

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Nádorová imunoterapie založená na kombinaci TLR ligandů
a ligandů fagocytárních receptorů**

Bakalářská práce

Ondřej Uher

Školitel: RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice 2015

Uher, O., 2015: Nádorová imunoterapie založená na kombinaci TLR ligandů a ligandů fagocytárních receptorů. [Cancer immunotherapy based on the combination of TLR ligands and ligands of phagocytic receptors. Bc. Thesis, in Czech] – 44 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

ANOTACE:

The main goal of this thesis was to study cancer immunotherapy based on combination of TLR ligands and ligands of phagocytic receptors. We studied replacement of LPS by bacterium *Borrelia burgdorferi* or Resiquimod in cancer immunotherapy. We also tried to block CD47 in cancer immunotherapy. The last aim of this thesis was phosphatidylserine expression on melanoma cells B16-F10.

PROHLÁŠENÍ:

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 20. 4. 2015

.....
Ondřej Uher

Poděkování:

V první řadě bych chtěl poděkovat svému školiteli RNDr. Janu Ženkovi, CSc. za jeho odborné vedení, ochotu a přátelský přístup při vedení této bakalářské práce. Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Veronice Caisové za pomoc a vedení při práci a za ochotu a trpělivost při zpracovávání výsledků. V neposlední řadě si velké poděkování zaslouží má rodina, která mě, nejen po dobu psaní této práce, vždy velmi podporovala.

Obsah

1 ÚVOD	1
2 PŘEHLED LITERATURY	2
2.1 Nádorová onemocnění	2
2.1.1 Klasifikace nádorových onemocnění	2
2.1.1.1 Myší melanom B16–F10 studovaný v této práci	3
2.2 Imunitní systém a nádorové onemocnění	3
2.2.1 Imunitní systém	3
2.2.2 Protinádorová imunologie	4
2.2.2.1 Nádorové imunitní znaky	5
2.2.2.2 Vztah mezi nádorovým onemocněním a imunitním systémem	5
2.2.2.3 Způsoby úniku nádorových buněk imunitní odpovědi	6
2.3 Imunoterapie nádorových onemocnění založená na specifické imunitě	7
2.4 Imunoterapie nádorových onemocnění založená na nespecifické imunitě	8
2.4.1 Pathogen associated molecular patterns	8
2.4.1.1 Pattern recognition receptors	8
2.4.1.2 Toll-like receptory	9
2.4.2 Použití bakterií jako motivu PAMPs v nádorové terapii	10
2.4.2.1 <i>Borrelia burgdorferi</i>	11
2.5 Nádorová imunoterapie založená na kombinaci TLR ligandů a ligandů fagocytárních receptorů	11
2.5.1 TLR agonisté používané našim týmem pro nádorovou imunoterapii	11
2.5.2 Fagocytární receptory a jejich agonisté použité v této práci	12
2.6 CD 47	14
2.7 Fosfatidylserin	14
3 CÍLE PRÁCE	16
4 MATERIÁL A METODY	17
4.1 Chemikálie	17
4.2 Laboratorní zvířata	17
4.3 Příprava nádorových buněk B16-F10 pro transplantaci	17
4.4 Transplantace buněk B16-F10	18
4.5 Příprava neutrofilů	18
4.6 Měření velikosti nádoru	19
4.7 Počítání plicních metastáz	19
4.8 Příprava terapeutických látek	19
4.9 Analýza dat	20
4.10 Experimenty	20
4.10.1 Terapie melanomu pomocí kovalentně vázané bakterie <i>Borrelia burgdorferi</i>	20
4.10.2 Terapie melanomu pomocí anti CD47 aptameru a Anti-Mouse CD47 protilátky	21
4.10.3 Studium otázky exprese fosfatidylserinu na povrchu nádorových buněk pomocí průtokové cytometrie	22
4.10.3.1 Míra exprese fosfatidylserinu na buňkách B16-F10 z buněčné kultury v závislosti na stresovém faktoru	22
4.10.3.2 Vliv neutrofilů na míru exprese fosfatidylserinu na buňkách B16-F10 z buněčné kultury	24
5 VÝSLEDKY	25
5.1 Terapie melanomu pomocí kovalentně vázané bakterie <i>Borrelia burgdorferi</i>	25
5.2 Terapie melanomu pomocí anti CD47 aptameru a Anti-Mouse CD47 protilátky	28

5.3 Studium otázky exprese fosfatidylserinu na povrchu nádorových buněk pomocí průtokové cytometrie.....	31
5.3.1 Míra exprese fosfatidylserinu na buňkách B16-F10 z buněčné kultury v závislosti na stresovém faktoru.....	31
5.3.2 Vliv neutrofilů na míru exprese fosfatidylserinu na buňkách B16-F10 z buněčné kultury.....	33
6 DISKUZE.....	35
7 ZÁVĚR.....	39
8 POUŽITÁ LITERATURA.....	40

1 ÚVOD

Nádorová onemocnění představují celosvětově jednu z nejčastějších příčin úmrtí. Následující čísla jsou toho důkazem. Odhaduje se, že v roce 2012 bylo po celém světě zaznamenáno 14,1 mil. nových případů nádorových onemocnění a 8,2 mil. této zhoubné chorobě podlehl (Ferlay a kol. 2015). Ve stejném roce bylo jen v Evropě kolem 3,45 mil. nově diagnostikovaných pacientů a zemřelo jich kolem 1,75 mil. (Ferlay a kol. 2013). A právě i přes probíhající snahy o snížení růstu incidence nádorových onemocnění, které jsou úspěšné jen zčásti, se řadí nádorová onemocnění mezi zásadní zdravotní problémy (Dušek a kol. 2014).

Chemoterapie nebo radioterapie, která se v dnešní době nejčastěji používá jako léčba nádorových onemocnění, je kvůli své nespecifičnosti schopna poškozovat i zdravé buňky. Toto je hlavním důvodem, proč se stále hledá vhodnější terapie, která by byla cílená pouze na nádorové buňky a nepoškozovala by buňky ostatní. Imunoterapie se zdá jako vhodným kandidátem. Nejen díky svému využití přirozených imunitních mechanismů, které směřují k aktivaci protinádorové imunity, ale i schopnosti cíleně směřovat léčiva do místa nádoru.

Proto i tato bakalářská práce se zabývá mechanismy imunoterapie a hledá vhodné prostředky pro zvýšení efektivity léčby nádorových onemocnění.

2 PŘEHLED LITERATURY

2.1 Nádorová onemocnění

Během let se vyvinulo mnoho názorů na vznik nádorových onemocnění. A ačkoli základy mutační genové teorie pochází z konce 19. a počátku 20. století, tak nejlepší důkaz této teorie se objevil až v 80. letech minulého století (Stratton a kol. 2009). Jak už název této teorie napovídá, mutační genová teorie říká, že nádorová onemocnění vznikají z libovolné buňky jako následek nahromadění mutací v genomu (Hemminki 1993). Vyvrací to i nesprávnou domněnku některých lidí, kteří si myslí, že dříve lidé nádorovým onemocněním netrpěli a jeho výskyt nebyl tak častý (Petruželka a Konopásek 2003). Právě díky delší průměrné délce života a špatnému životnímu stylu mají mutace více času se v genomu nahromadit.

Navzdory tomu, že nádorová onemocnění jsou heterogenní choroby, mají určité charakteristické znaky, které získají po dobu jejich onkogeneze. Tyto znaky sumarizoval v roce 2011 Hanahan a Weinberg. Jedná se o neomezenou replikovatelnost, rezistence k programované buněčné smrti, schopnost invaze a tvorba metastáz, indukce angiogeneze, autonomní stimulace růstu, necitlivost k růstovým inhibitorům, genomová nestabilita, reprogramování buněčného metabolismu, mikroprostředí nádoru, zánětlivý stav a v neposlední řadě únik imunitnímu systému (Hanahan a Weinberg 2011).

2.1.1 Klasifikace nádorových onemocnění

Pod pojem nádorová onemocnění se zahrnují maligní, benigní a intermediární neboli hraniční nádory. Toto je klasifikace nádorů podle biologické povahy, tedy podle chování a vlastností nádoru. Nádory **maligní** (zhoubné) rostou rychle, jsou neohraničené, rostou invazivně a vyoperování je často obtížné. Hlavním problémem těchto nádorů je tvorba metastáz. Na druhou stranu **benigní** (nezhoubné) nádory metastáze netvoří, rostou pomalu a jsou ohraničené. Další rozdíl je, že rostou expanzivně a vyoperování je snadné. Poslední skupinou jsou **intermediární** (hraniční) nádory, které tvoří soubor nádorů s vlastnostmi, které nelze jednoznačně zařadit. Mívají lepší prognózu než nádory maligní, ale na rozdíl od benigních nádorů mohou recidivovat, popřípadě tvořit metastázy (Koldová 2013).

Další klasifikace nádorových onemocnění je podle tkáně, ze které vznikají. Rozlišují se nádory mezenchymové, epitelové, neuroendokrinní, germinální nádory, smíšené nádory, choriokarcinom, mezoteliom a nádory z nervové a pigmentotvorné

tkáně (Koldová 2013). V neposlední řadě jsou nádorová onemocnění klasifikována podle anatomické lokalizace. Tedy podle místa, kde se nádor u pacienta vyskytuje (Vorlíček 2006).

2.1.1.1 Myší melanom B16–F10 studovaný v této práci

Podle výše uvedených klasifikací nádorových onemocnění patří melanom mezi maligní nádory pigmentotvorných tkání. Melanom je schopen i po odstranění jeho primárního ložiska generalizovat a postupem času metastazovat do různých tkání a orgánů (Koldová 2013).

Melanomová myší buněčná linie B16 byla selektována právě kvůli její schopnosti tvorby plicních metastáz a zvýšené invazivity. U buněčné linie bylo zjištěno, že jejich metastatické vlastnosti jsou stabilní i po mnoha kultivacích *in vitro* (Fidler 1975). Z těchto důvodů byl pro tuto práci vybrán typ melanomové linie B16-F10. Kromě námi zvoleného typu melanomové buněčné linie B16-F10 existují ještě B16-F0, B16-F1 a B16-BL6. Linie B16-F0 je parentální a ostatní zmíněné linie byly od této odvozeny. Od námi zvolené linie B16-F10 byla odvozena linie B16-BL6, která má schopnost invazivity ještě vyšší (Nakamura a kol. 2002). Označení F1 a F10 určují, kolika selekčními procedurami byla daná linie získána tzn. F1 byla získána jednou selekční procedurou a F10 deseti selekčními procedurami (Fidler 1973).

2.2 Imunitní systém a nádorové onemocnění

Strategie ochrany organismu před odcizenými buňkami je založena na identifikaci a následné likvidaci těchto buněk. Identifikace tělu nebezpečných buněk, které byly původně tolerovány a imunitním systémem chráněny, je založena na rozpoznání nových antigenních struktur, které se objevily na odcizených buňkách v souvislosti se změnou jejich chování (Jílek 2005). Velmi často se ale stává, že nádorové buňky unikají imunitnímu dohledu a nejsou tak eliminovány, což zapříčiní rozvoj nádorového růstu (Delves a kol. 2012).

2.2.1 Imunitní systém

Imunitní systém obratlovců je systém buněk a molekul, které spolupracují na ochraně jedince před infekčními organismy a na odstraňování vlastních nemocných či starých buněk. Ačkoli je imunitní systém vcelku složitý, můžeme jeho funkci

zjednodušit na dvě základní role: **rozpoznání** cizích látek a organismů a **odstranění** takovýchto agens.

Imunitní systém obratlovců se skládá ze tří stupňů obrany. První stupeň je anatomická bariéra (např. kůže, povrchy mukózních membrán a mukózní sekrety), druhý stupeň je vrozená (nespecifická) imunita a třetí získaná (specifická) imunita (Delves a kol. 2012).

Vrozená (nespecifická) imunita se snaží zabít infekční agens v momentě, co vstoupí do těla. Hlavní zásluhu na tomto typu imunity mají makrofágy, granulocyty dendritické buňky a přirození zabíječi neboli NK buňky. Tyto zmiňované buňky jsou schopny rozpoznat struktury na povrchu patogenů. Tyto struktury se nazývají pathogen associated molecular patterns (PAMPs) a jsou rozpoznávány pomocí receptorů pattern recognition receptors neboli PRRs, které jsou umístěny právě na povrchu buněk vrozené imunity. Pokud buňky rozpoznají daný patogen, odstraní ho pomocí fagocytózy nebo spuštěním komplementu (Delves a kol. 2012).

Působení vrozeného imunitního systému je také zodpovědné za aktivování buněk, které fungují jako **získaná (specifická) imunita**. Buňky získané imunity, kam patří T-lymfocyty, B-lymfocyty a plazmatické buňky, mají určité schopnosti. První je imunologická paměť, která při sekundárním setkání s antigenem zajistí rychlejší a silnější imunitní reakci, než tomu bylo poprvé. Dále pak schopnost rozpoznávání i drobných rozdílů mezi antigeny (specifita) a schopnost vytvoření řad struktur rozpoznávající různé antigeny (diverzita) (Delves a kol. 2012).

Obě výše zmíněné imunity jsou tvořeny dvěma složkami a to buněčnou složkou a humorální složkou. Buněčná složka zahrnuje buňky dané imunity. Složka humorální u vrozené imunity je tvořena komplementovým systémem, lektiny, interferony a jinými sériovými proteiny. U získané imunity je potom humorální složka založená na protilátkách (Hořejší a Bartůňková 2009).

2.2.2 Protinádorová imunologie

Nádorové buňky se od normálních buněk, ze kterých vznikly, liší více či méně. Proto by teoreticky měly být rozpoznány imunitními mechanismy a následně odstraněny. Ale odlišnosti od normálních buněk jsou někdy buď tak malé, že je imunitní systém ignoruje, nebo nádorové buňky využívají mechanismy, které jim umožní neutralizovat některé zbraně imunitního systému (Hořejší a Bartůňková 2009).

2.2.2.1 Nádorové imunitní znaky

Jakýkoli protein produkovaný v nádorových buňkách, který má odlišnou strukturu kvůli mutacím, může působit jako nádorový antigen. Základní předpoklad reakce imunitního systému s nádorovými buňkami je přítomnost právě těchto specifických povrchových antigenů. Imunitní systém rozpoznává tyto antigeny a vyhodnocuje je jako cizí. Nádorové antigeny jsou nejčastěji prezentovány MHC-I a MHC-II molekulami na povrchu buněk (Delves a kol. 2012).

Nádorové antigeny dělíme na dvě kategorie: **antigeny specifické pro nádory (TSA)** a **antigeny asociované s nádory (TAA)**. Antigeny specifické pro nádory se vyskytují jen na nádorových buňkách a na normálních buňkách se nevyskytují. Na druhou stranu antigeny asociované s nádory se vyskytují nejen na nádorových buňkách, ale i na některých normálních buňkách. Odlišnost spočívá v množství exprese nebo v abnormální časové nebo místní expresi (Hořejší a Bartůňková 2009). Tyto antigeny slouží jako markery, které jsou nezbytné pro diagnostiku nádorových onemocnění (Old a Chen 1998).

2.2.2.2 Vztah mezi nádorovým onemocněním a imunitním systémem

Mikroprostředí nádoru obsahuje nejen buňky vrozené a získané imunity, ale i buňky okolního stromatu (fibroblasty, endoteliální buňky, pericyty a mezenchymální buňky). Všechny tyto buňky mezi sebou vzájemně komunikují prostřednictvím přímého kontaktu nebo pomocí cytokinů a chemokinů (Grivennikov 2010). **Cytokiny** jsou produkovány jak buňkami stromatu, tak imunitními buňkami. Právě cytokiny mají klíčovou roli v nádorovém růstu. Na jednu stranu mohou být zapojené v aktivaci imunitních efektorových mechanismů, které omezují růst nádoru. Ale na druhou stranu mohou ovlivňovat nádorový růst, maligní transformaci, invazi a metastazování. Mezi nejvýznamnější cytokiny v protinádorové imunitě patří: TNF, který stimuluje aktivitu makrofágů a NK buněk; IL-2, který aktivuje T-lymfocyty; GM-CSF, který aktivuje T-lymfocyty a makrofágy a také IL-12, což je prozánětlivý cytokin, který podporuje proliferaci preaktivovaných T-lymfocytů a NK buněk (Smyth a kol. 2004).

Makrofágy hrají jednu z klíčových rolí v protinádorové imunitě. Nejen, že mají hlavní význam v přirozené obraně proti intracelulárním parazitům a nádorovým buňkám, ale také jsou známy jako antigen prezentující buňky (APC), které pomáhají T-lymfocytům v jejich aktivaci. Dále mohou v přítomnosti protilátek usmrcovat buňky,

kteřé mají na svém povrchu specifický antigen pro danou protilátku. Jsou schopny fagocytovat právě zmíněné parazity, nádorové buňky, ale i mikroby (Ferenčík 2004).

CD4+ lymfocyty (Th) rozpoznávají antigeny, které jsou prezentovány spolu s MHC-II molekulami na povrchu antigen prezentujících buněk (APC), jako jsou např. B-lymfocyty, makrofágy a dendritické buňky. Rozpoznáním antigenů dojde k aktivaci CD4+ lymfocytů a poté k produkci cytokinů (např. IL-2) a dalších chemických látek, jako třeba interferonu gama (IFN- γ). IL-2 hraje důležitou roli v proliferaci a aktivaci prekurzorů cytotoxických **CD8+ lymfocytů (Tc)**, které rozeznávají některé nádorové buňky a ničí je specifickými mechanismy. Tyto mechanismy jsou postaveny na principu těsného kontaktu mezi Tc-lymfocytem a příslušnou buňkou. Rozpoznáním komplexu molekuly MHC-I s nádorovými antigeny na povrchu APC, pomocí prekurzorů Tc-lymfocytů, dojde k aktivaci prekurzorů Tc-lymfocytů a následnému dělení a diferencování ve zralé **efektorové cytotoxické buňky (CTL)**. CTL využívají několik mechanismů, kterými nádorové buňky zabíjí. Jedná se například o mechanismy, jako jsou Fas ligandy nebo cytotoxická granula (Hořejší a Bartůňková 2009).

Nelze opomenout ani význam **NK buněk** v protinádorové imunitě. NK buňky jsou populací leukocytů, které jako T a B buňky využívají receptory, které mohou vyvolat jejich aktivaci. NK buňky rozpoznávají nádorové buňky pomocí exprese MHC-I molekul. Nádorové buňky potlačují MHC-I, aby se vyhnuly napadení CTL. Díky málo molekulám MHC-I na povrchu nádorových buněk mohou NK buňky rozpoznat pomocí svého receptoru (KIRs) nádorové buňky od normálních buněk, které expresi MHC-I nepotlačují (Garcia-Lora a kol. 2003). Následkem rozpoznání nádorových buněk je sekrece cytokinů NK buněk, zejména IFN- γ , a doručení signálu nádorovým buňkám buď pomocí Fas ligandu, nebo cytotoxických granul. Ta jsou schopna zabít nádorovou buňku (Delves a kol. 2012).

2.2.2.3 Způsoby úniku nádorových buněk imunitní odpovědi

Jedním z mechanismů úniku nádorových buněk imunitě je již dříve zmíněná nižší exprese MHC-I. Stává se ale, že nádorové buňky exprimují jen takové množství MHC-I, kterého si nevšimnou CTL buňky. Ale pro NK buňky je to stále velká exprese MHC-I, aby mohly použít mechanismy pro odstranění nádorové buňky (Villalba a kol. 2013).

Další z mechanismů úniku nádorových buněk imunitě je vylučování TGF- β (transforming growth factor beta), který vylučují nádorové buňky. TGF- β působí

na CD4+ buňky, ze kterých se stávají T-regulační lymfocyty (Treg). Treg vylučují rovněž TGF- β a tím autokrinně podporují vlastní vznik. TGF- β nebo přímý kontakt Treg a CTL zapříčiňují supresi CTL buněk a tím nádor uniká imunitnímu systému. Další cytokin, produkovaný buňkami Treg, je IL-10, který rovněž zapříčiňuje nádorovou toleranci (Facciabene a kol. 2012).

Fas ligand. To je další z možností úniku nádorových buněk před imunitním dohledem. Fas ligand (FasL) je transmembránový protein stimulující apoptózu buněk, které mají Fas. Fas je transmembránový receptor pro FasL. Navázáním FasL na Fas se spustí apoptóza právě na buňce nesoucí Fas. Nádorové buňky snižují hladinu Fas a posilují expresi FasL. To zapříčiní nejen odolnost nádorových buněk vůči apoptóze, ale i vyvolání apoptózy u lymfocytů po přímém kontaktu s nádorovou buňkou. Lymfocyty mají jak FasL, tak Fas, jako pojistku pro regulaci (Chiu a kol. 2013).

2.3 Imunoterapie nádorových onemocnění založená na specifické imunitě

Imunoterapie nádorových onemocnění udělala za posledních několik let významný pokrok díky lepšímu pochopení základních principů nádorové biologie a imunologie

Rostoucí množství klinických důkazů ukazuje, že využití **monoklonálních protilátek (mAbs)** pro imunoterapii nádorových onemocnění, je efektivní metoda léčby nejen hematologických malignit, ale i solidních nádorů (Kirkwood a kol. 2012). Každá monoklonální protilátka rozpoznává jeden konkrétní protein. Funkce protilátek lze shrnout jako důsledek několika mechanismů: přímý účinek protilátky (indukce apoptózy, dodání léčiva), modulace imunitního systému (aktivace T buněk, cytotoxicita závislá na komplementu), přímá opsonizace a buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (ADCC) (Scott a kol. 2012).

Další druh imunoterapie založené na specifické imunitě je využití **dendritických buněk (DC)**. DC jsou heterogenní populace antigen prezentujících buněk (APC). Imunoterapie pomocí těchto buněk je založená na odebrání periferních monocytů z pacienta (leukaferéza), ze kterých se poté připraví nezralé DC pomocí IL-4 a GM-CSF. (Rožková a kol. 2009). Dále se odebere nádorová tkáň od pacienta a připraví se směs nádorových antigenů. Poté se nezralé DC smíchají s nádorovými antigeny. Dojde k prezentaci těchto antigenů na povrchu dendritických buněk spolu s MHC-II. Takto

aktivované dendritické buňky jsou navraceny zpět do pacienta, kde dochází k aktivaci T-lymfocytů a poté k imunitní odpovědi proti nádorovým buňkám (Gilboa 2007).

Existují další typy imunoterapie založené na specifické imunitě, jako jsou: peptidové vakcíny (Kirkwood a kol. 2012) nebo imunoterapie založená na produktech imunitního systému (Hořejší a Bartůňková 2009).

2.4 Imunoterapie nádorových onemocnění založená na nespecifické imunitě

Nespecifická imunita slouží jako první linie obrany proti infekci. Imunoterapie pomocí specifické imunity je založena na rozpoznání pathogen associated molecular patterns (PAMPs) pomocí pattern recognition receptors (PRRs).

2.4.1 Pathogen associated molecular patterns

APC buňky, jako jsou makrofágy a dendritické buňky, rozpoznávají PAMPs právě pomocí PRRs (Kumagai a Akira 2010). PAMPs jsou například lipopolysacharidy (endotoxin), peptidoglykany (buněčná stěna), lipoproteiny, dsDNA virů, flagelin nebo třeba manan (Thomas a Badini 2011). Rozpoznání PAMPs pomocí PRRs vede k aktivaci APC, které prezentují antigen specifické imunitě. PAMPs jsou přítomny na bakteriích a virech, ale na nádorových buňkách se nevyskytují. Mimo PAMPs vyvolávají imunitní odpověď i určité endogenní molekuly zvané damage associated molecular patterns (DAMPs), které také po navázání na PRRs spouští imunitní reakci (Kumagai a Akira 2010). DAMPs jsou sekretovány pouze buňkami, které prochází neprogramovanou buněčnou smrtí. Pokud buňka prochází apoptózou, tedy klasickou programovanou smrtí, DAMPs nesekretuje. Pomocí tohoto systému tělo pozná, zda daná buňka umřela přirozeně či nikoli. Mezi hlavní zástupce DAMPs patří HMGB1, S100 proteiny, IL-1 α nebo třeba heat shock proteiny a kyselina močová (Bianchi 2007).

2.4.1.1 Pattern recognition receptors

Buňky vrozené imunity používají PRRs pro rozpoznání PAMPs. Výsledkem jejich základních funkcí je opsonizace, indukce zánětu, fagocytóza, aktivace komplementu a koagulační kaskády nebo navození apoptózy (Janeway a Medzhitov 2002).

PRRs můžeme rozdělit do tří tříd: membránové, cytoplazmatické a sekretované (Abouelmaatti a kol. 2013).

Mezi **sekretované PRRs** řadíme C-reaktivní protein (CRP) a manózu vázající lektin (MBL). Oba proteiny jsou tvořeny v játrech a vylučovány do těla při akutních infekcích. Spouští komplementovou kaskádu vedoucí k opsonizaci patogenů a urychlení fagocytózy (Janeway a Medzhitov 2002).

Další skupinou jsou **PRRs cytoplasmatické**. Sem patří například RIG-1-like receptory nebo NOD like receptory (NLR). Oba slouží jako druhá vlna obrany při napadení těla patogenními mikroorganismy. RIG-1-like receptor rozpoznává většinou virovou RNA, naproti tomu NOD like receptory rozpoznávají bakteriální komponenty (Akira a kol. 2006).

Poslední skupinou jsou **PRRs membránové**. Do této skupiny patří C-typ lektinové receptory (CLR) (např. receptor Dectin-1), které rozpoznávají sacharidy virů, bakterií a hub. Po navázání CLR na PAMPs se spouští signální dráhy vedoucí ke změně genové exprese (Figdor a kol. 2002). Formyl peptidové receptory (FPRs), které také patří do membránových PRRs, rozpoznávají formyl peptidové molekuly. Podílí se tím na obraně hostitele při bakteriální infekci (Le a kol. 2002). Dalším druhem membránových PRRs jsou scavengerové receptory. Tyto receptory nejen že vychytávají nízkodenzitní lipoproteiny (LDL), ale také dokážou rozpoznat apoptotické buňky a endogenní molekuly (PrabhuDas a kol. 2014). Poslední skupinou membránových PRRs jsou Toll-like receptory (TLRs).

2.4.1.2 Toll-like receptory

Toll-like receptory (TLRs) byly první PRRs, které byly definovány. Jsou také nejlépe prostudované ze všech PRRs (Kawai a Akira 2011). V dnešní době známe deset lidských (TLR 1-10) a dvanáct myších druhů TLRs (TLR 1–9 a TLR 11-13) (Takeda a Akira 2005). Strukturou se TLRs řadí do transmembránových proteinů I. Typu. Obsahují ektodoménu, která obsahuje repetice bohaté na leucin, jež zprostředkovávají rozpoznání PAMPs, transmembránovou oblast a Toll-IL-1 (TIR) doménu, která aktivuje cytoplasmatickou signální dráhu. TLRs se vyskytují na povrchu buňky nebo jsou spojeny s intracelulárními vezikuly. Každý TLR detekuje odlišné PAMPs odvozené od virů, bakterií, mykobakterií, hub a parazitů (Kawai a Akira 2011). Shrnutí, který TLR rozpoznává daný PAMPs, je uvedeno v následující tabulce (Tab. I; Kawai a Akira 2011).

Tab. I: PAMPs detekované TLRs (převzato z Kawai a Akira 2011).

Druhy	PAMPs	TLR
Bakterie, mykobakterie	LPS	TLR4
	lipoproteiny, LTA, PGN,	TLR2/1, TLR2/6 (heterodimery)
	flagelin	TLR5
	DNA	TLR9
	RNA	TLR7
Viry	DNA	TLR9
	RNA	TLR3, TLR7, TLR8
	strukturální proteiny	TLR2, TLR4
Houby	zymosan, β -glukan	TLR2, TLR6
	Manan	TLR2, TLR4
	DNA	TLR9
	RNA	TLR7
Parazitě	DNA	TLR9
	hemozoin (<i>Plasmodium</i>)	TLR9
	fosfatidylinositol (<i>Trypanosoma</i>)	TLR4

Po rozpoznání PAMPs, TLRs aktivují signální dráhu, která vede k indukci genů, které stimulují imunologickou odpověď. Výsledek je exprese řady cytokinů a chemokinů (Kawai a Akira 2011).

2.4.2 Použití bakterií jako motivu PAMPs v nádorové terapii

Využitím bakterií v nádorové terapii se začal zabývat Dr. Coley, který si povšimnul v určitých případech regrese nádorových onemocnění po infekčním onemocnění (Bickels a kol. 2002). Později aplikoval pacientům s nádorovým onemocněním směs inaktivovaných bakterií známou jako Coley toxin (*Streptococcus pyogenes* a *Serratia marcescens*) (Coley 1910).

Další využití bakterií v nádorové terapii je použití BCG vakcíny. Ta je připravena ze živých, ale oslabených bakterií kmene *Mycobacterium bovis* a dnes se využívá při léčbě karcinomu močového měchýře (Peterson a Patel 1998).

Výše zmíněné příklady využití bakterií v protinádorové terapii jsou založeny na použití celých bakterií. V dnešní době se ale více používají jen bakteriální fragmenty nebo uměle syntetizované ligandy. Mezi bakteriální fragmenty patří například CpG oligonukleotidy (krátký úsek jednořetězcové bakteriální DNA) (Carpentier a kol. 2006), manan, formylmethioninové motivy nebo laminarin. Na nádorové buňky kotvený

manan, laminarin, popřípadě f-MLF byl použit v synergii s LPS (Janotová a kol. 2014). Jeden z hlavních cílů této práce je právě náhrada LPS, který je pro člověka nebezpečný. Proto bylo vyzkoušeno využití bakterie *Borrelia burgdorferi* jako náhrada za zmíněné LPS.

2.4.2.1 *Borrelia burgdorferi*

Borrelia burgdorferi je gram-negativní bakterie z kmene *Spirochaetes* (Samuels a Radolf 2010). Objevena byla roku 1982 Wilhelmem Burgdorferem a je známá spíše jako původce lymfské boreliózy (Baranton a kol. 1992).

Velikost této bakterie je 0,2-0,5 x 0,5-30 μm . Vnější buněčná membrána se skládá ze 45-62% proteinů, 23-50% lipidů a 3-4% sacharidů. Složení její membrány se významně liší od gram-negativních bakterií. Hlavní odlišnost je absence fosfatidylethanolaminu (PE) a lipopolysacharidu (LPS) (Samuels a Radolf 2010). Právě z důvodu absence LPS byla tato bakterie použita i v nádorové terapii popsané v této práci.

2.5 Nádorová imunoterapie založená na kombinaci TLR ligandů a ligandů fagocytárních receptorů

Jak zjistila Janotová a kol. (2014), pro silný protinádorový účinek je vhodné kombinovat rozpustné ligandy se signalizačním účinkem spolu s ligandy fagocytárních receptorů kotvené na nádorové buňky. Signalizační účinek zapříčiňuje granulocytární infiltraci a rozvinutí zánětlivého procesu. Na druhou stranu ligandy fagocytárních receptorů nasměrují fagocytární buňky na nádorové buňky a to vede k jejich likvidaci (Janotová a kol. 2014).

Jelikož v práci Janotové a kol. (2014) využívali LPS jako ligand se signalizačním účinkem, je potřeba tento ligand nahradit jiným, méně nebezpečným pro člověka.

2.5.1 TLR agonisté používané našim týmem pro nádorovou imunoterapii

Mezi hlavní TLR agonisty patří **lipopolysacharidy (LPS)**. LPS je důležitý stavební prvek vnější buněčné stěny gram-negativních bakterií, který je uvolňován do okolí při růstu, dělení a smrti bakterie. Funguje tedy jako endotoxin (Erridge a kol. 2002). Skládá se ze tří částí lipid A, O-antigen a oligosacharidové jádro spojující lipid A

a O-antigen. Lipid A je hlavní PAMPs LPS. Receptor lipidu A je TLR4, což z LPS dělá agonistu právě pro TLR4 (Lu a kol. 2008).

Po rozpoznání LPS dochází k oligomerizaci TLR4 a zapojení jeho downstreamových adaptorů přes interakci s TIR doménou. TLR4 signalizace se rozchází do dvou drah. První dráha je na MyD88 závislá, která vede k navození exprese prozánětlivých cytokinových genů a druhá je na MyD88 nezávislá, která vede k produkci interferonů typu I (Lu a kol. 2008).

Resiquimod (R-848), který jsme používali v této práci jako náhradu za LPS, je ligand pro TLR7 u myši a pro TLR7 a TLR8 u lidí. Navazání Resiquimodu na TLR7 nebo TLR8 přímo aktivuje vrozenou imunitní odpověď prostřednictvím MyD88 závislé cesty a následnou produkci prozánětlivých cytokinů a chemokinů (TNF- α , INF- α , IL-12 a MIP-1 α) (Gibson a kol. 2002, Larangé a kol. 2009).

2.5.2 Fagocytární receptory a jejich agonisté použité v této práci

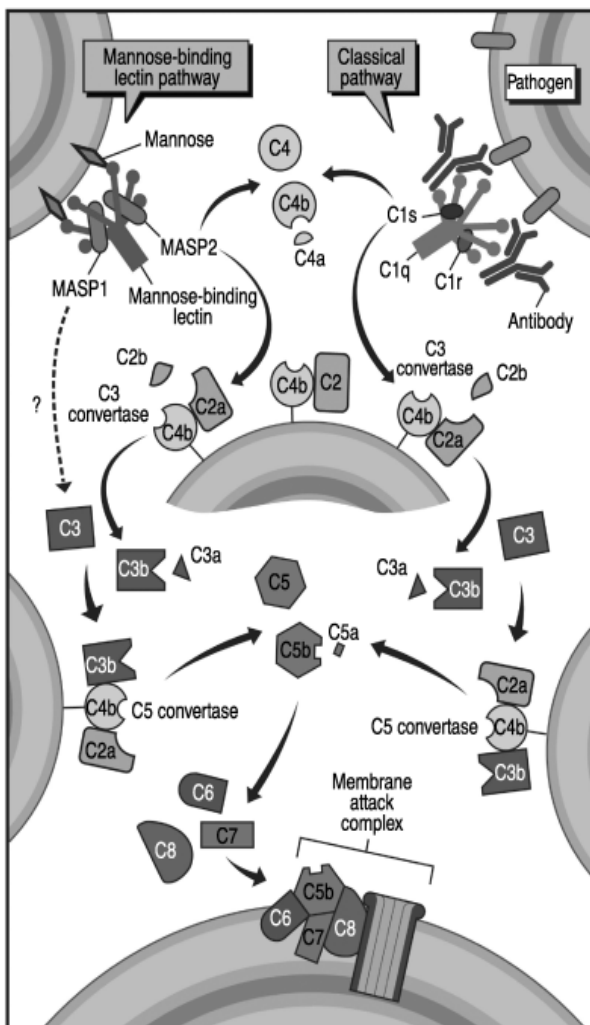
Manan patří mezi polysacharidy. Nachází se v buněčné stěně mikroorganismů, zejména na povrchu hub (kvasinek) a gram-negativních bakterií. Manan je složený z několika podjednotek D-manózu, které jsou spojené glykosidickou vazbou. Podle této vazby rozlišujeme α manan nebo β manan (Lipke a Ovalle 1998). Je považovaný za vysoce antigenní látku, proto se řadí mezi PAMPs. Je rozpoznáván imunitním systémem pomocí dvou receptorů. První je manózový receptor (MR) a druhý je manózu vázající lektin (MBL) (Janeway a Medzhitov 2002).

Manózový receptor (MR) je 180 kDa velký transmembránový protein (Stahl a Ezekowitz 1998). MR patří mezi fagocytární PRRs, které se nacházejí na fagocytárních buňkách (makrofágy, dendritické buňky) (Opanasopit 2001). Pro MR je charakteristická karbohydrátová doména pro rozpoznávání mikroorganismů, které na svém povrchu buněčné stěny obsahují D-manózu, N-acetylglukosamin nebo L-fukózu (Janeway a Medzhitov 2002). MR je zodpovědný za tvorbu prozánětlivých signálů, které vedou k produkci cytokinů (TNF- α , IL-6, IL-12) (Pathak a Palan 2005).

Manózu vázající lektin (MBL) je protein akutní fáze primárně produkovaný v játrech a vylučován do plasmy (Worthley a kol. 2005). Rozpoznává manan, N-acetylglukosamin nebo fukózu, které jsou obsaženy na patogenech (Opanasopit a kol. 2001). MBL patří do kolektinové rodiny proteinu. Proteiny z této rodiny obsahují dvě domény – lektinová a kolagenní. Lektinová část váže cukry na povrchu patogena,

zatímco kolagenní část je nezbytná pro interakci s vrozeným imunitním systémem (Matsushita a kol. 2000).

Afinita MBL k manóze je celkem poměrně nízká ($K_D = 10^{-3}$ M), což vyžaduje větší počet současných interakcí s manóзовými molekulami (Turner 2003). MBL je strukturně i funkčně podobný jako C1q, který spouští klasickou cestu aktivace komplementu. Srovnání lektinové a klasické dráhy aktivace komplementu je vidět na Obr. 1. Obě cesty vedou ke štěpení C4 a C2 na C4b a C2a. V konečném důsledku produkce C3 a C5 konvertáz stimuluje opsonizaci patogenů a lýzu daného patogena přes membránový útok komplexu. Rozdíl v obou drahách je, že v lektinové cestě komplementu je nejprve nutnost vytvoření komplexu MBL se serinovými protézami zvanými MASPs 1 a 2. (Worthley a kol. 2005).



Obr. 1: Srovnání lektinové a klasické cesty aktivace komplementu (Worthley a kol. 2005).

2.6 CD 47

CD47 je neobvyklý člen imunoglobulinové skupiny membránových proteinů. Skládá se z jednotné N-terminální IgV domény, vysoce hydrofobního úseku s pěti transmembránovými doménami a cytoplasmatického C-terminálního konce o velikosti 3-36 aminokyselin. Velikost CD47 je 45-55 kDa, což je dáno silnou glykosylací na Ig doméně (Brown a Frazier 2001). CD47 je zapojen v mnoha různých buněčných procesech např. apoptóza, proliferace, adheze nebo migrace (Sick a kol. 2012).

CD47 na sebe váže dva druhy ligandů. Prvním je trombospondin-1 (TSP-1) a druhým signální regulační protein alfa (SIRP- α) (Brown a Frazier 2001). Navázání TSP-1 na CD47 ovlivňuje několik základních buněčných funkcí včetně buněčné migrace a adheze, buněčné proliferace, apoptózy. Dále se tato vazba podílí na regulaci abiogeneze a zánětu. Vazba CD47-SIRP- α se zase podílí na inhibici fagocytózy, aktivaci T-lymfocytů a stimulaci vazby buňka-buňka (Sick a kol. 2012).

Jak CD47 tak i CD31 působí jako „don't eat me“ signál, který buňku brání před fagocyty. Tento signál se při apoptóze stahuje, aby nebránil fagocytům buňku pohltit (Grimsley a Ravichandran 2003). Právě „don't eat me“ signál využívají nádorové buňky, které exprimují CD47 ve větší míře, než je tomu u normálních buněk a tím unikají imunitnímu systému (Sick a kol. 2012). Tato práce se také zabývá blokováním CD47 a to z důvodu zvýšení účinnosti nádorové terapie. Zkoušeno bylo, nejen použití anti CD47 aptameru, ale i Anti-Mouse CD47 protilátky.

2.7 Fosfatidylserin

Fosfatidylserin (PS) nebo fosfatidyl-L-serin je záporně nabitý fosfolipid, který se normálně vyskytuje na vnitřní straně cytoplasmatické membrány, endoplasmatickém retikulu a edosomech. Tvoří zde až 20% z celkového množství fosfolipidů (např: Buckland a Wilton 2000, Vermes a kol. 1995).

PS se skládá z glycerolové kostry, která je esterifikovaná na dvou uhlících (*sn-1* a *sn-2*) dvěma mastnými kyselinami různé délky a nasycení. Za negativní náboj PS může vazba fosfátové skupiny na serin. Fosfátová skupina se nachází na *sn-3* uhlíku (Kay a Grinstein 2011).

PS se normálně vyskytuje u buněk na vnitřní straně plasmatické membrány jako následek působení ATP-dependentní aminofosfolipidové flipázy (Kay a Grinstein

2011). Na vnější straně plasmatické membrány se PS vyskytuje jen ve velmi malém množství (Ravichandran 2011). Pokud buňka podstoupí apoptózu, objeví se PS na vnější straně plasmatické membrány. Tato exprese PS na vnější stranu membrány signalizuje fagocytům, aby umírající buňku fagocytovali (tzv. „eat me“ signál) (Kay a Grinstein 2011). Kromě své role v apoptóze má PS své důležité místo také při srážení krve (Buckland a Wilton 2000).

Expresí PS tedy slouží jako „eat me“ signál. Tento signál na apoptotických buňkách rozpoznávají fagocyty, které nejdříve buňku identifikují a poté jí fagocytují. Nádorové buňky jsou v tomto pravidle výjimkou. Exprimují PS také na svém povrchu a přesto unikají imunitním mechanismům. Je to dáno expresí právě „don't eat me“ signálů (Brown a Neher 2012). Jako další cíl této práce bylo využití fosfatidylserinu jako „eat me“ signálu pro fagocyty. Kromě toho byla studována i exprese PS na nádorových buňkách při působení stresových faktorů a vlivu neutrofilů na tuto expresi.

3 CÍLE PRÁCE

- Studium možnosti náhrady LPS pomocí kovalentně vázané bakterie *Borrelia burgdorferi* nebo pomocí TLR agonisty Resiquimodu (R-848) v rámci nádorové imunoterapie.
- Ověření možnosti nádorové imunoterapie pomocí blokace CD47 anti CD47 aptamerem nebo Anti-Mouse CD47 protilátkou.
- Studium otázky exprese fosfatidylserinu (PS) na povrchu nádorových buněk B16-F10 z buněčné kultury při působení stresových faktorů nebo při současné inkubaci těchto buněk s neutrofilly.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Chemikálie

- **Anti CD47 aptamer (H-KRFYVVMWKK-OH)** (Schafer-N, Dánsko)
- **Anti-Mouse CD47 Purified; clone miap 301** (eBioscience, USA)
- **BAM₄₀₀₀** – biokompatibilní kotva membrány, Mw 4000 (NOF Corporation, Japonsko)
- **DNáza I** (Roche Diagnostic, Německo)
- **Dual Apoptosis Assay with Nucview 488 Caspase-3 Substrate and CF640R Annexin V** (Biotium, USA)
- **Liberáza DL** (Roche Diagnostic, Německo)
- **Mannan** – z *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich, USA)
- **Neutrophil isolation kit** (Miltenyi Biotec, Německo)
- **Resiquimod (R-848)** (Tocris, Velká Británie)
- **SMCC** - 4-(*N*-Maleimidomethyl) cyclo-hexanecarboxylic-acid N-hydroxysuccinimide ester (ThermoScientific, USA)
- **TCEP** - tris(2-Carboxyethyl)phosphine hydrochlorid (Sigma-Aldrich, USA)

4.2 Laboratorní zvířata

V pokusech byly použity samice myši typu C57BL/6N z chovu Charles River Laboratories. Do laboratoře přišly jako 4 týdenní a byly použity k pokusům po dosažení 8 týdnů s váhou mezi 18-20g. Myši byly chovány za stejných podmínek ve zvěřinci Parazitologického ústavu, BC AVČR. Myši byly po celou dobu rozděleny jednotlivě ve sterilních boxech s neustálým přístupem ke sterilní pitné vodě a krmivu ve formě suchých pelet. V místnosti s chovem byla konstantní teplota 22 °C, relativní vlhkost 65 % a fotoperioda byla nastavena na 12/12 hodin.

4.3 Příprava nádorových buněk B16-F10 pro transplantaci

Buněčná linie B16-F10 byla kultivována v médiu RPMI 1640 s 10% fetálního bovinního séra (FCS), 1% antibiotik, 1% glutaminu a 0,1% merkptoetanolu při 37 °C v termostatu v 5% CO₂ atmosféře. Po nárůstu byly buňky zbaveny kultivačního média a poté třikrát promyty sterilním pufovaným fyziologickým roztokem (PBS). Po promytí byla k adherovaným buňkám přidána trypsinizační směs (0,02% trypsin a 0,02% EDTA v PBS). Poté byly buňky s trypsinizační směsí vráceny zpět

do termostatu (37 °C/5% CO₂) na pět minut, aby došlo k jejich uvolnění. Trypsinizace byla zastavena přidáním RPMI 1640 s 10% FCS. Posléze byly buňky centrifugovány (5 min/4 °C/160 g) a naředěny na požadovaný objem přidáním RPMI 1640 bez séra. Následně byla počítána koncentrace buněk v 1 ml pomocí Bürkerovy komůrky. Po zjištění aktuální koncentrace byla buněčná suspenze naředěna na koncentraci 4x10⁶ buněk/ml RPMI 1640 bez séra.

4.4 Transplantace buněk B16-F10

Nádorové buňky B16-F10 byly podkožně transplantovány myším do pravého předem oholeného boku. Aplikováno bylo 0,1 ml melanomové suspenze (B16-F10 s RPMI 1640 bez séra) obsahující 400 000 buněk.

4.5 Příprava neutrofilů

Izolace neutrofilů z kostní dřeně myši

Myším, které byly usmrceny stržením vazů, byly odebrány obě zadní končetiny. Následovalo očištění kostí od svaloviny a šlach takovým způsobem, aby nedošlo k porušení hlavic kloubů a následné kontaminaci kostní dřeně. Očištěné kosti byly vloženy do Petriho misky s RPMI 1640 bez séra. Posléze byly sterilně odstříhány obě kloubní hlavice kostí. Kostí se propláchly pomocí RPMI 1640 bez séra a injekční stříkačky (5 ml) s jehlou (26 G). V dalším kroku byla kostní dřeň rozsuspendována pomocí pipety a přefiltrována přes BD filtr (velikost pórů 70 μm). Následně byla přefiltrovaná suspenze centrifugována (10 min/4 °C/160 g). Poté byly buňky spočítány pomocí Bürkerovy komůrky.

Magnetické značení a magnetická separace neutrofilů

K buňkám byl přidán pufr (200 μl na 5x10⁷ buněk), připravený smícháním PBS, 2% FCS a 2 mM EDTA. Poté byla k buňkám přidána primární protilátka (protilátka proti antigenům neexprimovaným na neutrofilech konjugovaná s biotinem) v množství 50 μl na 5x10⁷ buněk. Následovalo promíchání buněk a inkubace s primární protilátkou 10 minut v lednici. V dalším kroku byly buňky promyty v pufru (5-10 ml na 5x10⁷ buněk) pomocí centrifugace (10 min/4 °C/160 g). Po centrifugaci bylo nutné supernatant kompletně odsát a vzniklý pelet byl rozsuspendovat v pufru (400 μl na 5x10⁷ buněk). Následovalo přidání sekundární protilátky (Anti-Biotin protilátka konjugovaná s ferromagnetickými partikulami) v množství 100 μl na 5x10⁷ buněk.

Buňky byly opět důkladně promíchány a inkubovány 15 minut v lednici. Posléze byly promyty v pufru pomocí centrifugace (10 min/4 °C/160 g) a vzniklý pelet rozsuspendován v pufru (500 µl na 5×10^7 buněk).

Následovala samotná magnetická separace neutrofilů (negativní sorbce kontaminantů) pomocí separační kolony (LS column) a podstavce s magnetickým separátorem (Midi MACS separátor). Kolonka byla umístěna do separátoru a promyta 3 ml pufru. Do kolony byla napipetována buněčná suspenze. Na závěr bylo nezbytné kolonku promýt 3x3 ml pufru. Získané neutrofilové buňky byly centrifugovány (10 min/4 °C/160 g), převedeny do RPMI 1640 s 10% FCS a spočítány.

Priming neutrofilů

Neutrofilové buňky byly primovány směsí cytokinů TNF α (2,5 ng/ml) a GM-CSF (12 ng/ml). Priming probíhal po dobu 20 minut v termostatu (37 °C/5% CO₂).

4.6 Měření velikosti nádoru

Velikost nádoru byla měřena každý druhý den pomocí kaliperu. Poté byl spočítán objem nádorové masy pomocí vzorce $V = \pi/6 AB^2$. Největší rozměr (délka nádoru) představuje A a nejmenší rozměr (výška nádoru od těla) představuje B.

4.7 Počítání plicních metastáz

Myši byly usmrceny stržením vazů a poté jim byly vyjmuty plíce. Vypitvané plíce byly vloženy do PBS. Pomocí binokulární lupy byly spočteny metastázy na všech plicních lalocích (černé tečky rozdílné velikosti).

4.8 Příprava terapeutických látek

Syntéza manan-BAM₄₀₀₀

Roztok mananu v prostředí octanu amonného a kyanoborohydridu sodného byl při pH 7,5 a 50 °C redukčně aminován po dobu pěti dnů. Poté byl roztok dialyzován s použitím dialyzační trubice MWCO 3500 (Serva-Heidelberg, Německo) proti PBS při 4 °C přes noc. Následně bylo zapotřebí zkontrolovat pH mananu-NH₂ (požadovaná hodnota pH musela být v rozmezí 7,2 – 8,5). Poté byl připraven roztok BAM₄₀₀₀ v DMSO (7,3 mM). 600 µl BAM₄₀₀₀ bylo přidáno ke 12 ml mananu-NH₂ (0,227 mM) a promícháno. Směs byla ponechána 2 hodiny při pokojové teplotě a poté byla reakce zastavena přidáním 600 µl TRIS/HCl (pH 8,0). Následovala dialýza v dialyzační trubici MWCO 3500 proti PBS při 4 °C přes noc za stálého míchání. Po dialyzaci byl získán

0,2 mM roztok manan-BAM₄₀₀₀ v PBS. Tento roztok a další použité roztoky byly sterilizovány filtrací přes filtry s průměrem pórů 0,22 µm.

Příprava roztoků Resiquimodu (Resiquimod HCl)

Jelikož Resiquimod ve formě báze je ve vodě obtížně rozpustitelný, byl nejdříve připraven hydrochlorid. 1,5 mg Resiquimodu bylo smícháno se 4,2 µl 3,5% HCl. Příslušné roztoky byly poté připraveny přidáním buď samotného PBS, nebo přidáním PBS obsahujícího další látky (anti CD47 aptamer, mannan-BAM, Anti-Mouse CD47).

Příprava *Borrelia burgdorferi*-SMCC pro injikování do nádoru

Borrelia burgdorferi sensu stricto byla nejdříve sonikována v PBS. Bylo odebráno 0,5 ml sonikovaných bakterií, ke kterým bylo přidáno 2,29 ml PBS (pH 7,4). Dále byl 1 mg SMCC rozpuštěn ve 100 µl DMSO. Odebráno bylo 10 µl, které se přidaly k roztoku sonikovaných bakterií a PBS. Reakce SMCC s bakteriemi probíhala při pokojové teplotě po dobu 40 min.

4.9 Analýza dat

Výsledná data byla zpracována v programu STATISTICA 12. Statistická významnost byla zjišťována pomocí ANOVY doplněná post-hoc Tukey testem.

4.10 Experimenty

4.10.1 Terapie melanomu pomocí kovalentně vázané bakterie

Borrelia burgdorferi

V tomto pokusu bylo použito 15 myší (samice C57BL/6N). Dvanáctý den po transplantaci melanomových buněk B16-F10 byly myši rozděleny do tří skupin (A-K viz níže) po pěti myších podle podávané terapeutické látky. Každá myš byla umístěna do samostatného boxu.

Skupiny myší podle podávané terapeutické látky:

A) *Borrelia burgdorferi* (0,5 mg/ml PBS)

B) *Borrelia burgdorferi*-SMCC (0,5 mg/ml PBS)

K) PBS (kontrola)

Léčiva byla intratumorálně aplikována u všech skupin celkem šestkrát v množství 50 μ l. Skupinám A a K bylo podáno PBS jednu hodinu před samotným podáním terapeutické látky. Skupině B pak bylo podáno TCEP (50 mM roztok TCEP v PBS) také hodinu před podáním terapeutické látky. Terapie byla zahájena v čase 0, tzn. 12. den od transplantace nádorových buněk B16-F10. Léčiva byla podávána ve dvou pulzech (dny 0,1,2...8,9,10). Každý druhý den byla měřena velikost nádorů pomocí kaliperu (vždy před aplikací léčiva). Čtrnáctý den po změření velikosti nádorů byly myši usmrceny stržením vazů a byly vyjmuty plíce ke spočítání metastáz.

4.10.2 Terapie melanomu pomocí anti CD47 aptameru a Anti-Mouse CD47 protilátky.

V tomto pokusu bylo použito 42 myši (samice C57BL/6N). Dvanáctý den po transplantaci melanomových buněk B16-F10 byly myši rozděleny do sedmi skupin (A-K viz níže) po šesti myších podle podávané terapeutické látky. Každá myš byla umístěna do samostatného boxu.

Skupiny myši podle podávané terapeutické látky:

A) anti CD47 aptamer (H-KRFYVVMWKK-OH) (0,5 mM roztok v PBS)

B) Resiquimod HCl (0,5 g/ml PBS)

C) Resiquimod HCl / anti CD47 aptamer (0,5 mg Resiquimodu/ml 0,5 mM anti CD47 aptameru v PBS)

D) Resiquimod HCl / anti CD47 aptamer / manan-BAM (0,5 mg Resiquimodu/ml 0,5 mM anti CD47 aptameru v 0,2 mM mananu v PBS)

E) Resiquimod HCl / manan-BAM (0,5 mg Resiquimodu/ml 0,2 mM mananu v PBS)

F) Resiquimod HCl / manan-BAM / Anti-Mouse CD47 (0,5 mg Resiquimodu/ml a 0,5 mg Anti-Mouse CD47/ml 0,2 mM mananu v PBS)

K) PBS (kontrola)

Skupina A, B, C, D, E, K

Léčiva byla intratumorálně aplikována u skupin A, B, C, D, E a K celkem šestkrát v množství 50 μ l. Terapie byla zahájena v čase 0, tzn. 12. den od transplantace nádorových buněk B16-F10. Léčiva byla podávána ve dvou pulzech (dny 0,1,2...8,9,10). Každý druhý den byla měřena velikost nádorů pomocí kaliperu (vždy

před aplikací léčiva). Čtrnáctý den po změření velikosti nádorů byly myši usmrceny stržením vazů a byly vyjmuty plíce ke spočítání metastáz.

Skupina F

Myším byla nejprve aplikována terapeutická směs Resiquimod HCl / manan-BAM. Po hodině byla aplikována protilátka Anti-Mouse CD47. Vše bylo aplikováno intratumorálně v množství 50 μ l. Terapie byla zahájena v čase 0, tzn. 12. den od transplantace nádorových buněk B16-F10. Směs Resiquimod HCl / manan-BAM byla podávána ve dvou pulzech (dny 0,1,2...8,9,10). Protilátka Anti-Mouse CD47 byla podána pouze v prvním pulzu. Každý druhý den byla měřena velikost nádorů pomocí kaliperu (vždy před aplikací léčiva). Čtrnáctý den po změření velikosti nádorů byly myši usmrceny stržením vazů a byly vyjmuty plíce ke spočítání metastáz.

4.10.3 Studium otázky exprese fosfatidylserinu na povrchu nádorových buněk pomocí průtokové cytometrie

4.10.3.1 Míra exprese fosfatidylserinu na buňkách B16-F10 z buněčné kultury v závislosti na stresovém faktoru

V následujícím *in vitro* pokusu byla zjišťována míra exprese fosfatidylserinu (PS) na povrchu nádorových buněk B16-F10 z buněčné kultury, při působení stresových faktorů (mechanické třepání buněk a přítomnost chemikálií DNáza I, Liberáza DL).

Příprava buněk pro *in vitro* pokus

Suspenze melanomových buněk B16-F10 v RPMI 1640 s 10% FCS byla rozpipetována po 1 ml do 2 ml mikrozkušavek eppendorf podle následujícího rozdělení skupin:

- A) třepané buňky B16-F10 s DNázou I a Liberázou DL
- B) třepané buňky B16-F10
- C) netřepané buňky B16-F10 s DNázou I a Liberázou DL
- D) netřepané buňky B16-F10
- K) netřepané buňky B16-F10 (kontrola)

Ke skupinám A a C byla přidána DNáza I na výslednou koncentraci 0,2 mg/ml a Liberáza DL na výslednou koncentraci 0,33 mg/ml. Skupiny A a B se poté nechaly třepat (400 kmitů/min) v termostatu (37 °C) po dobu jedné hodiny. Ostatní skupiny byly také umístěny do termostatu (37 °C) po dobu jedné hodiny, ale bez třepání. Po hodině byly buňky spočítány pomocí Bürkerovy komůrky a v množství 1×10^6 buněk přeneseny do centrifugačních zkumavek. Posléze byly buňky centrifugovány (5 min/4 °C/160 g). Vzniklé pelety byly rozsuspendovány v 1 ml Binding Bufferu (Annexin V Binding Buffer naředěný destilovanou vodou v poměru 1:5).

Analýza na průtokovém cytometru

Ze všech připravených buněčných suspenzí bylo následně odpipetováno 200 µl do zkumavek určených pro průtokovou cytometrii (vše bylo děláno v tripletech + jedna kontrola). Do všech zkumavek (kromě neznačené kontroly) bylo přidáno 5 µl NucView 488 Caspase-3 a 5 µl CF640R Annexin V. Poté byly buňky inkubovány ve tmě při pokojové teplotě po dobu 30 min. Po inkubaci bylo do každé zkumavky přidáno 400 µl Binding Bufferu a následovalo měření pomocí průtokového cytometru.

Po správném nastavení průtokového cytometru (viz Tab. II) byly zkumavky vloženy do přístroje a jednotlivé vzorky změřeny. Bylo zaznamenáno 20 000 událostí. Výsledky byly zpracovány a vyhodnoceny v programu BD FACSDiva verze 6.1.3.

Tab. II: Nastavení průtokového cytometru.

Nastavení laserů	
Window Extension	2,00
FSC Area Scaling	0,50
Laser Delay Blue	0,00
Laser Delay Red	30,69
Area Scaling Blue	0,50
Area Scaling Red	1,32

4.10.3.2 Vliv neutrofilů na míru exprese fosfatidylserinu na buňkách B16-F10 z buněčné kultury

V tomto *in vitro* pokusu byla zjišťována míra exprese fosfatidylserinu (PS) na povrchu nádorových buněk B16-F10 z buněčné kultury při současné inkubaci těchto buněk s aktivovanými a neaktivovanými neutrofily z kostní dřeně myši.

Příprava buněk pro *in vitro* pokus

Nádorové buňky byly sklizeny stejným postupem jako v předchozím pokusu. Poté byly rozpipetovány v množství 2×10^5 buněk na jamku (96 U jamkový panel). Buňky byly rozděleny do následujících skupin:

- A) buňky B16-F10
- B) buňky B16-F10 a aktivované neutrofily
- C) buňky B16-F10 a neaktivované neutrofily
- K) buňky B16-F10 (kontrola)

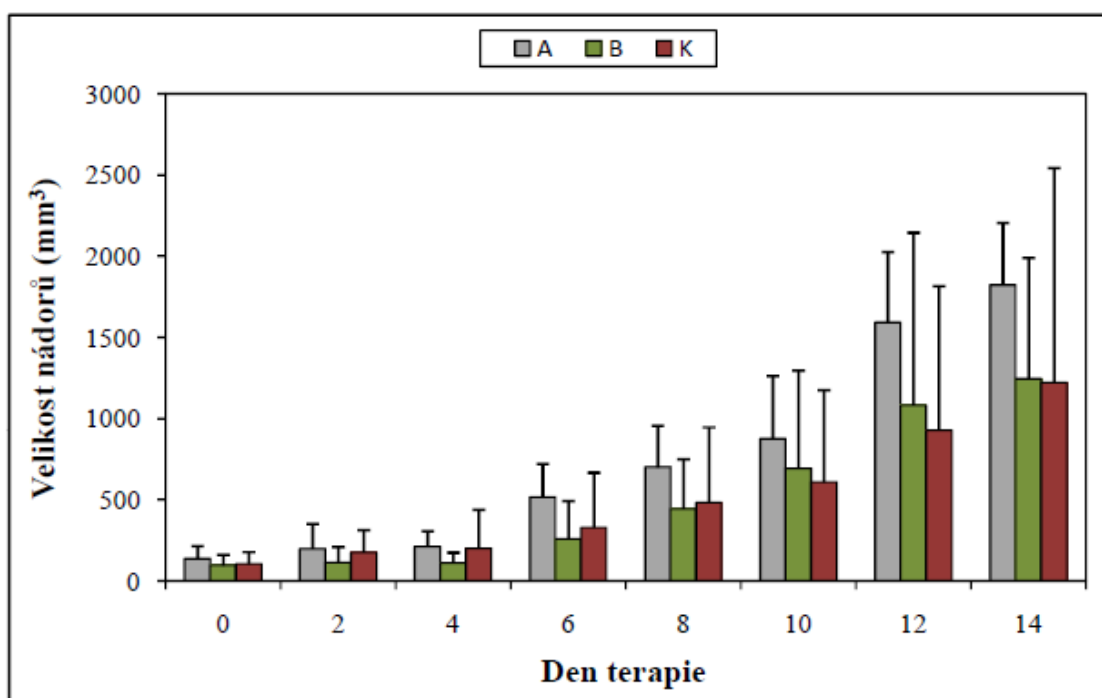
Následně k nim byly přidány aktivované nebo neaktivované neutrofily (skupina B a C) v množství 4×10^5 buněk získané procesem magnetické separace a aktivované již zmíněným způsobem (viz kapitola 4.5 Příprava neutrofilů). Buňky byly promíchány a inkubovány v termostatu ($37\text{ °C}/5\% \text{ CO}_2$) po dobu dvou hodin.

Po inkubaci byly buňky centrifugovány ($10\text{min}/4\text{ °C}/160\text{g}$) a následně zbaveny supernatantu, který byl nahrazen Binding Bufferem ($200\ \mu\text{l}$ na jamku) - příprava viz předchozí pokus. Po důkladném rozvolnění pipetou byly buňky převedeny do zkumavek určených pro průtokovou cytometrii v množství $70\ \mu\text{l}$. Do každé zkumavky bylo přidáno $130\ \mu\text{l}$ Binding Bufferu (na celkový objem $200\ \mu\text{l}/\text{jamka}$). Ke všem skupinám (kromě neznačené kontroly) bylo přidáno $5\ \mu\text{l}$ CF640R Annexin V. Dále bylo přidáno $5\ \mu\text{l}$ NucView 488 Caspase-3. Posléze byly buňky inkubovány ve tmě při pokojové teplotě po dobu 30 min. Po kultivaci bylo do každé zkumavky přidáno $400\ \mu\text{l}$ Binding Bufferu a následovalo měření pomocí průtokového cytometru. Bylo zaznamenáno 50 000 událostí. Nastavení průtokového cytometru (viz Tab. II) a program, ve kterém byly výsledky zpracovány a vyhodnoceny, byly stejné jako v předchozím pokusu (viz kapitola 4.10.3.1).

5 VÝSLEDKY

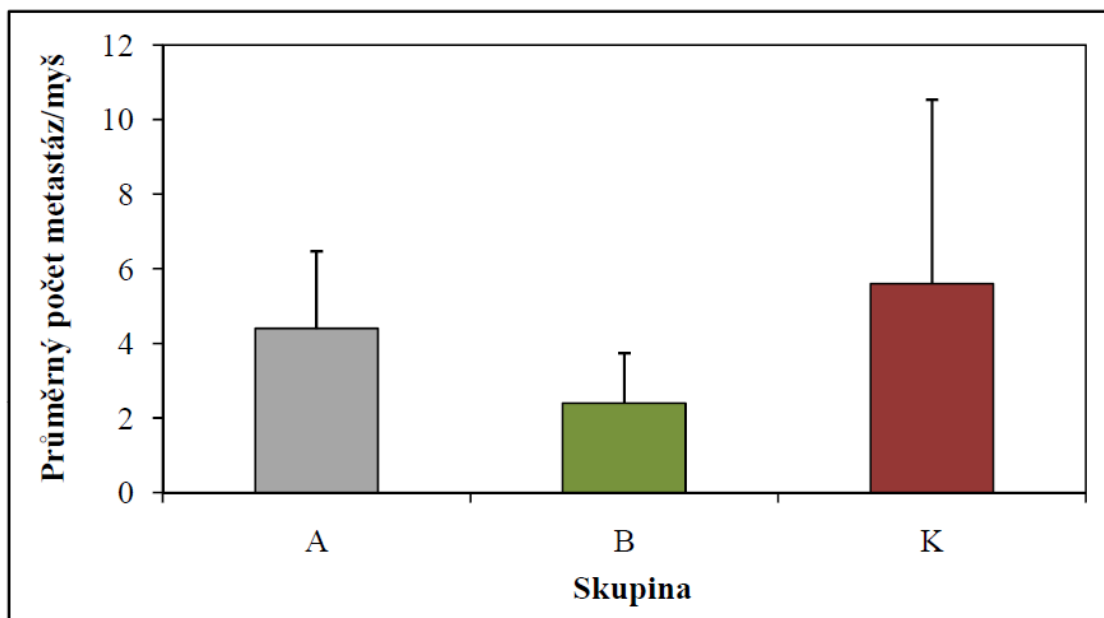
5.1 Terapie melanomu pomocí kovalentně vázané bakterie *Borrelia burgdorferi*

Na Obr. 2 je znázorněn vliv léčby na redukci růstu melanomu. V tomto pokusu byla použita k léčbě melanomu kovalentně vázané bakterie *Borrelia burgdorferi* (skupina B, zelená barva). Dále bylo zkoušeno použití bakterií bez kotvení (skupina A, šedá barva). Je ovšem patrné, že *Borrelia burgdorferi* s kovalentním kotvením i bez kotvení, neměla žádný vliv na redukci nádoru.



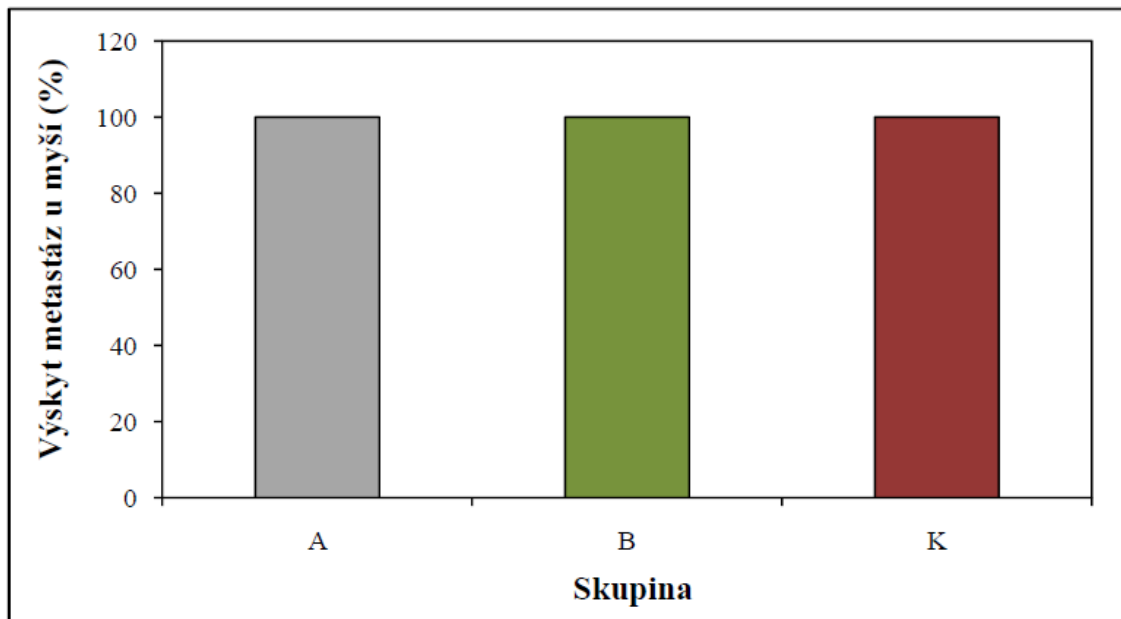
Obr. 2: Vliv léčby na redukci nádoru. **A)** *Borrelia burgdorferi* (0,5 mg/ml PBS), **B)** *Borrelia burgdorferi*-SMCC (0,5 mg/ml PBS), **K)** PBS.

Na Obr. 3 je uvedena intenzita metastazování, vyjádřena jako průměrný počet metastáz/myš u jednotlivých skupin. Metastázy byly nejvíce potlačeny u skupiny myší, které byly léčeny pomocí kovalentně vázaných bakterií *Borrelia burgdorferi*-SMCC (skupina B, zelená barva).



Obr. 3: Průměrný počet metastáz/myš u jednotlivých skupin. **A)** *Borrelia burgdorferi* (0,5 mg/ml PBS), **B)** *Borrelia burgdorferi*-SMCC (0,5 mg/ml PBS), **K)** PBS.

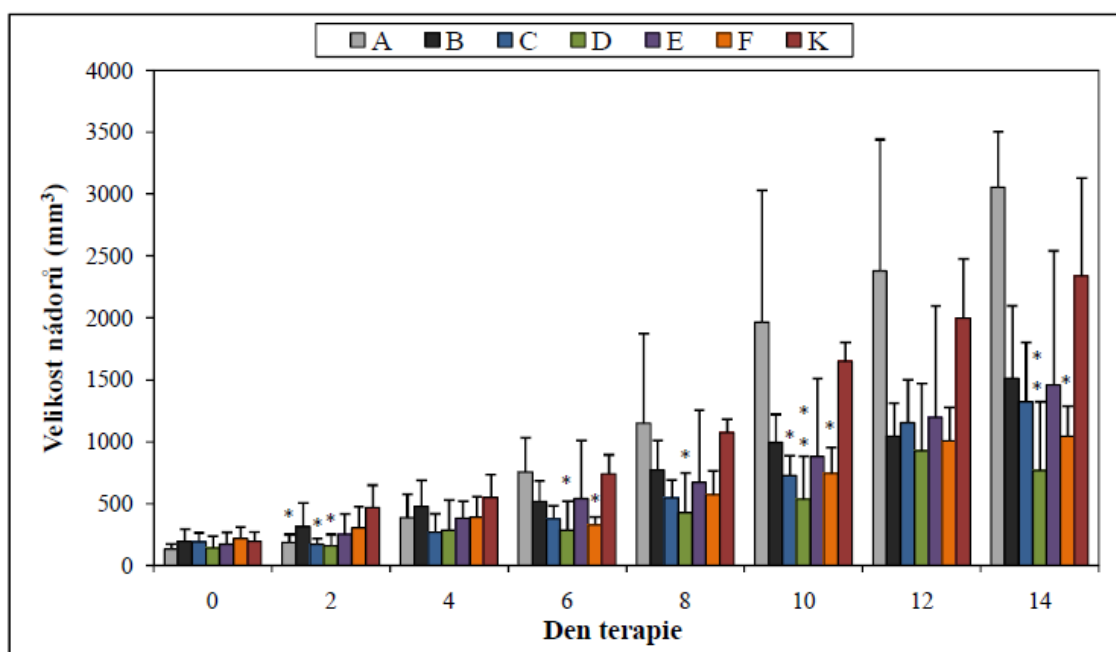
Na Obr. 4 je uvedena prevalence metastáz u myší v jednotlivých skupinách. Z obrázku vyplývá, že se u všech myší metastázy vyskytovaly.



Obr. 4: Prevalence metastáz u myší v jednotlivých skupinách. **A)** *Borrelia burgdorferi* (0,5 mg/ml PBS), **B)** *Borrelia burgdorferi*-SMCC (0,5 mg/ml PBS), **K)** PBS.

5.2 Terapie melanomu pomocí anti CD47 aptameru a Anti-Mouse CD47 protilátky

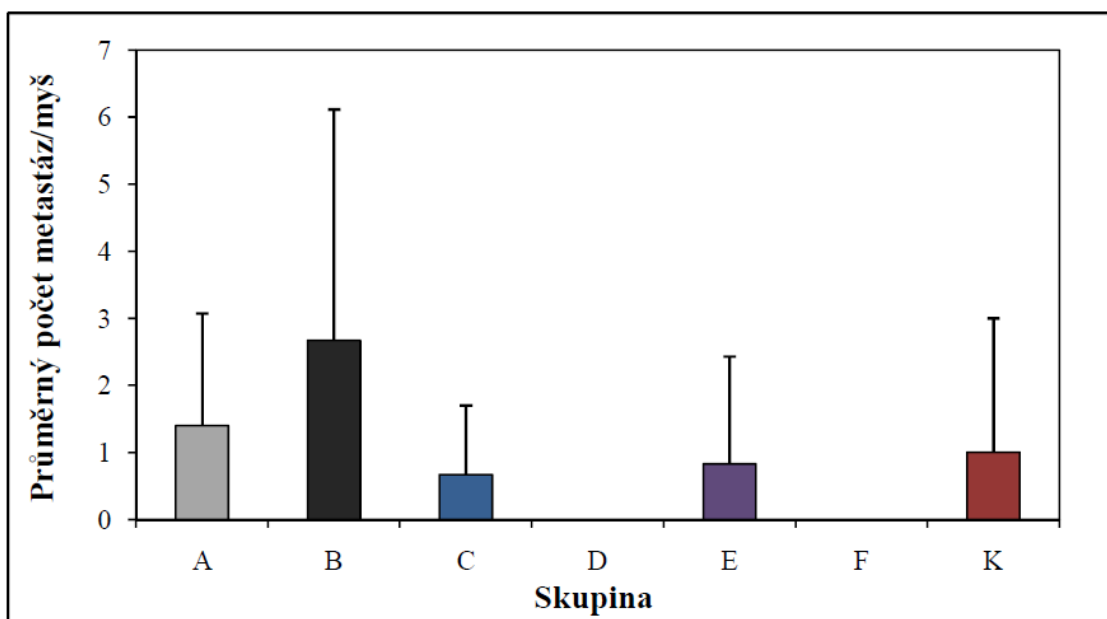
Graf na Obr. 5 ukazuje výsledky terapie melanomu pomocí anti CD47 aptameru a Anti-Mouse protilátky. Z grafu je patrné, že blokace samotným anti CD47 aptamerem byla bez účinku (skupina A, šedá barva). Přítomnost anti CD 47 aptameru však zvýšila účinek Resiquimodu HCl a mananu-BAM, kde bylo dosaženo nejlepších výsledků (skupina D, zelená barva). Dále je patrné, že použití Anti-Mouse CD47 protilátky spolu s Resiquimodem HCl a mananem-BAM (skupina F, oranžová barva) zlepšuje terapii, ale méně než anti CD47 aptamer opět s Resiquimodem a mananem-BAM (skupina D, zelená barva). Z grafu tedy vyplývá, že terapeutické výsledky jsou dány především použitím Resiquimodu HCl a jeho kombinací s manan-BAM. Anti CD47 aptamer a Anti-Mouse CD47 protilátka vede jen k určitému ne příliš výraznému zesílení terapie.



Obr. 5: Vliv léčby na redukci nádoru. **A)** 0,5 mM anti CD47 aptamer v PBS, **B)** Resiquimod HCl, **C)** Resiquimod HCl / anti CD47 aptamer, **D)** Resiquimod HCl / anti CD47 aptamer / manan-BAM, **E)** Resiquimod HCl / manan-BAM, **F)** Resiquimod HCl / manan-BAM / Anti-Mouse CD47, **K)** PBS (kontrola).

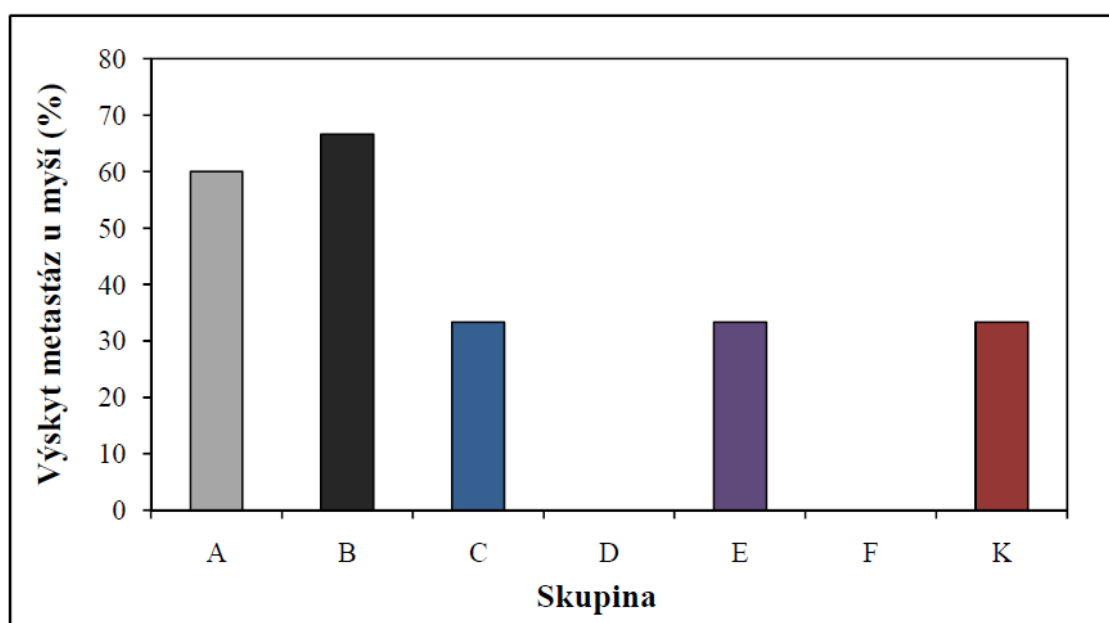
* $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$ vztaženo ke kontrole (skupina K).

Na Obr. 6 je uvedena intenzita metastazování. Vyjádřena je jako průměrný počet metastáz na myš u jednotlivých skupin. Metastázy nebyly nalezeny u skupiny léčené pomocí Resiquimodu, anti CD47 aptameru a mananu (skupina D). Dále byly metastázy potlačeny u skupiny F, které se podávala kombinace Resiquimodu, mananu a Anti-Mouse CD47 protilátky. Nejvíce se metastázy vyskytovaly u skupiny B (černá barva), které byl podáván samotný Resiquimod.



Obr. 6: Průměrný počet metastáz/myš u jednotlivých skupin. **A)** 0,5 mM anti CD47 aptamer v PBS, **B)** Resiquimod HCl, **C)** Resiquimod HCl / anti CD47 aptamer, **D)** Resiquimod HCl / anti CD47 aptamer / manan-BAM, **E)** Resiquimod HCl / manan-BAM, **F)** Resiquimod HCl / manan-BAM / Anti-Mouse CD47, **K)** PBS (kontrola).

Na následujícím grafu (Obr. 7) je uvedena prevalence metastáz u myši v jednotlivých skupinách. Z obrázku je patrné, že nejvyšších hodnot prevalence (více jak 60%) bylo dosaženo se samotným anti CD47 aptamerem (skupina A, šedá barva) a Resiquimodem (skupina B, černá barva). U skupiny D a F se metastázy nevyskytovaly vůbec. Použití Resiquimodu HCl v kombinaci s anti CD47 aptamerem (skupina C, modrá barva) vykazovalo lepších výsledků nežli použití těchto látek jednotlivě. Podobně je tomu také u skupiny, kde byla použita kombinace Resiquimodu HCl s manan-BAM (skupina E, fialová barva).



Obr. 7: Prevalence metastáz u myši v jednotlivých skupinách. **A)** 0,5 mM anti CD47 aptamer v PBS, **B)** Resiquimod HCl, **C)** Resiquimod HCl / anti CD47 aptamer, **D)** Resiquimod HCl / anti CD47 aptamer / manan-BAM, **E)** Resiquimod HCl / manan-BAM, **F)** Resiquimod HCl / manan-BAM / Anti-Mouse CD47, **K)** PBS (kontrola).

5.3 Studium otázky exprese fosfatidylserinu na povrchu nádorových buněk pomocí průtokové cytometrie

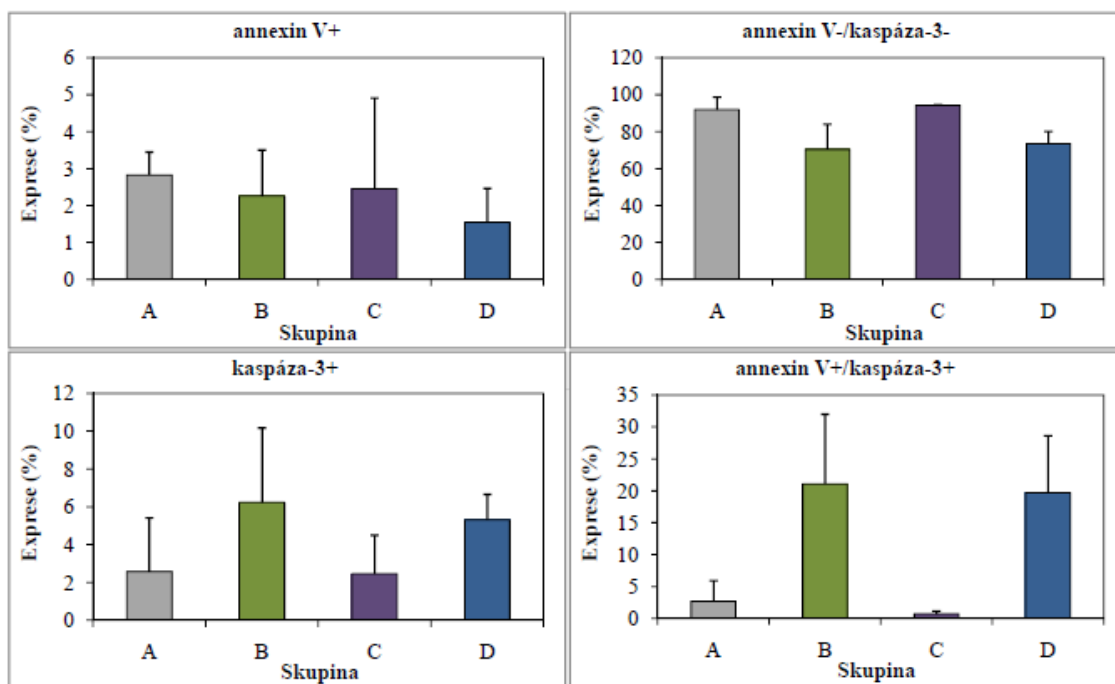
5.3.1 Míra exprese fosfatidylserinu na buňkách B16-F10 z buněčné kultury v závislosti na stresovém faktoru

Výstupem z průtokového cytometru byla dvoubarevná FACS analýza. Použitý kit (Dual Apoptosis Assay with Nucview 488 Caspase-3 Substrate and CF640R Annexin V) umožnil rozdělení buněk na 4 populace dle exprese fosfatidylserinu a kaspázy-3: (1) populace buněk annexin V+/kaspáza-3+, (2) populace buněk annexin V+/kaspáza-3-, (3) populace buněk annexin V-/kaspáza-3+, (4) annexin V-/kaspáza-3-. Naměřené hodnoty buněk i procentuální zastoupení (průměr ze dvou opakovaných pokusů) jsou uvedeny v Tab. III. a zpracovány do grafu v Obr. 8.

Tab. III: Studium otázky exprese fosfatidylserinu na povrchu nádorových buněk v závislosti na stresovém faktoru - absolutní počty a procentuální vyjádření (množství exprimovaných buněk převedeno na společný základ 15 000 singletů). **A)** třepané buňky B16-F10 s DNázou I a Liberázou DL, **B)** třepané buňky B16-F10, **C)** netřepané buňky B16-F10 s DNázou I a Liberázou DL, **D)** netřepané buňky B16-F10.

skupina	A		B		C		D	
	počet buněk	%	počet buněk	%	počet buněk	%	počet buněk	%
annexin V+	424	2,83	339	2,26	368	2,45	232	1,55
kaspáza-3+	385	2,57	935	6,23	369	2,46	798	5,32
annexin V- /kaspáza-3-	13785	91,9	10562	70,41	14155	94,37	11018	73,45
annexin V+ /kaspáza-3+	406	2,7	3164	21,09	108	0,72	2952	19,68

Na Obr. 8 jsou zobrazeny grafy vyjadřující míru exprese fosfatidylserinu (PS) (annexin V+) a kaspázy-3 na buňkách B16-F10 z buněčné kultury, při působení stresových faktorů (mechanické třepání buněk a přítomnost chemikálií DNáza I, Liberáza DL). Z grafu vyplývá, že vliv stresu na buňky B16-F10 je z hlediska exprese PS zanedbatelný. U skupin bez přidání chemikálií (B a D) je zvýšena současná exprese fosfatidylserinu a kaspázy-3 oproti buňkám, ke kterým chemikálie byly přidány.



Obr. 8: Studium otázky exprese fosfatidylserinu na povrchu nádorových buněk v závislosti na stresovém faktoru. **A)** třepané buňky B16-F10 s DNázou I a Liberázou DL, **B)** třepané buňky B16-F10, **C)** netřepané buňky B16-F10 s DNázou I a Liberázou DL, **D)** netřepané buňky B16-F10.

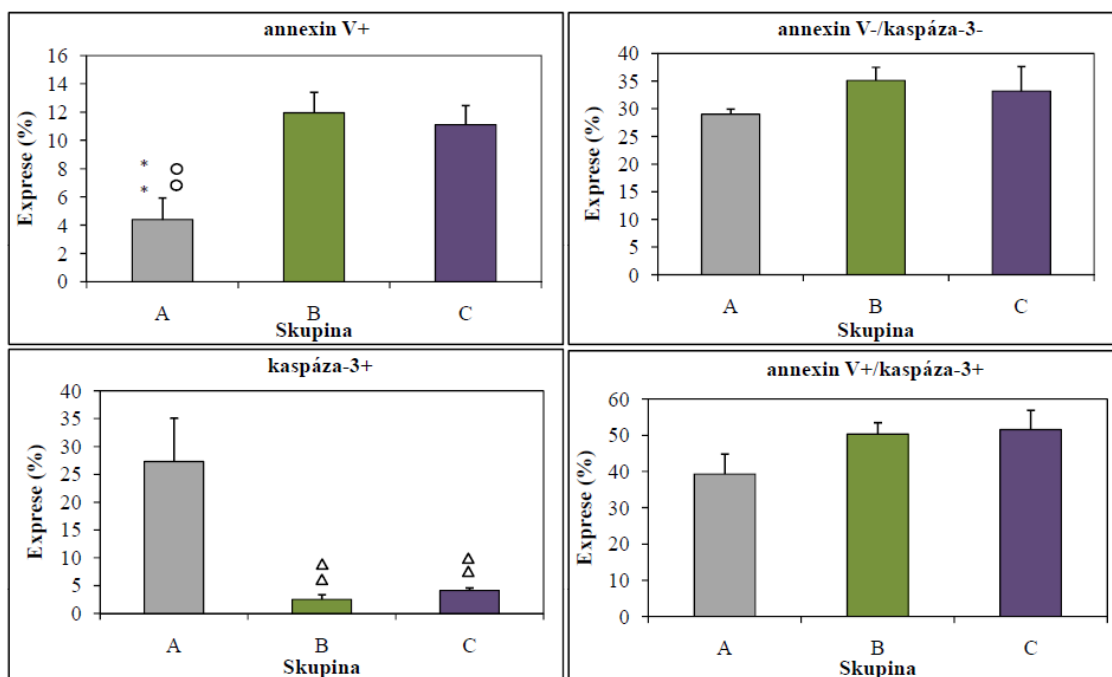
5.3.2 Vliv neutrofilů na míru exprese fosfatidylserinu na buňkách B16-F10 z buněčné kultury

Jako v předchozím pokusu nám použitý kit umožnil rozdělení buněk na 4 populace dle exprese fosfatidylserinu a kaspázy-3 (viz kapitola 5.3.1). Naměřené hodnoty buněk a jejich procentuální zastoupení jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. IV).

Tab. IV: Studium otázky exprese fosfatidylserinu na povrchu nádorových buněk při současné inkubaci těchto buněk s aktivovanými a neaktivovanými neutrofily – průměrný počet ze 3 jamek a procentuální vyjádření (množství exprimovaných buněk převedeno na společný základ 15 000 singletů). **A)** buňky B16-F10 **B)** buňky B16-F10 a aktivované neutrofily **C)** buňky B16-F10 a neaktivované neutrofily.

skupina	A		B		C	
	počet buněk	%	počet buněk	%	počet buněk	%
annexin V+	659	4,39	1793	11,95	1666	11,11
annexin V+/ kaspáza-3+	5895	39,32	7559	50,39	7740	51,6
annexin V-/ kaspáza-3-	4348	28,99	5268	35,12	4979	33,19
kaspáza-3+	4095	27,3	380	2,53	615	4,1

Na Obr. 9 jsou zobrazeny grafy vyjadřující míru exprese fosfatidylserinu (PS) na buňkách B16-F10 z buněčné kultury při současné inkubaci těchto buněk s aktivovanými a neaktivovanými neutrofily z kostní dřeně myši. Z grafů vyplývá, že došlo ke zvýšení exprese PS u buněk B16-F10 inkubovaných s neutrofily (vztaženo k buňkám B16-F10 samotným) a to bez závislosti na tom, zda byly neutrofily aktivované nebo neaktivované. Dále je patrné, že u samotných buněk B16-F10 byla exprese kaspázy-3 vyšší než u buněk s neutrofily.



Obř. 9: Studium otázky exprese fosfatidylserinu na povrchu nádorových buněk při současné inkubaci těchto buněk s aktivovanými a neaktivovanými neutrořily. **A)** buňky B16-F10 **B)** buňky B16-F10 a aktivované neutrořily **C)** buňky B16-F10 a neaktivované neutrořily.

** $P \leq 0,01$ vztaženo ke skupině B. ○○ $P \leq 0,01$ vztaženo ke skupině C. ΔΔ $P \leq 0,01$ vztaženo ke skupině A.

6 DISKUZE

Tým pod vedením RNDr. Jana Ženky, CSc. se již několik let zabývá otázkou nádorové imunoterapie. Tato práce má svojí návazností na předešlé práce našeho týmu alespoň částečně přispět k pochopení některých dosud nevyřešených problémů této terapie.

Hlavním cílem, vedle studia otázky exprese PS na nádorových buňkách a blokace CD47, bylo nahrazení LPS. Janotová a kol. (2014) používala ve své práci LPS jako ligand se signalizačním účinkem s velmi působivými výsledky. Ale z důvodu mnoha negativních účinků LPS na lidské zdraví je nezbytné najít vhodnou náhradu, která by šla v nádorové terapii využít.

První pokus se zabýval použitím bakterií v léčbě nádorových onemocnění. Použita byla bakterie *Borrelia burgdorferi*, která neobsahuje ve své stěně LPS (Samuels a Radolf 2010). Z tohoto důvodu byla *Borrelia burgdorferi* vhodnou náhradou LPS. Bohužel se v našem pokusu žádný terapeutický efekt u volné bakterie i u kovalentního kotvení nedostavil. Žádného terapeutického efektu nebylo dosaženo ani při kombinaci této bakterie s mananem (Fáberová, in prep.). Je zajímavé, že u terapie pomocí bakterie *Listeria monocytogenes*, kterou ve své práci použila kolegyně Kumžáková, fungovala jen při přidání mananu, ale při použití samotné bakterie nebo kovalentního kotvení se nedostavil žádný pozitivní vliv na léčbu nádoru (Kumžáková, in prep.). Na druhou stranu v pokusu kolegyně Jáčkové, která použila bakterii *Mycobacterium tuberculosis*, nebylo přidání mananu potřeba. Terapie sice nefungovala při použití volné bakterie, ale při kovalentním kotvení se v terapii dostavil pozitivní účinek (Jáčková, in prep.). Je tedy zřejmé, že na výsledku nádorové terapie pomocí bakterie záleží nejen na složení dané bakterie, ale i na kotvení bakterie a použití vhodného agonisty fagocytárních receptorů. Z uvedeného vyplývá, že *Borrelia burgdorferi* nebyla vhodným signálem pro infiltraci nádoru nespecifickou imunitou a nebyla ani příhodným fagocytárním motivem.

V druhém *in vivo* pokusu jsme se snažili o blokaci CD47, který u nádorových buněk slouží jako „don't eat me“ signál. K této blokaci jsme použili anti CD47 aptamer a Anti-Mouse CD47 protilátku. Navíc byla zkoušena kombinace Resiquimodu a manan-BAM. Z výsledků vyplývá, že blokace anti CD47 aptamerem nefungovala, ale přítomnost tohoto aptameru zvýšila účinek nejen Resiquimodu, ale i Resiquimodu s

manan-BAM. Právě terapeutikum Resiquimod HCl s manan-BAM a anti CD47 aptamerem vedlo k dosažení nejlepších výsledků. Účinek protilátky Anti-Mouse CD47, která byla použita spolu s Resiquimodem HCl a mananem-BAM, ovlivňuje a zlepšuje (oproti skupině se samotným Resiquimodem HCl a mananem-BAM) výsledek terapie. Tento pokus byl zároveň jedním z pokusů, které upozornily na možnost použití Resiquimodu (v kombinaci s mananem) v nádorové terapii místo LPS, což bylo v dalších pracích rozvinuto (Ženka, in prep.).

Kolegyně Husníková (2014) ve své práci zkoušela použití anti CD47 aptameru spolu s kotveným fagocytárním motivem f-MLF (N-formyl-methionyl-leucyl-fenylalanin). Použití f-MLFKK-BAM spolu s anti CD47 aptamerem však nepřineslo žádné pozitivní účinky.

Zklamáním v tomto pokusu byly výsledky s Anti-Mouse CD47 protilátkou. Použití protilátky v této práci bylo děláno v souvislosti s výsledky práce Chaa a kol. (2012), který připisuje této protilátce velkou perspektivu v nádorové terapii. Neshoda ve srovnání s výsledky Chao a kol. (2012) je zřejmě dána těmito fakty: (1) protilátka byla aplikována jen třikrát, (2) samotné použití melanomu B16-F10, který je velmi agresivní a rychle rostoucí.

Poslední dva *in vitro* pokusy se zabývají otázkou exprese PS na nádorových buňkách. Navazují na předešlou diplomovou práci kolegyně Husníkové (2014), která zjistila, že buňky B16-F10 odebrané z nádoru myši, exprimují větší množství fosfatidyserinu (skoro 20% z 15 000 buněk) než melanomové buňky B16-F10 z buněčné kultury, kde PS exprimovalo jen 0,5% z celkových 15 000 buněk. Odpovědět na otázku rozdílné exprese PS jsme se pokoušeli v této práci.

Použitý kit (Dual Apoptosis Assay with Nucview 488 Caspase-3 Substrate and CF640R Annexin V) umožnil rozdělení buněk na populace. Populace, která exprimovala pouze PS, odpovídá indukované expresi PS nádorových buněk. Aktivace samotné kaspázy-3 odpovídá mrtvým buňkám. Populaci annexin V-/kaspáza3-, kde nedochází k expresi PS ani k aktivaci kaspázy-3, je populací živých nádorových buněk, u nichž nedošlo indukcii exprese PS na povrchu buněk. Populace, kde byla zjištěna aktivace kaspázy-3 i exprese PS, by měla být apoptotická. Zde však přicházíme do rozporu s jednou základní vlastností nádorových buněk. Nádorové buňky totiž nemají schopnost přejít do apoptózy, což je dáno mutacemi v apoptotické kaskádě (Hanahan a

Weinberg 2011). Je tady otázkou, zda tato populace buněk procházela apoptózou, či nikoli.

Riedl a kol. (2011) se domnívá, že za vyšší expresi PS může stres působící na nádorové buňky. Dále píše, že i nevratné poškození membrány buňky může expresi PS zvýšit. Tato fakta jsme se snažili v práci studovat. Na nádorové buňky jsme působili mechanickým třepáním i přidáním DNázy I a Liberázy DL. Z výsledků prvního *in vitro* pokusu (Obr. 8) je zřejmé, že mechanické třepání i přidání DNázy I a Liberázy DL nemá na expresi PS u buněk B16-F10 vliv. Oba tyto stresující faktory se mohou uplatnit při přípravě melanomových buněk z nádorů. Experiment však prokázal, že za nalezenou vyšší expresi PS u buněk izolovaných z nádorů nenesou odpovědnost.

Z tohoto důvodu jsme se začali zabírat otázkou, co tuto rozdílnou expresi zapříčiňuje. Jedna z našich cest vedla přes rozdílné pH v nádoru. Je známo, že pH v mikroprostředí nádoru je kyselější (6,5-6,8) oproti jiným tkáním. To je zapříčiněno tzv. Warburgovým efektem, kdy nádorové buňky kryjí své energetické potřeby zvýšenou glykolýzou vedoucí k produkci kyseliny mléčné a okyselení prostředí (Smallbone a kol. 2007). Vlivem pH na expresi PS se zabývala kolegyně Husníková (2014). Její výsledky však ukázaly, že nízké pH není zodpovědné za tuto rozdílnou expresi (Husníková 2014).

Jak už bylo napsáno v rešeršní části této práce, nádorové buňky mají mnoho mechanismů, kterými se brání imunitnímu ataku. Hoffmann a kol. (2005) uvádí, že jeho výsledky získané z experimentů *in vitro* a *in vivo* naznačují, že exprese PS má zásadní dopad na produkci cytokinu TGF- β z fagocytů. Ty totiž, po navázání na apoptotickou buňku s exprimovaným PS, sekretují řadu protizánětlivých mediátorů, mezi nimiž je i TGF- β . Tento cytokin mimo jiné může pozitivně ovlivňovat nádorové bujení, zvýšenou invazi nádoru a metastazování. Dále je TGF- β také považován za nejdůležitější cytokin podporující vznik T-regulačních lymfocytů (T-reg), které mohou významně potlačovat imunitní odpověď hostitele (Facciabene a kol. 2012).

To nás přivedlo na otázku, zda se expresi PS na buňkách B16-F10 z kultury zvýší po přidání aktivovaných nebo neaktivovaných neutrofilů. Z výsledku našeho pokusu *in vitro* je tedy zřejmé, že po přidání neutrofilů se exprese PS zvýšila. Nezáleželo na tom, zda byly neutrofilily aktivované, či nikoli. Z tohoto výsledku usuzujeme, že expresi PS na buňkách B16-F10 částečně ovlivňuje i imunitní systém. To otevírá otázku, zda zvýšená exprese PS u nádorových buněk není jedním ze systému protiimunitní obrany nádorů a do jaké míry jsou tyto systémy imunitním atakem indukovány.

Tato práce měla alespoň částečně přispět k pochopení některých dosud nevyřešených problémů, které nádorová imunoterapie čítá. Svými výsledky otevírá další možnosti cesty, kterými se nejen náš tým může vydat k lepšímu pochopení této aktuální problematiky.

7 ZÁVĚR

- Bakterie *Borrelia burgdorferi* není vhodná jako terapeutikum pro léčbu nádorových onemocnění. Nezáleží na tom, zda je volná, či kovalentně kotvená. Nelze tedy tuto bakterii použít jako náhradu za LPS.
- Blokace CD47 na nádorových buňkách pomocí anti CD47 aptameru neměla žádný vliv na růst nádorů.
- Anti CD47 aptamer i Anti-Mouse CD47 protilátka zvyšují účinek nádorové terapie založený na kombinaci Resiquimodu a kotveného mananu. Toto zvýšení však nebylo příliš výrazné.
- Stresový faktor (mechanické třepání, DNáza I a Liberáza DL) nemá vliv na expresi fosfatidylserinu na povrchu nádorových buněk B16-F10.
- Po kultivaci buněk B16-F10 s neutrofily se exprese PS na povrchu melanomových buněk zvýšila. Nezáleželo na faktu, zda byly neutrofily aktivované, či nikoli.

8 POUŽITÁ LITERATURA

Abouelmaatti, R. R., Elfeil, W., Wang, Y., & Liu, S. (2013). Pattern recognition receptors mini review. *Global Animal Science Journal*, 1(1).

Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4), 783-801.

Baranton, G., Postic, D., Saint Girons, I., Boerlin, P., Piffaretti, J. C., Assous, M., & Grimont, P. A. (1992). Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42(3), 378-383.

Bianchi, M. E. (2007). DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of Leukocyte Biology*, 81(1), 1-5.

Bickels, J., Kollender, Y., Merinsky, O., & Meller, I. (2002). Coley's toxin: historical perspective. *The Israel Medical Association journal: IMAJ*, 4(6), 471.

Brown, E. J., & Frazier, W. A. (2001). Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. *Trends in Cell Biology*, 11(3), 130-135.

Brown, G. C., & Neher, J. J. (2012). Eaten alive! Cell death by primary phagocytosis: 'phagoptosis'. *Trends in Biochemical Sciences*, 37(8), 325-332.

Buckland, A. G., & Wilton, D. C. (2000). Anionic phospholipids, interfacial binding and the regulation of cell functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1483(2), 199-216.

Carpentier, A., Laigle-Donadey, F., Zohar, S., Capelle, L., Behin, A., Tibi, A., ... & Carpentier, A. F. (2006). Phase 1 trial of a CpG oligodeoxynucleotide for patients with recurrent glioblastoma. *Neuro-oncology*, 8(1), 60-66.

Coley, W. B. (1910). The treatment of inoperable sarcoma by bacterial toxins (the mixed toxins of the *Streptococcus erysipelas* and the *Bacillus prodigiosus*). *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 3, 1-48.

Delves, P. J., Martin, S. J., Burton, D. R., & Roitt, I. M. (2012). *Roitt's Essential Immunology*. Chichester: John Wiley & Sons.

Dušek, L., Mužík, J., Malůšková, D., Májek, O., Pavlík, T., Koptíková, J., Gregor, J., Brabec, P., & Abrahámová, J. (2014). Epidemiologie zhoubných nádorů cílených screeningem dle nových dat Národního onkologického registru České republiky. *Klinická onkologie*, 19.

Erridge, C., Bennett-Guerrero, E., & Poxton, I. R. (2002). Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes and Infection*, 4(8), 837-851.

Facciabene, A., Motz, G. T., & Coukos, G. (2012). T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis. *Cancer research*, 72(9), 2162-2171.

- Ferenčík, M., Matřha, V., & Rovenský, J. (2004). *Ilustrovaný imunologický slovník*. Praha: Galén.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D., & Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), E359-E386.
- Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J. W. W., Comber, H., Forman, D., & Bray, F. (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *European Journal of Cancer*, 49(6), 1374-1403.
- Fidler, I. J. (1973). Selection of successive tumour lines for metastasis. *Nature*, 242, 148-149p.
- Fidler, I. J. (1975). Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. *Cancer Research*, 35(1), 218-224.
- Figdor, C. G., van Kooyk, Y., & Adema, G. J. (2002). C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nature Reviews Immunology*, 2(2), 77-84.
- Garcia-Lora, A., Algarra, I., & Garrido, F. (2003). MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *Journal of Cellular Physiology*, 195(3), 346-355.
- Gibson, S. J., Lindh, J. M., Riter, T. R., Gleason, R. M., Rogers, L. M., Fuller, A. E., Oesterich, L. J., Gorden, B. K., Qiu, X., McKane, S. W., Noelle, R. J., Miller, R. L., Kedl, R. M., Fitzgerald-Bocarsly, P., Tomai, M. A., & Vasilakos, J. P. (2002). Plasmacytoid dendritic cells produce cytokines and mature in response to the TLR7 agonists, imiquimod and resiquimod. *Cellular Immunology*, 218(1), 74-86.
- Gilboa, E. (2007). DC-based cancer vaccines. *Journal of Clinical Investigation*, 117(5), 1195.
- Grimsley, C., & Ravichandran, K. S. (2003). Cues for apoptotic cell engulfment: eat-me, don't eat-me and come-get-me signals. *Trends in Cell Biology*, 13(12), 648-656.
- Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140(6), 883-899.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- Hemminki, K. (1993). DNA adducts, mutations and cancer. *Carcinogenesis*, 14(10), 2007-2012.
- Hoffmann, P. R., Kench, J. A., Vondracek, A., Kruk, E., Daleke, D. L., Jordan, M., Marrack, P., Henson, P. M., & Fadok, V. A. (2005). Interaction between

phosphatidylserine and the phosphatidylserine receptor inhibits immune responses in vivo. *The Journal of Immunology*, 174(3), 1393-1404.

Hořejší, V., & Bartůňková, J. (2009). *Základy imunologie*. Praha: Triton.

Husníková, H. (2014). *Nádorová terapie založená na použití ligandů fagocytárních receptorů, kotvených na nádorové buňky. Studium možností zesílení jejího účinku a specifity* (Diplomová práce). České Budějovice: PřF JČU.

Chao, M. P., Weissman, I. L., & Majeti, R. (2012). The CD47–SIRP α pathway in cancer immune evasion and potential therapeutic implications. *Current Opinion in Immunology*, 24(2), 225-232.

Chiu, H. Y., Sun, G. H., Chen, S. Y., Wang, H. H., Ho, M. Y., Chu, C. Y., Wu, W. L., Jhou, R. S., Tsai, Y. L., Huang, R. T., Sun, K. H., & Tang, S. J. (2013). Pre-existing fas ligand (FasL) in cancer cells elicits tumor-specific protective immunity, but delayed induction of FasL expression after inoculation facilitates tumor formation. *Molecular Carcinogenesis*, 52(9), 705-714.

Janeway Jr, C. A., & Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annual review of Immunology*, 20(1), 197-216.

Janotová, T., Jalovecká, M., Auerová, M., Švecová, I., Bruzlová, P., Maierová, V., Kumžáková, Z., Čunátová, Š., Vlčková, Z., Caisová, V., Rozsypalová, P., Lukáčová, K., Vácová, N., Wachtlová, M., Salát, J., Lieskovská, J., Kopecký, J., & Ženka, J. (2014). The Use of Anchored Agonists of Phagocytic Receptors for Cancer Immunotherapy: B16-F10 Murine Melanoma Model. *PloS ONE*, 9(1), e85222.

Jílek, P. (2008). *Základy imunologie*. Praha: Anyway.

Kawai, T., & Akira, S. (2011). Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*, 34(5), 637-650.

Kay, J. G., & Grinstein, S. (2011). Sensing phosphatidylserine in cellular membranes. *Sensors*, 11(2), 1744-1755.

Kirkwood, J. M., Butterfield, L. H., Tarhini, A. A., Zarour, H., Kalinski, P., & Ferrone, S. (2012). Immunotherapy of cancer in 2012. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 62(5), 309-335.

Koldová, L. (2013). *Úvod do preklinické medicíny*. Praha: Univerzita Karlova v Praze, 3. lékařská fakulta.

Kumagai, Y., & Akira, S. (2010). Identification and functions of pattern-recognition receptors. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(5), 985-992.

Larangé, A., Antonios, D., Pallardy, M., & Kerdine-Römer, S. (2009). TLR7 and TLR8 agonists trigger different signaling pathways for human dendritic cell maturation. *Journal of Leukocyte Biology*, 85(4), 673-683.

- Le, Y., Murphy, P. M., & Wang, J. M. (2002). Formyl-peptide receptors revisited. *Trends in Immunology*, 23(11), 541-548.
- Lipke, P. N., & Ovalle, R. (1998). Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *Journal of Bacteriology*, 180(15), 3735-3740.
- Lu, Y. C., Yeh, W. C., & Ohashi, P. S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, 42(2), 145-151.
- Matsushita, M., Thiel, S., Jensenius, J. C., Terai, I., & Fujita, T. (2000). Proteolytic activities of two types of mannose-binding lectin-associated serine protease. *The Journal of Immunology*, 165(5), 2637-2642.
- Nakamura, K., Yoshikawa, N., Yamaguchi, Y., Kagota, S., Shinozuka, K., & Kunitomo, M. (2002). Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. *Life Sciences*, 70(7), 791-798.
- Old, L. J., & Chen, Y. T. (1998). New paths in human cancer serology. *The Journal of Experimental Medicine*, 187(8), 1163-1167.
- Opanasopit, P., Shirashi, K., Nishikawa, M., Yamashita, F., Takakura, Y., & Hashida, M. (2001). In vivo recognition of mannosylated proteins by hepatic mannose receptors and mannan-binding protein. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 280(5), G879-G889.
- Paterson, D. L., & Patel, A. (1998). Bacillus Calmette-Guerin (bcg) immunotherapy for bladder cancer: review of complications and their treatment. *Australian and New Zealand journal of surgery*, 68(5), 340-344.
- Pathak, S., & Palan, U. (2005). *Immunology: essential and fundamental*. Enfield: Science Publishers.
- Petruželka, L., & Konopásek, B. (2003). *Klinická onkologie*. Praha: Karolinum.
- PrabhuDas, M., Bowdish, D., Drickamer, K., Febbraio, M., Herz, J., Kobzik, L., Krieger, M., Loike, J., Means, T. K., Moestrup, S. K., Post, S., Sawamura, T., Silverstein, S., Wang, X. Y., & El Khoury, J. (2014). Standardizing scavenger receptor nomenclature. *The Journal of Immunology*, 192(5), 1997-2006.
- Ravichandran, K. S. (2011). Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me signaling pathways. *Immunity*, 35(4), 445-455.
- Rožková, D., Tišerová, H., Fučíková, J., Lašt'ovička, J., Podrazil, M., Ulčová, H., Budínský, V., Prausová, J., Linke, Z., Minárik, I., Šedivá, A., Špíšek, R., & Bartůňková, J. (2009). FOCUS on FOCIS: combined chemo-immunotherapy for the treatment of hormone-refractory metastatic prostate cancer. *Clinical Immunology*, 131(1), 1-10.
- Samuels, D. S., & Radolf, J. D. (Eds.). (2010). *Borrelia: molecular biology, host interaction and pathogenesis*. Hethersett, Norwich: Caister Academic Press.

- Scott, A. M., Wolchok, J. D., & Old, L. J. (2012). Antibody therapy of cancer. *Nature Reviews Cancer*, 12(4), 278-287.
- Sick, E., Jeanne, A., Schneider, C., Dedieu, S., Takeda, K., & Martiny, L. (2012). CD47 update: a multifaceted actor in the tumour microenvironment of potential therapeutic interest. *British Journal of Pharmacology*, 167(7), 1415-1430.
- Smyth, M. J., Cretney, E., Kershaw, M. H., & Hayakawa, Y. (2004). Cytokines in cancer immunity and immunotherapy. *Immunological Reviews*, 202(1), 275-293.
- Stahl, P. D., & Ezekowitz, R. A. B. (1998). The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Current Opinion in Immunology*, 10(1), 50-55.
- Stratton, M. R., Campbell, P. J., & Futreal, P. A. (2009). The cancer genome. *Nature*, 458(7239), 719-724.
- Takeda, K., & Akira, S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*, 17(1), 1-14.
- Thomas, J. A., & Badini, M. (2011). The role of innate immunity in spontaneous regression of cancer. *Indian Journal of Cancer*, 48(2), 246.
- Turner, M. W. (2003). The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Molecular Immunology*, 40(7), 423-429.
- Villalba, M., Rathore, M. G., Lopez-Royuela, N., Krzywinska, E., Garaude, J., & Allende-Vega, N. (2013). From tumor cell metabolism to tumor immune escape. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45(1), 106-113.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., & Reutellingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. *Journal of Immunological Methods*, 184(1), 39-51.
- Vorlíček, J., Abrahámová, J., Vorlíčková, H., & kolektiv (2012). *Klinická onkologie pro sestry*. Praha: Grada.
- Worthley, D. L., Bardy, P. G., & Mullighan, C. G. (2005). Mannose-binding lectin: biology and clinical implications. *Internal Medicine Journal*, 35(9), 548-555.