chybové úsečky zde značí standardní chybu.

Oproti zdravým kontrolním vzorkům, v rámci subpopulace CD4<sup>+</sup> T lymfocytů, byly největší rozdíly průměrných hodnot pozorovány v zastoupení rodiny V $\beta$ 16 (7,58 %) a V $\beta$ 17 (1,97 %) (Graf 3).



**Graf 3.** Průměrné hodnoty zastoupení (osa y) jednotlivých Vβ rodin CD4<sup>+</sup> T lymfocytů (osa x) u pacientů s doagnozou karcinomu ledviny v porovnání se zdravými kontrolními dárči. Chybové úsečky zde značí standardní chybu.

Oproti zdravým kontrolním vzorkům, v rámci subpopulace CD8<sup>+</sup> T lymfocytů, byly největší rozdíly průměrných hodnot pozorovány v zastoupení rodiny Vβ16 (5,96 %), Vβ7.1 (0,25 %) a Vβ17 (0,91 %) (Graf 4).



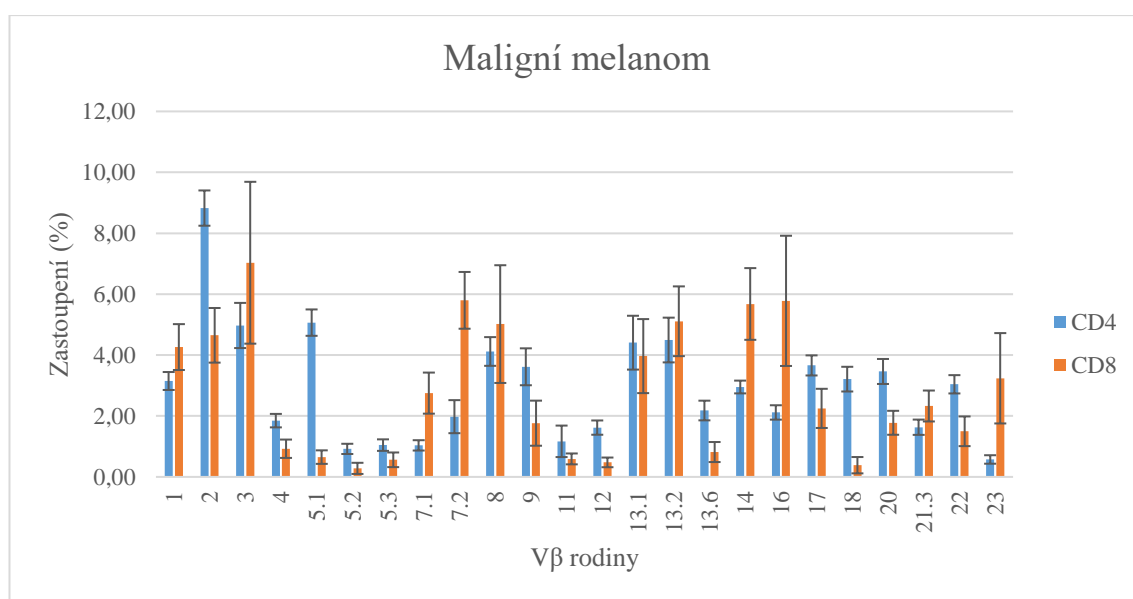
**Graf 4.** Průměrné hodnoty zastoupení (osa y) jednotlivých Vβ rodin CD8<sup>+</sup> T lymfocytů (osa x) u pacientů s diagnózou karcinomu ledviny v porovnání se zdravými kontrolními dárči. Chybové úsečky zde značí standardní chybu.



V individuálních případech pacientů byly pozorovány největší rozdíly v rámci CD4<sup>+</sup> subpopulace u rodiny Vβ9 (25,63 %) a Vβ16 (20,80 %) a v rámci CD8<sup>+</sup> subpopulace u rodiny Vβ3 (25,74 %), Vβ5.1 (29,46 %), Vβ13.1 (29,53 %), Vβ14 (24,5 %) a Vβ16 (33,90 %).

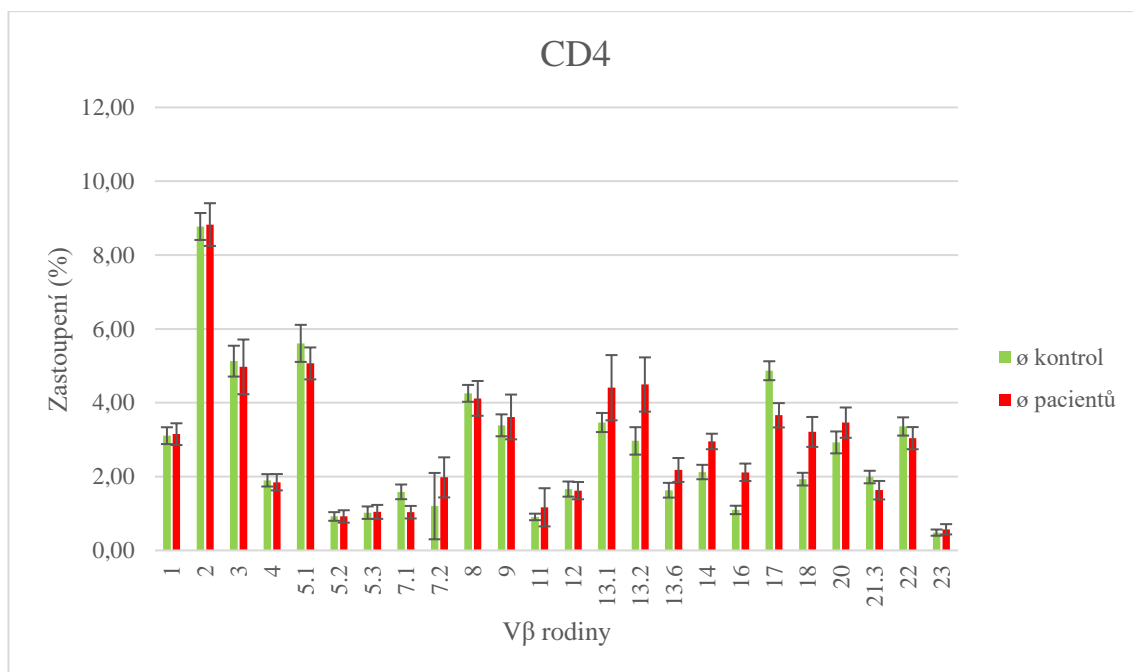
#### 4. 3 Průměrné zastoupení jednotlivých Vβ rodin u pacientů s diagnózou maligního melanomu

Hodnoty v grafu 5 ukazují rozdíly průměrných hodnot zastoupení jednotlivých Vβ rodin obou subpopulací CD4/CD8 T lymfocytů, u 11 pacientů, kteří byli diagnostikováni s maligním melanomem a následně léčeni nivolumabem.



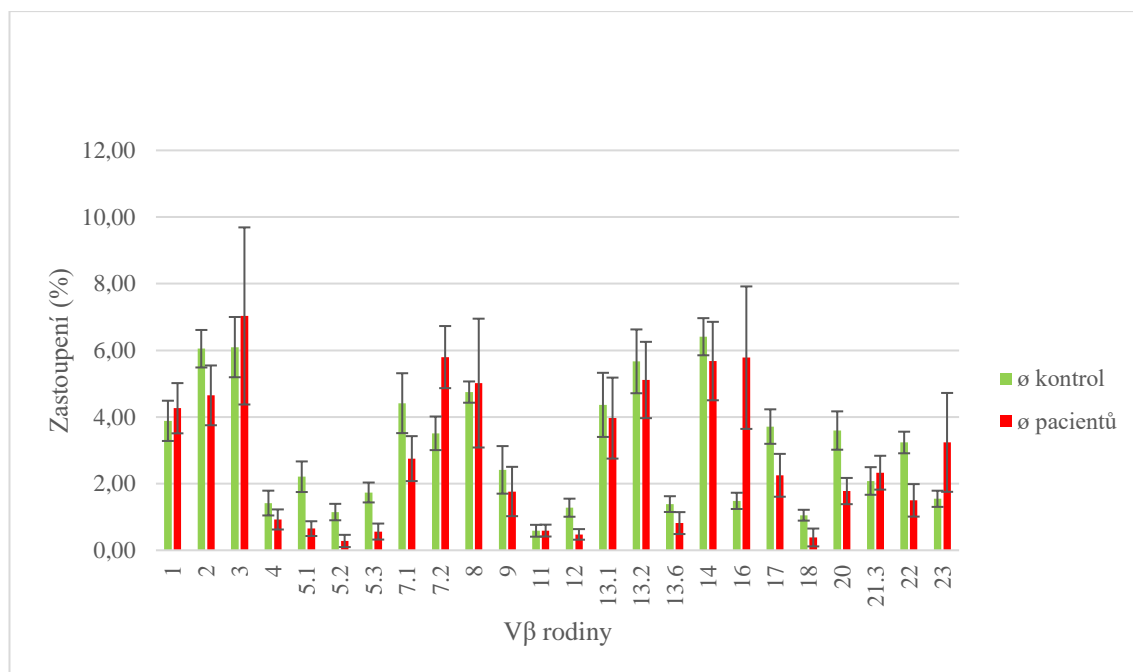
**Graf 5.** Porovnání průměrných hodnot zastoupení (osa y) jednotlivých Vβ rodin obou sledovaných subpopulací T lymfocytů (osa x) u pacientů s diagnózou maligního melanomu léčených nivolumabem. Chybové úsečky zde značí standardní chybu.

Oproti zdravým kontrolním vzorkům, v rámci subpopulace CD4<sup>+</sup> T lymfocytů, nebyly pozorovány významné rozdíly průměrných hodnot v zastoupení jednotlivých Vβ rodin (Graf 6).



**Graf 6.** Průměrné hodnoty zastoupení (osa y) jednotlivých Vβ rodin CD4<sup>+</sup> T lymfocytů (osa x) u pacientů s diagnózou maligního melanomu v porovnání se zdravými kontrolními dárci. Chybové usečky zde značí standardní chybu.

Oproti zdravým kontrolním vzorkům v rámci subpopulace CD8<sup>+</sup> T lymfocytů byly největší rozdíly průměrných hodnot pozorovány v zastoupení rodiny Vβ16 (5,78 %), Vβ5.2 (0,28 %) a Vβ5.3 (0,60 %) (Graf 7).



**Graf 7.** Průměrné hodnoty zastoupení (osa y) jednotlivých Vβ rodin CD8<sup>+</sup> T lymfocytů (osa x) u pacientů s diagnózou maligního melanomu v porovnání se zdravými kontrolními dárči. Chybové usečky zde značí standardní chybu.

V individuálních případech pacientů byly pozorovány největší rozdíly v rámci CD8<sup>+</sup> subpopulace u rodiny Vβ3 (31,03 %), Vβ8 (20,0 %) a Vβ16 (25,0 %).

#### 4. 4 Statistická analýza dat

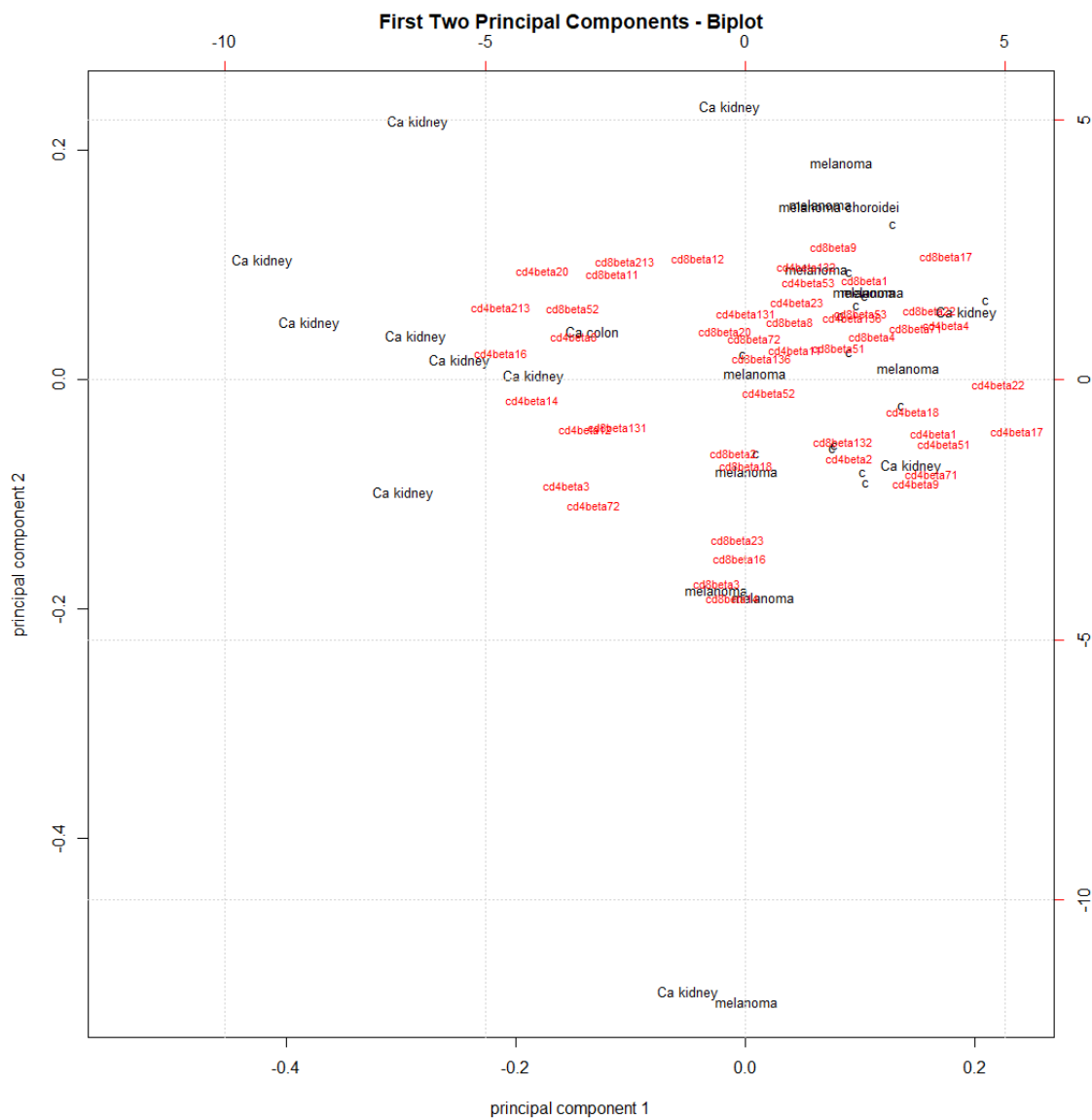
##### 4. 4. 1 Jednovýběrový neparametrický Wilcoxonův test

Výsledky testu jsou uvedené v tabulce 3 a 4 (viz přílohy). Výsledky ukázaly, že u pacientů je složení populací značně odlišné než u kontrolní skupiny. Hodnoty Vβ rodin u pacientů významně kolísají na obě strany – často je patrný nárůst či zřetelný úbytek dané Vβ rodiny. Některé Vβ rodiny jsou prakticky pro všechny pacienty významně nižší (CD4<sup>+</sup> Vβ 17, CD8<sup>+</sup> Vβ5.1, Vβ5.3, Vβ 7.1 a Vβ 22) a jiné významně vyšší (CD4<sup>+</sup> Vβ 16, CD4<sup>+</sup> Vβ20), někde jsou však rozdíly individuální. Výsledky také ukázaly odlišné chování určitých Vβ rodin pro pacienty s karcinomem ledviny versus pro pacienty s melanomem. V případě rodiny CD4<sup>+</sup> Vβ 7.1 byla u pacientů s karcinomem ledviny ve většině případů významně nižší než u pacientů s melanomem, u kterých nebyly hodnoty významně rozdílné od kontrolní skupiny. Podobně tomu tak bylo i u CD4<sup>+</sup> Vβ4, Vβ5.1 a Vβ22.

V případě rodiny CD4<sup>+</sup> Vβ21.3 bylo pozorováno, že u pacientů s karcinomem ledviny byly hodnoty významně vyšší než u kontrolní skupiny, oproti tomu u pacientů s melanomem byly významně nižší než u kontrolní skupiny.

#### 4. 4. 2 Metoda výběru hlavních komponent

Metoda výběru hlavních komponent vedla k vizualizaci vícerozměrného prostoru dat vhodnou projekcí. Obr. 16 zobrazuje rozmístění objektů v projekci po nalezení prvních dvou komponent (tj. vektory s největší variabilitou) – jsou označeny na ploše textem diagnózy černě. Červeně označené trendy s popisem subpopulace a Vβ rodiny lze chápat jako směry, které posouvají daný objekt od středu biplotu (středové souřadnice 0; 0,0). Z tohoto pohledu je zajímavá CD4<sup>+</sup> Vβ 21.3 rodina ve srovnání s kontrolami – u některých pacientů s karcinomem ledviny byly extrémně vysoké hodnoty. Dále např. CD4<sup>+</sup> Vβ 17 – zde naopak pacienti (zejména pacienti s karcinomem ledviny) tuto rodinu měli pod hladinou detekce, ale u kontrol byla relativně stabilní. Rovněž je patrný systematický rozdíl mezi pacienty s diagnózou karcinomu ledviny a maligním melanomem – objekty vesměs zaujímají odlišné umístění.



**Obrázek 16.** Biplot analýzy dvou hlavních komponent. Červeně jsou označené trendy s popisem subpopulace a  $V\beta$  rodiny. Pozice vektorů pacientů jsou na ploše označeny textem diagnózy (Ca kidney, melanoma) černě. Pozice vektorů kontrol jsou na ploše označeny malým písmenem c černě.

## 5 Diskuze

Monitorování diverzity T lymfocytární populace se ukázalo jako užitečné v mnoha klinických podmínkách, které jsou charakterizovány buď zvýšenou nebo sníženou aktivitou T lymfocytů. To zahrnuje různé typy aktivních nádorových onemocnění, autoimunitu, infekční onemocnění, transplantace kostní dřeně nebo periferních hematopoetických kmenových buněk, protinádorovou imunitu, očkování atd. Analýzy variabilních genových rodin receptorů T lymfocytů (V $\beta$  rodin) jsou nejčastěji prováděny za účelem zkoumání této rozmanitosti. Detekuje se klonální diverzita V $\beta$  rodin TCR repertoáru. (Tesařová et al. 2011). Normální hodnoty TCR repertoáru dobře popsali van den Beemd et al. (2000).

Využití monitoringu diverzity T lymfocytů se zabýval Postow et al. V jejich studii, která zahrnovala 12 pacientů s diagnózou metastatického melanomu, byla hodnocena diverzita TCR repertoáru před léčbou anti-CTLA-4 protilátou (ipilimumabem). Diverzita TCR byla hodnocena pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR), která měřila TCR kombinatorní diverzitu mezi V a J geny z genomové DNA. Rozmanitost TCR repertoáru byla studována prostřednictvím bohatosti (pozorované přesmyky V-J) a rovnoměrnosti (podobnost mezi frekvencemi specifických V-J přesmyků). Bohatost i rovnoměrnost byla porovnávána jako kontinuální proměnná mezi pacienty s klinickým přínosem a bez klinického přínosu pomocí Wilcoxonova testu. Mezi pacienty s klinickým přínosem a bez klinického přínosu byl signifikantní rozdíl v bohatosti a rovnoměrnosti. Pacienti, u kterých byl zjištěn klinický přínos ipilimumabu, měli ve srovnání s pacienty, kteří nedosáhli klinického přínosu, vyšší stupeň jak bohatosti, tak rovnoměrnosti V-J genů. Analýza také ukázala, že žádný z pacientů s nízkou bohatostí ani nízkou rovnoměrností nedosáhl klinického přínosu. Bylo zjištěno, že výchozí repertoár TCR obsahující mnoho různých VJ přeuspořádání (bohatost) reprezentovaných na rovnoměrně rozložených frekvencích (rovnoměrnost) může být příznivý, protože by mohl indikovat zvýšenou pravděpodobnost přítomnosti určité imunologicky „relevantní“ protinádorové populace T lymfocytů, která, jakmile se uvolní blokádu CTLA-4, může expandovat a přispět k odezvě na nádor (Postow et al. 2015).

Následně v další studii Cha et al. hodnotili TCR diverzitu během CTLA-4 blokády u pacientů s kastročtě rezistentním metastatickým karcinomem prostaty, kdy byl podáván ipilimumab, a u pacientů s metastatickým melanomem, kdy byl podáván trememlimumab. Pro stanovení účinků blokády CTLA-4 na repertoár T lymfocytů autoři

použili technologie sekvenování nové generace, díky čemuž byla měřena frekvence jednotlivých přeuspořádaných genů T lymfocytů receptoru TCR (TRB) a charakterizována tak diverzita určitých klonotypů T lymfocytů. Autoři zjistili, že CTLA-4 blokáda indukuje vývoj a diverzifikaci repertoáru T lymfocytů. Kromě toho, zlepšené klinické výsledky jsou spojeny s menší ztrátou klonotypu, což je v souladu s udržováním vysokofrekvenčních klonotypů TCR během léčby. Tyto klony mohou představovat přítomnost již existujících T lymfocytů s vysokou aviditou, které mohou být relevantní v protinádorové odpovědi (Cha et al. 2014).

Dále u pacientů s metastatickým melanomem Tumeš et al. zjistili, že klinická odpověď na anti-PD1 terapii (pembrolizumab) korelovala s více klonálním (tj. omezenějším, méně různorodým) repertoárem TCR u vzorků nádorů před léčbou a zvýšenou klonální expanzí T lymfocytů u nádoru po zavedení anti-PD1 terapie. Pro analýzu TCR repertoáru využili technologie sekvenování nové generace. Dále také zjistili, že konkrétně klonální CD8 repertoár v místě nádoru může být prospěšný u melanomu, neboť k regresi tumoru po terapeutické blokádě PD-1 je zapotřebí již existujících CD8 T lymfocytů, které jsou negativně regulované adaptivní imunitní rezistencí zprostředkovanou PD-1/PD-L1 (Tumeš et al. 2014).

Analýzou aktivity T lymfocytů v místě nádoru ovlivněnou anti-PD1 terapií (nivolumabem) u pacientů s metastazickým melanomen se také zabývali Inoue et al. Studovali hladiny exprese imuno-příbuzných molekul (např. PD-L1) a zjistili, že léčba nivolumabem obnovila aktivitu cytotoxických T lymfocytů v místě nádoru. Následně pak provedli sekvenování TCR repertoáru v místě nádoru pomocí sekvenačních technologií nové generace. Prostřednictvím sekvenování  $\beta$  řetězce TCR získali 1,040,729 sekvencí a 32,880 unikátních klonotypů v jednotlivých tkáních. V důsledku toho zjistili, že léčba nivolumabem indukovala oligoklonální obohacování určitých klonotypů TCR V $\beta$  rodin v nádorových tkáních respondentů, což bylo v souladu s předchozí zprávou o léčbě melanomu léčeného anti-PD-1 (pembrolizumab) protilátkou ve výše zmíněné studii (Inoue et al., 2016).

V předkládané diplomové práci byly pomocí metody průtokové cytometrie hodnoceny změny zastoupení V $\beta$  rodin mononukleárních buněk CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T lymfocytů. Klasická metoda analýzy V $\beta$  rodin, jako je průtoková cytometrie, pokrývá přibližně 70 % všech V $\beta$  rodin lidského TCR repertoáru (Brewer et Ericson, 2005). Průtoková cytometrie je vhodnou metodou pro analýzu TCR repertoáru periferní krve, jelikož je zde přítomno dostatek buněk pro značení monoklonálními protilátkami

s navázaným fluorochromem, které se v průtokové cytometrii využívají. Z hlediska průtokové cytometrie se hodnotí celkové spektrum TCR repertoáru. Oproti tomu, pro analýzu TCR repertoáru v místě nádoru jsou vhodnější různé metody sekvenování (např. deep sequencing), jelikož v místě nádoru bývá zpravidla méně vitálních buněk, které by mohly být obarvené přímo značenými protilátkami pro průtokovou cytometrii. V případě použití metod sekvenování se nehodnotí spektrum celého TCR repertoáru, ale pouze to, jaké klonotypy se v místě nádoru nacházejí (Kabelitz, 2009). V naší práci byly analyzovány vzorky periferní krve pacientů s diagnózou karcinomu ledviny a maligního melanomu léčených anti-PD1 protilátkou nivolumabem. Všichni pacienti byli léčeni nivolumabem (jako 2. až 5. linie léčby) a všichni pacienti vykazovali pozitivní odpověď na tuto terapii pomocí zobrazovacích metod (CT, PET/CT). Jako kontrolní vzorky sloužily vzorky periferní krve zdravých dárců. Naměřené hodnoty průtokovou cytometrií byly zpracovány pomocí statistických analýz: jednovýběrovým neparametrickým Wilcoxonovým testem a vícerozměrnou analýzou výběru dvou hlavních komponent.

Výsledky statistických analýz ukázaly, že zastoupení jednotlivých V $\beta$  rodin u pacientů bylo značně odlišné od zdravých dárců. Byl zaznamenán jak zjevný nárůst, tak i úbytek určité V $\beta$  rodiny. Z toho můžeme dedukovat, že působení nivolumabu může mít významný vliv na snížení nebo i zvýšení zastoupení určitých V $\beta$  rodin T lymfocytů. Výsledky dále ukázaly, že v rámci provonání diagnóz karcinomu ledviny a maligního melanomu docházelo k rozdílnému chování určitých V $\beta$  rodin (CD4<sup>+</sup> V $\beta$  7.1, V $\beta$ 4, V $\beta$ 5.1 a V $\beta$ 22). U většiny pacientů s karcinomem ledviny docházelo k výraznému snížení zastoupení výše zmíněných V $\beta$  rodin v porovnání s kontrolami, zatímco u většiny pacientů s maligním melanomem nebyla zaznamenána výrazná změna zastoupení těchto rodin. Dále bylo zjištěno, že u jedné V $\beta$  rodiny (CD4<sup>+</sup> V $\beta$  21.3) docházelo k výraznému zvýšení jejího zastoupení u pacientů s karcinomen oproti výraznému snížení zastoupení u pacientů s maligním melanomem. To naznačuje, že nivolumab má pravděpodobně vliv na rozdílnost TCR spektra u pacientů s různými diagnózami. Z uvedených dat nemůžeme však soudit, který z klonotypů V $\beta$  rodin má pozitivní vliv na likvidaci nádorových buněk jednoho nebo druhého typu nádoru. Můžeme však říci, že proliferace klonotypů V $\beta$  rodin pravděpodobně souvisí s protinádorovým efektem léčby nivolumabu.



## 6 Závěr

Cílem předkládané diplomové práce bylo stanovit změny TCR repertoárů u pacientů s diagnózou karcinomu ledviny a maligního melanomu, kteří byli léčeni plně humánní IgG4 monoklonální protilátkou proti receptoru PD-1 – nivolumabem. Bylo využito analytické metody průtokové cytometrie za použití přímo značených monoklonálních protilátek, při které se stanovovalo procentuální zastoupení 24 V $\beta$  rodin CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> subpopulace T lymfocytů. Následně byla data statisticky zpracována pomocí neparametrického jednovýběrového Wilcoxonova testu a dále vícerozměrnou analýzou hlavních komponent.

Výsledky statistických analýz vedou k těmto závěrům: Byly zaznamenány změny TCR repertoáru u pacientů s karcinomem ledviny a maligním melanomem léčených nivolumabem oproti zdravým jedincům. Jednalo se o zvýšení zastoupení nebo o snížení zastoupení jednotlivých V $\beta$  rodin. Z toho je možné usuzovat, že nivolumab ovlivňuje procentuální zastoupení individuálních V $\beta$  rodin T lymfocytů. Následně bylo zjištěno, že při porovnání obou diagnóz se zdravými jedinci, může docházet k odlišnému chování jednotlivých V $\beta$  rodin v závislosti na diagnóze. Nivolumab pravděpodobně může zvyšovat zastoupení jedné V $\beta$  rodiny u skupiny pacientů s karcinomem ledviny, zatímco u druhé skupiny pacientů s maligním melanomem může snižovat zastoupení stejné V $\beta$  rodiny. Nivolumab indukuje proliferaci specifických klonotypů V $\beta$  rodin. Nárůst klonotypů V $\beta$  rodin pravděpodobně souvisí s terapeutickou odpovědí na léčbu nivolumabem.

## Citovaná literatura

- Abbasi N.R., Shaw H.M., Rigel D.S., Friedman R.J., McCarthy W.H., Osman I., Kopf A.W., Polsky D. (2004)** Early Diagnosis of Cutaneous Melanoma, Revisiting the ABCD Criteria. *JAMA*, Vol 292, No. 22
- Arden B., Clark S., Kabelitz D., Mak T.W. (1995)** Human T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics* 42:455-500
- Artyomov M.N., Lis M., Devadas S., Davis M.M., Chakraborty A.K. (2010)** CD4 and CD8 binding to MHC molecules primarily acts to enhance Lck delivery. *Proc Natl Acad Sci* 107:16916–21
- Attaf M., Legut M., Cole D. K., Sewell A. K. (2015)** The T cell antigen receptor: the Swiss army knife of the immune systém. *Clinical and Experimental Immunology* 181:1–18
- Azoury S.C., Straughan D.M., Shukla V. (2015)** Immune Checkpoint Inhibitors for Cancer Therapy: Clinical Efficacy and Safety. *Curr Cancer Drug Targets* 15:452-462
- Bauer D.F. (1972)** Constructing confidence sets using rank statistics. *Journal of the American Statistical Association* 67:687–690
- Bennett F., Luxenberg D., Ling V., Wang I.M., Marquette K., Lowe D., Khan N., Veldman G., Jacobs K. A., Valge-Archer V.E., Collins M., Carreno B. M. (2003)** Program death-1 engagement upon TCR activation has distinct effects on costimulation and cytokine-driven proliferation: attenuation of ICOS, IL-4, and IL-21, but not CD28, IL-7, and IL-15 responses. *J Immunol.* 170:711–718
- Brahmer J.R., Drake C.G., Wollner I., Powderly J.D., Picus J., Sharfman W.H., Stankevich E., Pons A., Salay T.M., McMiller T.L., Gilson M.M., Wang C., Selby M., Taube J.M., Anders R., Chen L., Korman A.J., Pardoll D.M., Lowy I., Topalian S.L. (2010)** Phase I study of single-agent antiprogrammed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J Clin Oncol* 28:3167-75
- Bränström R., Chang Y.M., Kasparian N., Affleck P., Tibben A., Aspinwall L.G., Azizi E., Baron-Epel O., Battistuzzi L., Bruno W., Chan M., Cuellar F., Debniak T., Pjanova D., Ertmański S., Figl A., Gonzalez M., Hayward N.K., Hocevar M., Kanetsky P.A., Leaf S.L., van Nieuwpoort F.A., Heisele O., Palmer J., Peric B., Puig S., Ruffin A.D., Schadendorf D., Gruis N.A., Brandberg Y., Newton-Bishop J. (2010)** Melanoma risk factors, perceived threat and intentional tanning: an international online survey. *Eur J Cancer Prev.*19(3):216-26
- Brewer J. et Ericson S. (2005)** An improved methodology to detect human T cell receptor beta variable family gene expression patterns, *J. Immunol. Methods* 302:54–67
- Buchbinder E.I. et Desai A. (2016)** CTLA-4 and PD-1 Pathways Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol* 39:98–106

- Caini S., Gandini S., Sera F., Raimondi S., Fargnoli M.C., Boniol M., Armstrong B.K. (2009)** Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma according to anatomical site and clino-pathological variant. *Eur J Cancer* 45:3054–3063
- Cust A.E., Goumas C., Vuong K., Davies J.R., Barrett J.H., Holland E.A., Schmid H., Agha-Hamilton C., Armstrong B.K., Kefford R.F., Aitken J.F., Giles G.G., Bishop D., Newton-Bishop J.A., Hopper J.L., Mann G.J., Jenkins MA. (2013)** MC1R genotype as a predictor of early-onset melanoma, compared with self-reported and physician-measured traditional risk factors: an Australian case-control-family study. *BMC Cancer* 13:406
- Dasgupta A. et Wahed A. (2014)** Tumor Markers. *Clinical Chemistry, Immunology and Laboratory Quality Control* 229–247
- Davis M.M. et Bjorkman P.J. (1988)** T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 334:395-402
- Day C. E., Schmitt K. et Robinson M. A. (1994)** Frequent recombination in the human T-cell receptor beta gene complex, *Immunogenetics* 39:335-342
- de Vries E., Bray F.I., Coebergh J.W., Parkin D.M. (2003)** Changing epidemiology of malignant cutaneous melanoma in Europe 1953-1997: rising trends in incidence and mortality but recent stabilizations in western Europe and decreases in Scandinavia. *Int J Cancer*. 20;107(1):119-26
- Di Giacomo A.M., Biagioli M., Maio M. (2010)** The emerging toxicity profiles of anti-CTLA-4 antibodies across clinical indications. *Semin Oncol*. 2010;37(5):499–507
- Dunn G.P., Old L.J., Schreiber R.D. (2004)** The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*. 21:137–148
- Elwood J.M. et Jopson J. (1997)** Melanoma and sun exposure: an overview of published studies. *Int J Cancer* 73:198–203
- Escudier B., Porta C., Schmidinger M., Rioux-Leclercq N., Bex A., Khoo V., Gruenvald V., Horwich A. (2016)** Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 27 (Supplement 5): v58–v68
- Esensten J.H., Helou Y.A., Chopra G., Weiss A., Bluestone J.A. (2016)** CD28 Costimulation: From Mechanism to Therapy. *Immunity* 44:973–88
- Fabbri M., Smart C., Pardi R. (2003)** T lymphocytes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 35:1004–1008
- Fife B.T. et Bluestone J.A. (2008)** Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunol Rev*.224:166–182
- Folch G. et Lefranc M.P. (2000)** The human T cell receptor beta variable (TRBV) genes. *Exp Clin Immunogenet* 17:42-54

- Gandini S., Sera F., Cattaruzza M.S., Pasquini P., Picconi O., Boyle P., Melchi C.F. (2005)** Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur J Cancer* 41:45–60
- Girardi M. (2006)** Immunosurveillance and Immunoregulation by  $\gamma\delta$  T Cells. *J. Invest. Dermatol.* 126:25–31
- Goldrath A.W. et Bevan M.J. (1999)** Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* 402:255–262
- Goldstein A.M., Chan M., Harland M., Hayward N.K., Demenais F., Bishop D.T., Azizi E., Bergman W., Bianchi-Scarra G., Bruno W., Calista D. (2007)** Features associated with germline CDKN2A mutations: a GenoMEL study of melanoma-prone families from three continents. *J Med Genet* 44:99–106
- Gras S., Chen Z., Miles J.J., Liu Y.Ch., Bell M.J., Sullivan L.C., Kjer-Nielsen L., Brennan R.M., Burrows J.M., Neller M.A., Khanna R., Purcell A.W., Brooks A.G., McCluskey J., Rossjohn J., Burrows S. R. (2010)** Allelic polymorphism in the T cell receptor and its impact on immune responses. *J Exp Med* 207:1555–67
- Greenwald R.J., Freeman G.J., Sharpe A.H. (2005)** The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol.* 23:515–548
- Guy G.P. Jr., Thomas C.C., Thompson T., Watson M., Massetti G.M., Richardson L.C. (2015)** Vital signs: Melanoma incidence and mortality trends and projections – United States, 1982–2030. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 64(21):591–6
- Hamid O., Robert C., Daud A., Hodi F.S., Hwu W.J., Kefford R., Wolchok J.D., Hersey P., Joseph R.W., Weber J.S., Dronca R., Gangadhar T.C., Patnaik A., Zarour H., Joshua A.M., Gergich K., Elassaiss-Schaap J., Algazi A., Mateus C., Boasberg P., Tumei P.C., Chmielowski B., Ebbinghaus S.W., Li X.N., Kang S.P., Ribas A. (2013)** Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *N Engl J Med* 369:134-44
- Harris D.T. et Kranz D.M. (2016)** Adoptive T Cell Therapies: A Comparison of T Cell Receptors and Chimeric Antigen Receptors. *Trends Pharmacol Sci* 37:220–30
- Hayward N.K. (2003)** Genetics of melanoma predisposition. *Oncogene* 22:3053–3062
- Hofmann J., Greter M., Du Pasquier L., Becher B. (2010)** B-cells need a proper house, whereas T-cells are happy in a cave: the dependence of lymphocytes on secondary lymphoid tissues during evolution. *Trends Immunol.* 31:144–153
- Hollestein L.M., van den Akker S.A., Nijsten T., Karim-Kos H.E., Coebergh J.W., de Vries E. (2012)** Trends of cutaneous melanoma in The Netherlands: increasing incidence rates among all Breslow thickness categories and rising mortality rates since 1989. *Ann Oncol.* 23(2):524-30
- Husmann L. A. et Bevan M. J. (1988)** Cooperation between helper T cells and cytotoxic T lymphocyte precursors. *Annals of the New York Academy of Sciences* 532:158–169

- Cha E., Klinger M., Hou Y., Cummings C., Ribas A., Faham M., Fong L. (2014)** Improved survival with T cell clonotype stability after anti-CTLA-4 treatment in cancer patients. *Sci Transl Med.* 6:238–270
- Chambers C.A., Kuhns M.S., Egen J.G., Allison J.P. (2001)** CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annu Rev Immunol.* 19:565–594
- Chen L. (2004)** Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat Rev Immunol.* 4:336–347
- Chow W.H., Dong L.M., Devesa S.S. (2010)** Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *Nat Rev Urol* 7:245–257
- Inoue H., Park JH., Kiyotani K., Zewde M., Miyashita A., Jinnin M., Kiniwa Y., Okuyama T., Tanaka R., Fujisawa Y., Kato H., Morita A., Asai J., Katoh N., Yokota K., Akiyama M., Ihn M., Fukushima S., Nakamura Y. (2016)** Intratumoral expression levels of PD-L1, GZMA, and HLA-A along with oligoclonal T cell expansion associate with response to nivolumab in metastatic melanoma. *OncoImmunology* Vol 5, Issue 9
- Israel G.M. et Bosniak M.A. (2008)** Pitfalls in renal mass evaluation and how to avoid them. *Radiographics* 28:1325–38
- Janeway J.C. A. et Medzhitov R. (2002)** Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology* 20:197–216
- Jazirehi A.R., Lim A. et Dinh T. (2016)** PD-1 inhibition and treatment of advanced melanoma-role of pembrolizumab. *Am J Cancer Res* 6(10):2117-2128
- Kabelitz D. et Wesch D. (2009)** T-Cell Receptor Repertoire Analysis by Flow Cytometry. *Cellular Diagnostics. Basics, Methods and Clinical Applications of Flow Cytometry.* Basel, Karger, 2009, 200–210
- Kamb A., Shattuck-Eidens D., Eeles R., Liu Q., Gruis N.A., Ding W., Hussey C., Tran T., Miki Y., Weaver-Feldhaus J., McClure M., Aitken J.F., Anderson D. E., Bergman W., Frants R., Goldgar D. E., Green A., MacLennan R., Martin N. G., Meyer L. J., Youl P., Zone J. J., Skolnick M. H. et Cannon-Albright L. A. (1994)** Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus. *Nat Genet* 8:23–26
- Kawaciuk I. (2005)** Epidemiologie karcinomu ledviny, *Urolog. pro Praxi* 6:248–252
- Kazatchkine M.D. (1995)** WHO-IUIS Nomenclature Sub-Committee on TCR Designation. Nomenclature for T-cell receptor (TCR) gene segments of the immune system. *Immunogenetics* 42:451-453
- Keir M.E., Butte M.J., Freeman G.J., Sharpe A.H. (2008)** PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol.* 26:677–704
- Kindt T.J., Goldsby R.A., Osborne B.A. (2007)** Kuby's immunology. 6th ed. New York: W.H. Freeman. 574 p. ISBN 978-0-7167-8590-3

- Klabusay M., Sukova V., Coupek P., Brychtova Y., Mayer J. (2007)** Different levels of CD52 antigen expression evaluated by quantitative fluorescence cytometry are detected on B-lymphocytes, CD 34+ cells and tumor cells of patients with chronic B-cell lymphoproliferative diseases. *Cytometry B Clin Cytom.*72(5):363-70
- Korn T., Oukka M., Kuchroo V., Bettelli E. (2007)** Th17 cells: Effector T cells with inflammatory properties, *Seminars in Immunology* 19:362–371
- Krummel M.F. et Allison J.P. (1995)** CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med.* 182:459–465
- Krummel M.F. et Allison J.P. (1996)** CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *J Exp Med.* 183:2533–2540
- Lam J.S., Leppert J.T., Beldegrun A.S., Figlin R.A. (2005)** Novel approaches in the therapy of metastatic renal cell carcinoma. *World J Urol* 23:202–12
- Lanzavecchia A. et Sallusto F. (2000).** Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science* 290:92–97
- Lanzavecchia A. et Sallusto F. (2001)** Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell* 106:263–266
- Lefranc M.P. (2001)** Nomenclature of the Human T Cell Receptor Genes. *Current protocol in immunology.* Vol.40, Issue 1
- Liabeuf S., Lenglet A., Desjardins L., Neiryneck N., Glorieux G., Lemke H.D., Vanholder R., Diouf M., Choukroun G., Massy Z.A. (2012)** Plasma beta-2 microglobulin is associated with cardiovascular disease in uremic patients. *Kidney International* 82:1297–1303
- Linos E., Swetter S.M., Cockburn M.G., Colditz G.A., Clarke C.A. (2009)** Increasing burden of melanoma in the United States. *J Invest Dermatol.* 129(7):1666–74
- Linsley P.S., Bradshaw J., Greene J., Peach R., Bennett K.L., Mittler R.S. (1996)** Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement. *Immunity.* 4:535–543
- Luke J.J. et Ott P. (2015)** PD-1 pathway inhibitors: The next generation of immunotherapy for advanced melanoma. *Oncotarget* 2015; 6:3479-3492
- Manson G., Norwood J., Marabelle A., Kohrt H., Houot R. (2016)** Biomarkers associated with checkpoint inhibitors. *Annals of Oncology* 27:1199–1206
- Markovic S.N., Erickson L.A., Rao R.D., Weenig R.H., Pockaj B.A., Bardia A., Vachon C.M., Schild S.E., McWilliams R.R., Hand J.L., Laman S.D., Kottschade L.A., Maples W.J., Pittelkow M.R., Pulido J.S., Cameron J.D., Creagan E.T. (2007)** Malignant melanoma in the 21st century, part 1: epidemiology, risk factors, screening, prevention and diagnosis. *Mayo Clin Proc* 82:365–380

- Masteller E.L., Chuang E., Mullen A.C., Reiner S.L., Thompson C.B. (2000)** Structural analysis of CTLA-4 function in vivo. *J Immunol.* 164:5319–5327
- Mosmann R. et Coffman R.L. (1989)** TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties *Annu Rev Immunol*, 7:145-173
- Murai M. et Oya M. (2014)** Renal cell carcinoma: etiology, incidence and epidemiology. *Curr Opin Urol.* 14:229–33
- Nossal G.J.V. (1994)** Negative selection of lymphocytes. *Cell* 76:229–239
- Olaru A., Petrie H.T., Livák F. (2005)** Beyond the 12/23 rule of VDJ recombination independent of the Rag proteins. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 174:6220–6226
- Parkin D.M., Mesher D., Sasieni P. (2011)** Cancers attributable to solar (ultraviolet) radiation exposure in the UK 2010. *Br J Dermatol* 105:S66–S69
- Patard J-J., Leray E., Rodriguez A., Rioux-Leclercq N., Guille´ F., Lobel B. (2003)** Correlation between symptom graduation, tumor characteristics and survival in renal cell carcinoma. *Eur Urol* 44:226–32
- Patel S.P. et Woodman S.E. (2011)** Profile of ipilimumab and its role in the treatment of metastatic melanoma. *Drug Des Devel Ther.* 5:489–495
- Postow M.A., Manuel M., Wong P., Yuan J., Dong Z., Liu C., Perez S., Tanneau I., Noel M., Courtier A., Pasqual N., Wolchok J. D. (2015)** Peripheral T cell receptor diversity is associated with clinical outcomes following ipilimumab treatment in metastatic melanoma. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 3:23
- Putra L.G., Minor T.X., Bolton D.M., Appu S., Dowling C.R., Neerhut GJ. (2009)** Improved assessment of renal lesions in pregnancy with magnetic resonance imaging. *Urology* 74:535–9
- Rathmell W.K. et Godley P.A. (2004)** Renal cell carcinoma. *Curr Opin Oncol* 16:247–52
- Reeves et Sinclair J. (2014)** Isolation and Characterisation of Dendritic Cells from Peripheral Blood. Vol 4, Iss 22
- Remzi M. et Marberger M. (2009)** Renal tumor biopsies for evaluation of small renal tumors: why, in whom and how? *Eur Urol* 55:359–67
- Richards M.H. et Nelson J.L. (2000)** The Evolution of Vertebrate Antigen Receptors: A Phylogenetic Approach. *Mol. Biol. Evol.* 17:146–155
- Robert C., Thomas L., Bondarenko I., O'Day S., Weber J., Garbe C., Lebbe C., Baurain J.F., Testori A., Grob J.J., Davidson N., Richards J., Maio M., Hauschild A., Miller W.H.J., Gascon P., Lotem M., Harmankaya K., Ibrahim R., Francis S., Chen T.T., Humphrey R., Hoos A., Wolchok J.D. (2011)** Ipilimumab plus Dacarbazine for Previously Untreated Metastatic Melanoma. *N Engl J Med* 2011; 364:2517-2526

- Robert L., Tsoi J., Wang X., Emerson R., Homet B., Chodon T., Mok S., Huang RR., Cochran AJ., Comin-Anduix B., Koya R.C., Graeber T.G., Robins H., Ribas A. (2014)** CTLA4 blockade broadens the peripheral T-cell receptor repertoire. *Clin Cancer Res.* 20:2424–2432
- Rowen L., Koop B.F., Hood L., (1996)** The complete 685-kilobase DNA sequence of the human  $\beta$  T cell receptor locus. *Science* 272:1755-1762
- Rozali E.N., Hato S.V., Robinson B.W., Lake R.A. et Lesterhuis W.J. (2012)** Programmed death ligand 2 in cancer-induced immune suppression. *Clin Dev Immunol.* 2012:656340
- Salerni G., Carrera G., Lovatto L., Martí-Laborda R. M. Palou G.I.J. Alós L., Puig S., Malveyh J., (2012)** Characterization of 1152 lesions excised over 10 years using total-body photography and digital dermatoscopy in the surveillance of patients at high risk for melanoma. *J Am Acad Dermatol* 67:836–45
- Scarpati G.D.V., Fusciello C., Perri F., Sabbatino F., Ferrone S., Carlomagno Ch., Pepe S. (2014)** Ipilimumab in the treatment of metastatic melanoma: management of adverse events. *OncoTargets and Therapy* 2014,7:203–209
- Sewell A.K. (2012)** Why must T cells be cross-reactive? *Nat Rev Immunol* 2:669–77
- Shannon B.A., Cohen R.J., de Bruto H., Davies R.J. (2008)** The value of preoperative needle core biopsy for diagnosing benign lesions among small, incidentally detected renal masses. *J Urol* 180:1257–61, discussion 1261
- Schadendorf D., van Akkooi A.C.J., Berking C., Griewank K.G., Gutzmer R., Hauschild A., Stang A., Roesch A., Ugurel A. (2018)** Melanoma. *The Lancet* 392: 971–84
- Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. (2018)** Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 68:7–30
- Simeone E., Gentilcore G., Giannarelli D., Grimaldi A.M., Caracò C., Curvietto M., Esposito A., Paone M., Palla M., Cavalcanti E., Sandomenico F., Petrillo A., Botti G., Fulciniti F., Palmieri G., Queirolo P., Marchetti P., Ferraresi V., Rinaldi G., Pistillo M.P., Ciliberto G., Mozzillo N., Ascierto P.A. (2014)** Immunological and biological changes and their correlation with Clinical Response and Survival during Ipilimumab in metastatic melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 63:675-683
- Takahashi T., Tagami T., Yamazaki S., Uede T., Shimizu J., Sakaguchi N., Mak T.W., Sakaguchi S. (2000)** Immunologic selftolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med.* 192:303–309
- Tarhini A. (2013)** Immune-mediated adverse events associated with ipilimumab ctla-4 blockade therapy: the underlying mechanisms and clinical management. *Scientifica (Cairo).* 2013:857519



- Taube J.M., Klein A.P., Brahmer J.R., Xu H., Pan X., Kim J.H., Chen L., Pardoll D.M., Topalian S.L., Anders R.A. (2014)** Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. *Clin Cancer Res.* 20:5064–5074
- Tendeiro Rego R., Morris E.C., Lowdell M.W. (2018)** T-cell receptor gene-modified cells: past promises, present methodologies and future challenges. *Cytotherapy* 00:117
- Tesařová L., Koutná I., Koristek Z., Klabusay M. (2011)** Multiple myeloma patients at peripheral blood stem cell harvest: Restricted usage of TCR beta variable families. *Clinical Immunology* 138:67–76
- Tesarova L., Koutná I., Dvorakova M., Klabusay M. (2012)** Relative expression of  $\gamma\delta$  T-cell receptor gene families detected by RT-PCR and capillary electrophoresis. *Int J Immunogenet.* 39(5):381-8
- Topalian S.L., Hodi F.S., Brahmer J.R., Gettinger S.N., Smith D.C., McDermott D.F., Powderly J.D., Carvajal R.D., Sosman J.A., Atkins M.B., Leming P.D., Spigel D.R., Antonia S.J., Horn L., Drake C.G., Pardoll D.M., Chen L., Sharfman W.H., Anders R.A., Taube J.M., McMiller T.L., Xu H., Korman A.J., Jure-Kunkel M., Agrawal S., McDonald D., Kollia G.D., Gupta A., Wigginton J.M., Sznol M. (2012)** Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 366:2443–2454
- Topalian S.L., Sznol M., McDermott D.F., Kluger H.M., Carvajal R.D., Sharfman W.H., Brahmer J.R., Lawrence D.P., Atkins M.B., Powderly J.D., Leming P.D., Lipson E.J., Puzanov I., Smith D.C., Taube J.M., Wigginton J.M., Kollia G.D., Gupta A., Pardoll D.M., Sosman J.A., Hodi F.S. (2014)** Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. *J Clin Oncol* 32:1020–1030
- Toyonaga B. et Mak, T. W. (1987)** Genes of the T-cell antigen receptor in normal and malignant T cells. *Annu Rev Immunol* 5:585-620
- Tsai K.K., Zarzoso I., Daud A.I. (2014)** PD-1 and PD-L1 antibodies for melanoma. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 10:11, 3111—3116
- Tsatmali M., Ancans J., Thody A.J. (2002)** Melanocyte function and its control by melanocortin peptides. *J Histochem Cytochem.* 50(2):125–33
- Tumeh P.C., Harview C.L., Yearley J.H., Shintaku I.P, Taylor E.J.M, Robert L., Chmielowski B., Spasic M., Henry G., Ciobanu V., West A.N., Carmona M., Kivork C., Seja E., Cherry G., Gutierrez A.J., Grogan T.R, Mateus C., Tomasic G., Glaspy J.A., Emerson R.O., Robins H., Pierce R.H., Elashoff D.A., Robert C., Ribas A. (2014)** PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* 515:568–571
- van den Beemd R., Boor P.P.C., van Lochem E.G., Hop W.C.J., Langerak A.W., Wolvers-Tettero I.L.M., Hooijkaas H., van Dongen J.J.M. (2000)** Flow cytometric analysis of the V $\beta$  repertoire in healthy controls. *Cytometry* 2000; 40:336-345

- Viret C. et Janeway J. C. A. (1999)** MHC and T cell development. Review of Immunogenetics 1:91–104
- von Boehmer H. (1997)** Aspects of lymphocyte developmental biology. Immunology Today 18:260–262
- Wei S., Charmley P., Robinson M.A., Concannon P. (1994)** "The extent of the human germline T-cell receptor V  $\beta$  gene segment repertoire". Immunogenetics 40:27-3
- Weiss A., Kadlecsek T., Iwashima M., Chan A., Van Oers N. (1995)** Molecular and Genetic Insights into T-Cell Antigen Receptor Signaling. Ann. N. Y. Acad. Sci. 766:149–156
- Wilson R. K., Lai E., Concannon E., Barth R.K., Hood L.E. (1988)** Structure, organization and polymorphism of murine and human Tcell receptor  $\alpha$  and  $\beta$  chain gene families. Immunol Rev 101:149-172
- Wing K., Onishi Y., Prieto-Martin P., Yamaguchi T., Miyara M., Fehervari Z., Nomura T., Sakaguchi S. (2008)** CTLA-4 control over Foxp3 + regulatory T cell function. Science. 322:271–275
- Yuan J.M., Castelao J.E., Gago-Dominguez M., Ross R.K., Yu M.C. (1998)** Hypertension, obesity and their medications in relation to renal cell carcinoma. Br J Cancer 77:1508–13
- Svod.cz:** <http://www.svod.cz/?sec=aktuality&lang=cz> 20. 3. 2019

**Tabulka 3.** Výsledky neparametrického Wilcoxonova testu jednotlivých Vβ rodin subpopulace CD4<sup>+</sup> T lymfocytů.

Pacient	Diagnóza	CD4																							
		Vβ3	Vβ7.1	Vβ53	Vβ16	Vβ17	Vβ9	Vβ20	Vβ5.1	Vβ18	Vβ8	Vβ13.6	Vβ13.1	Vβ12	Vβ2	Vβ5.2	Vβ21.3	Vβ1	Vβ23	Vβ14	Vβ22	Vβ11	Vβ7.2	Vβ4	Vβ13.2
<b>Kontroly (průměr v %)</b>		<b>5,13</b>	<b>1,59</b>	<b>1,02</b>	<b>1,1</b>	<b>4,87</b>	<b>3,39</b>	<b>2,93</b>	<b>5,61</b>	<b>1,93</b>	<b>4,25</b>	<b>1,63</b>	<b>3,46</b>	<b>1,66</b>	<b>8,78</b>	<b>0,92</b>	<b>1,99</b>	<b>3,11</b>	<b>0,48</b>	<b>2,12</b>	<b>3,36</b>	<b>0,91</b>	<b>1,2</b>	<b>1,9</b>	<b>2,97</b>
1	Ca ledviny	down	down		up	down			down												down			down	
2	Ca ledviny		down		up	down	up	down							down	down	up				down			down	
3	Ca ledviny	up	down		up	down		down					up	down							down			down	
4	Ca ledviny		down		up	down	up				down	up	up	down	up	up					down				
5	Ca ledviny		down		up	down								down		up									down
6	Ca ledviny		down		up	down	up	down			down	up					up		up		down			down	
7	Ca ledviny	up	down		up	down	up	down					up		down	up					down			down	
8	Ca ledviny	up	down		up	down	up	down			down	down			down	up					down			down	
9	Ca ledviny							down	up												up			up	
10	Ca ledviny	down			up	down	up	down						down		up									
11	Ca ledviny		up					down			down		up	up	down										
12	Ca ledviny	down				up		down				down									up				
13	Ca colon	up	down		up	down	up	down			up	up	up												
14	Ca colon	down	down		down	down					up			down	down	down					up				
15	melanom					down					up					down									
16	melanom	down				down						up		up		down								up	
17	melanom				up	down					down			down	up			up			down			down	
18	melanom																								
19	melanom				up	down					up														
20	melanom		down		up			up				down					up								
21	melanom		down			down		up				up	down		down						down				
22	melanom		down		up	down		down				up	down		down	down									
23	melanom				up			up				down		down							up				
24	melanom	down			up			up	down		up	up	up			down		up			down				
25	melanom	up	down		up			down							up	down					down				
26	melanom choroidei					down		up						down				up		up				up	

Významný nárůst Vβ rodiny je vyznačen slovem „up“ a významný úbytek slovem „down“. Sloupce určují Vβ rodinu. Řádky určují pacienty s určitou diagnózou. Jako významný nárůst je hodnocena úroveň  $p < 0.001$  pomocí Wilcoxonova testu.

**Tabulka 4.** Výsledky neparametrického Wilcoxonova testu jednotlivých V $\beta$  rodin subpopulace CD8<sup>+</sup> T lymfocytů.

Pacient	Diagnóza	CD8																							
		V $\beta$ 3	V $\beta$ 7.1	V $\beta$ 5.3	V $\beta$ 16	V $\beta$ 17	V $\beta$ 9	V $\beta$ 20	V $\beta$ 5.1	V $\beta$ 18	V $\beta$ 8	V $\beta$ 13.6	V $\beta$ 13.1	V $\beta$ 12	V $\beta$ 2	V $\beta$ 5.2	V $\beta$ 21.3	V $\beta$ 1	V $\beta$ 23	V $\beta$ 14	V $\beta$ 22	V $\beta$ 11	V $\beta$ 7.2	V $\beta$ 4	V $\beta$ 13.2
<b>Kontroly (průměr v %)</b>		<b>6,1</b>	<b>4,41</b>	<b>1,73</b>	<b>1,48</b>	<b>3,71</b>	<b>2,41</b>	<b>3,59</b>	<b>2,21</b>	<b>1,05</b>	<b>4,75</b>	<b>1,39</b>	<b>4,36</b>	<b>1,28</b>	<b>6,05</b>	<b>1,15</b>	<b>2,08</b>	<b>3,88</b>	<b>1,54</b>	<b>6,41</b>	<b>3,23</b>	<b>0,59</b>	<b>3,51</b>	<b>1,42</b>	<b>5,67</b>
1	Ca ledviny	up	down	down				down		dowr				down				dowr	down	down	down				
2	Ca ledviny		down	down					down	dowr		up						up							
3	Ca ledviny		down					down	up	up											down		down		
4	Ca ledviny		down	down		down			down			down		down							down	down			
5	Ca ledviny		down	down					down			down		down							down	down	up		down
6	Ca ledviny		down	down		down			down		dowr	up	up	up				dowr			down				
7	Ca ledviny	down	down	down					down									dowr			down				
8	Ca ledviny		down						down		dowr			down					up		down				
9	Ca ledviny		down																				down		down
10	Ca ledviny	down	down			down			down		dowr		down	down				up		down	down				
11	Ca ledviny		down	down				down	down	up	up	up								up	down		down		
12	Ca ledviny	down	down	down				down	up			down	down	down							down		down		
13	Ca colon		down	down		down			up												down		down		
14	Ca colon	up		down		up		down			dowr							up		down	down		down		
15	melanom	down	down	down		down					up		up					up		down					down
16	melanom	down	down					down	down		dowr			down						down	down		up		up
17	melanom							down		up	dowr						up	up		down		up			up
18	melanom		down							down											down		up		up
19	melanom	up	down	down		down			down		dowr			up				dowr		down		down			down
20	melanom		down	down					down		dowr									up	down				
21	melanom			down				down	down		dowr		down	down							down	down	up		
22	melanom											up									down				down
23	melanom			down					down		dowr	up		down							down		up		
24	melanom	down		down				down	down		up			down					up	down	up				
25	melanom	up	down	down					down		dowr								up	down					
26	melanom choroidei					up															down				

Významný nárůst V $\beta$  rodiny je vyznačen slovem „up“ a významný úbytek slovem „down“. Sloupce určují V $\beta$  rodinu. Řádky určují pacienty s určitou diagnózou. Jako významný nárůst je hodnocena úroveň  $p < 0.001$  pomocí Wilcoxonova testu.