

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

FURMAN MATEJ

**EPIGENETSKO DOLOČANJE DELEŽA NARAVNIH
FOXP3⁺ REGULATORNIH LIMFOCITOV T V VZORCIH
ČLOVEŠKE PERIFERNE KRVI.**

**EPIGENETIC DETERMINATION OF NATURAL FOXP3⁺
REGULATORY T LYMPHOCYTES FROM HUMAN
PERIPHERAL BLOOD SAMPLES.**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2016

Magistrsko naložko sem opravljal na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Matjaža Jerasa, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Vida Mlakarja, univ. dipl. mikrobiol.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju, izr. prof. dr. Matjažu Jerasu in somentorju, asist. dr. Vidu Mlakarju za vodenje, spremljanje in vso pomoč pri eksperimentalnem delu in pisanju magistrske naloge. Obema se zahvaljujem tudi za njuno sodelovanje in dostopnost pri razjasnjevanju mojih vprašanj ter izzivov.

Posebna zahvala gre moji družini, ki mi je omogočila študij in me pri tem podpirala.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko naložko izdelal samostojno, pod mentorstvom izr. prof. dr. Matjaža Jerasa, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Vida Mlakarja, univ. dipl. mikrobiol.

Matej Furman

VSEBINA

KAZALO SLIK	I
KAZALO PREGLEDNIC	II
POVZETEK.....	III
KLJUČNE BESEDE	III
ABSTRACT	IV
KEY WORDS	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	V
1 UVOD	1
1.1 Imunologija.....	1
1.1.1 Imunski sistem.....	1
1.1.2 Imunska toleranca	4
1.2 Rak	4
1.2.1 Kancerogeneza	5
1.2.2 Interakcije med imunskim sistemom in tumorskim tkivom	6
1.2.3 Vzdrževanje imunosupresivnega mikrookolja v tumorjih	8
1.2.4 Regulatorni limfociti T (Treg).....	9
1.3 Določanje deleža naravnih FOXP3 ⁺ regulatornih limfocitov T (Treg)	12
1.3.1 Pretočna citometrija in s fluorescenco aktivirano celično ločevanje FACS (ang. Fluorescence-Activated Cell Sorting)	12
1.3.2 Epigenetika.....	14
1.3.3 Metilacija DNA	14
2 NAMEN DELA.....	15
3 MATERIALI IN METODE	16
3.1 Plazmidni standardi.....	16
3.2 Oligonukleotidni začetniki.....	17
3.3 Ostali reagenti in oprema	18
3.3.1 Reagenti:.....	18
3.3.2 Aparature in pribor:.....	19
3.4 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	19

3.4.1	Princip in postopek verižne reakcije s polimerazo	19
3.4.2	Princip in postopek kvantitativne verižne reakcije s polimerazo (qPCR)	22
3.4.3	Optimizacija pogojev verižne reakcije s polimerazo (PCR)	22
3.5	Agarozna gelska elektroforeza (AGE)	23
3.5.1	Priprava 2 % agaroznega gela	24
3.5.2	Priprava vzorcev za AGE	24
3.5.3	Pogoji za izvedbo elektroforeze	24
3.5.4	Slikanje gela po elektroforezi	24
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	25
4.1	Optimizacija reakcij PCR	25
4.2	Priprava in redčenje plazmidnih standardov	27
4.3	Selektivnost reakcije PCR	29
4.4	Izračun standardnih odklonov	30
4.5	Bisulfitna pretvorba DNA	32
4.6	Analiza deležev Treg in celotnega števila CD3 ⁺ limfocitov T (oTL) v vzorcih polne krvi bolnikov in zdravih posameznikov	36
4.7	Zaključna razprava	37
5	SKLEP	37
6	LITERATURA	38

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz zunanjih obrambnih barier, ki ščitijo organizem pred okužbami; pripredjeno po [37].	2
Slika 2: Princip epigenetskega ravnovesja izražanja genov.	6
Slika 3: Shematski prikaz pretočne celice, ki omogoča hidrodinamsko fokusiranje celic; pripredjeno po [44].	13
Slika 4: Shematski prikaz ključnih sestavnih delov pretočnega citometra; pripredjeno po [45].	13
Slika 5: Potek reakcije PCR, (P = polimeraza); povzeto po [53].	21
Slika 6: Rezultat agarozne gelske elektroforeze - optimizacija reakcije PCR za gena CD3 in GAPDH.	26
Slika 7: Rezultat agarozne gelske elektroforeze - optimizacija reakcije PCR za gen FOXP3.	26
Slika 8: Grafična predstavitev specifičnih reakcij qPCR za GAPDH. Levo: potek specifičnih reakcij za plazmid CpG z oligonukleotidnima začetnikoma GAPDH_TpG pri redčitvah z 12.500, 2.500, 500, 100 in 20 plazmidnih molekul. Desno: potek specifičnih reakcij za plazmid TpG z oligonukleotidnima začetnikoma GAPDH_TpG, pri redčitvah z 12.500, 2.500, 500, 100 in 20 plazmidnih molekul.	28
Slika 9: Rezultat agarozne gelske elektroforeze za prikaz selektivnosti reakcij PCR.....	30
Slika 10: A: reakcija qPCR z reakcijsko zmesjo za gen CD3 in plazmid CpG, v katero smo dodali tudi plazmidno DNA. C: reakcija qPCR z reakcijsko zmesjo za gen CD3 in plazmid CpG, ki smo ji naknadno dodali plazmidno DNA. B: Reakcija qPCR z reakcijsko zmesjo za gen CD3 in plazmid TpG, v katero smo dodali tudi plazmidno DNA. D: reakcija qPCR z reakcijsko zmesjo za gen CD3 in plazmid TpG, ki smo ji naknadno dodali plazmidno DNA.	31
Slika 11: Prikaz bisulfitne pretvorbe odseka DNA, ki ji sledi specifično pomnoževanje s PCR; pripredjeno po [52].	33
Slika 12: Standardne umeritvene krivulje posameznih plazmidov za različiče CpG in TpG genov CD3 in FOXP3 ter variante TpG hišnega gena GAPDH.....	35

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Podvrste CD4 ⁺ in CD8 ⁺ regulatornih limfocitov T [16].	11
Preglednica II: Nukleotidni zaporedji vstavljeni v plazmid pGOV4, s katerimi smo pripravili plazmida CpG in TpG.....	17
Preglednica III: Lastnosti uporabljenih oligonukleotidnih začetnikov (Sigma-Aldrich, Nemčija).	18
Preglednica IV: Sestava reakcijske zmesi za reakcijo PCR.	21
Preglednica V: Predstavitev temperaturnega programa optimizirane reakcije PCR za pomnoževanja genov CD3 in GAPDH.....	25
Preglednica VI: Predstavitev temperaturnega programa optimizirane reakcije PCR za pomnoževanja genov FOXP3.....	25
Preglednica VII: Lastnosti uporabljenih plazmidov CpG in TpG.....	27
Preglednica VIII: Sestava reakcijske zmesi qPCR za pomnoževanje gena GAPDH in za dokaz pravilnega redčenja plazmidnih standardov.....	28
Preglednica IX: Temperaturni program reakcije qPCR za pomnoževanje gena GAPDH in za dokaz pravilnega redčenja plazmidnih standardov	29
Preglednica X: Sestava reakcijske zmesi PCR za dokaz selektivnosti reakcij za gen CD3....	30
Preglednica XI: Priprava reakcijske zmesi za ugotavljanje standardne deviacije metode (A) in optimizirani temperaturni program reakcije qPCR (B).	32
Preglednica XII: Rezultati analize vzorcev s pomočjo pripravljenih standardnih reagentov..	36

POVZETEK

Imunski sistem pomembno vpliva na nastanek in razvoj tumorjev. Supresija imunskega odziva omogoča rakavim celicam nemoteno proliferacijo in nadaljnjo progresijo. Najpomembnejše celice imunskega sistema, ki delujejo supresivno, so regulatorni limfociti T. Vzpostavljam in vzdržujejo imunsko toleranco do lastnega, njihovo povečano število pri raku pa omogoča ugodnejše pogoje za razrast tumorjev. Za delovanje regulatornih limfocitov T je ključno izražanje jedrnega transkripcijskega dejavnika FOXP3, značilnega za naravne regulatorne limfocite T. Ugotovili so, da je specifična genska regija gena FOXP3 v regulatornih limfocitih T nemetilirana, zato to dejstvo predstavlja zelo uporabno osnovo za ugotavljanje njihovega dejanskega števila. Na podlagi te ugotovitve smo vzpostavili metodo, ki temelji na uporabi tehnologije rekombinantne DNK in epigenetskih reakcij ter omogoča natančno določanje deleža regulatornih limfocitov T med vsemi limfociti T ($CD3^+$). Prav epigenetske modifikacije so tiste, ki so nujne za stabilno izražanje FOXP3. V primerjavi s klasičnimi metodami za določanje fenotipov imunskeih celic, kot sta pretočna citometrija in druge imunkemijske metode, je postopek, ki smo ga razvili, precej bolj specifičen. Pripravili smo dva plazmida, ki vsebujeta mesta za preučevanje izbranih genov CD3 in FOXP3, nato pa na osnovi reakcije PCR v realnem času izdelali umeritveno krivuljo njunih standardnih redčitev. Nato smo poskusno analizirali manjše število vzorcev krvi bolnikov z rakom in zdravih oseb ter ugotovili višje povprečne vrednosti deleža regulatornih limfocitov T pri prvih (6,91%) v primerjavi z zdravimi (3,65%). Določili smo tudi vrednosti razmerij med regulatornimi in ostalimi limfociti T ter prav tako ugotovili višje deleže pri bolnikih (27,9%) kot pri zdravih (6,14%). Na podlagi naših pilotnih izsledkov ugotavljamo, da lahko s pomočjo epigenetskih analiz limfocitov T na sistemskem nivoju in tudi v tumorskem mikrookolju, kvantitativno določimo njihovo sestavo. Poleg tega bi bila epigenetska kvantifikacija določene vrste imunskeih celic lahko uporabna tudi kot neodvisni klinični parameter.

KLJUČNE BESEDE

epigenetika; naravni regulatorni limfociti T (Treg); FOXP3 jedreni transkripcijski dejavnik v naravnih regulatornih limfocitih T; epigenetsko določanje deležev imunskeih celic.

ABSTRACT

The immune system greatly affects the emergence and development of tumours. Immunosuppression enables cancer cells to proliferate and progress. The most important suppressor cells of the immune system are regulatory T lymphocytes (Treg). They establish and maintain immune self-tolerance. However, their increased numbers in cancer facilitate tumour growth. The key functional element of regulatory T lymphocytes is the expression of FOXP3, the core transcription factor, characteristic of this type of cells. A specific region of the FOXP3 gene in regulatory T lymphocytes was found to be non-methylated, thus representing a useful tool for determining their actual numbers. On the basis of this finding, we developed a method that uses recombinant DNA technology and allows us to determine precise number of regulatory T lymphocytes among all T lymphocytes. Epigenetic modifications ensure a stable expression of the FOXP3 gene. In comparison to traditional methods used for determining immune cell phenotypes, such as flow cytometry and various immunochemical methods, our procedure is much more specific. We prepared two plasmids containing specific sites for studying the two genes of interest, i.e. CD3 and FOXP3. By using quantitative real time PCR calibration curves of standard dilutions of genes were determined. We analysed a small number of blood samples taken from cancer patients and healthy individuals and the average proportion of regulatory T lymphocytes in patients (6,91%) was approximately two-times higher than that in healthy individuals (3,65%). The ratios between regulatory T lymphocytes and other T lymphocytes were also determined and the analysis showed that the average ratio in patients (27,9%) was almost 4,5-fold higher than in healthy individuals (6,14%). The pilot findings show that epigenetic analysis of T-cells at the systemic level or within the tumour microenvironment can define their quantitative composition. Epigenetic quantification of specific immune cell types could also be useful as an independent clinical parameter.

KEY WORDS

Epigenetics; regulatory T cells (Treg); FOXP3-gene transcription factor of regulatory T cells; epigenetic assessment of immune cells fractions.

SEZNAM OKRAJŠAV

- Ab – protitelo (ang. Antibody)
- AGE – agarozna gelska elektroforeza (ang. Agarose gel electrophoresis)
- APC – antigene predstavljače celice (ang. Antigen-presenting cells)
- CD3 – celični označevalec razreda 3 (ang. Cluster of Differentiation 3)
- CTL – CD8⁺ citotoksični limfociti T (ang. Cytotoxic T Lymphocytes)
- CTLA-4 – citotoksični z limfociti T povezani protein 4 (ang. Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4)
- DNA – deoksiribonukleinska kislina (ang. Deoxy Ribonucleic Acid)
- FACS – celično sortiranje s fluorescenčno pretočno citometrijo (ang. Fluorescence-activated Cell Sorting)
- FOXP3 – jedrni transkripcijski dejavnik, značilen za naravne regulatorne limfocite T (ang. Forkhead Box P3)
- GITR – z glukokortikoidi inducirani receptor iz družine tumorje nekrotizirajočih dejavnikov (ang. Glucocorticoid-induced TNFR family Receptor)
- IHC – imunohistokemijske metode (ang. Immunohistochemistry)
- ILT3 – imunoglobulinu podoben receptor razreda 3 (ang. Immunoglobulin-like transcript 3)
- ILT4 – imunoglobulinu podoben receptor razreda 4 (ang. Immunoglobulin-like transcript 4)
- MCS – mesto na plazmidu, ki vsebuje zapise za restrikcijske encime (ang. Multiple Cloning Site)
- MGMT – O-6-metilgvanidinska DNA metiltransferaza, popravljalni encim naravno prisotnih mutagenih poškodb (ang. O-6-methylguanine-DNA methyltransferase)
- MHC – poglavitni kompleks tkivne skladnosti (ang. Major Histocompatibility Complex)
- MLH1 – popravljalni encim naravno prisotnih mutagenih poškodb (ang. MutL Homolog 1)
- mRNA – informacijska ribonukleinska kislina (ang. Messenger Ribonucleic Acid)
- NK – naravne celice ubijalke (ang. Natural Killer Cells)
- ORI – mesto na plazmidu, ki označuje mesto začetka replikacije (ang. Origin of replication)
- PCR – verižna reakcija s polimerazo DNA (ang. Polymerase Chain Reaction)
- PD-1 – protein 1 programirane celične smrti (ang. Programmed cell death protein 1)

qPCR – kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času (ang. Quantitative Polymerase Chain Reaction)

RNA – ribonukleinska kislina (ang. Ribonucleic Acid)

SAM – S-adenozil metionin, encimski kofaktor, prisoten pri prenosu metilnih skupin (ang. S-adenosyl methionine)

TCR – T celični receptor (ang. T-Cell Receptor)

TGF β – transformirajoči rastni dejavnik beta (ang. Transforming Growth Factor beta)

Th – celice T pomagalke, podvrsta limfocitov T (ang. T-helper Cells)

Treg – naravni regulatorni limfociti T (ang. Natural Regulatory T cells)

TSDR – demetilirano gensko področje značilno za celice Treg (ang. Treg-specific Demethylated Region)

1 UVOD

1.1 Imunologija

Imunologija je multidisciplinarna veda, ki preučuje razvoj in delovanje celičnih in topnih sestavin imunskega sistema, s katerimi organizem specifično prepozna, odstranjuje ali nevtralizira telesu tuge snovi. Imunologija torej preučuje odziv organizma na imunogene dražljaje, razločevanje med lastnim in tujim ter vse biološke, fizikalne in kemijske vidike imunskeih reakcij. Obravnavata tudi mehanizme vseh omenjenih procesov, in sicer tako v obdobjih zdravja kot bolezni [1].

1.1.1 Imunski sistem

Z izrazom imunski sistem označujemo skupek dejavnikov in mehanizmov, ki omogočajo fiziološko obrambo in vzdrževanje neokrnjenosti organizma. To obsega organe, tkiva, celice ter molekule, ki nas varujejo pred neželenimi učinki tujih organizmov in snovi. Naloge imunskega sistema so številne in raznovrstne, od preprečevanja vstopa mikroorganizmov v telo, uničevanja tistih tujkov, ki jim to uspe, do popolne odstranitve okužb.

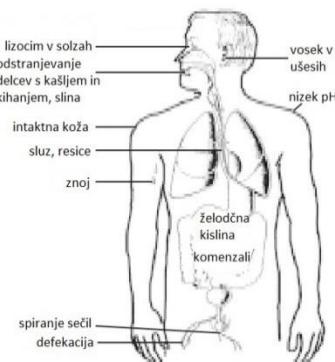
Sestavni deli imunskega sistema so:

- primarni (timus, kostni mozeg) in sekundarni (vranica, bezgavke) limfatični organi ter tkiva (sluznična in limfatična),
- celice: fagociti, naravne celice ubijalke (NK), granulociti, limfociti B in T, antigene predstavljaljoče celice (APC), ...
- topni dejavniki:
 - protitelesa,
 - komplement,
 - citokini ter kemokini, ter
 - ostali vnetni mediatorji.

Imunost pomeni stanje, ki organizmu omogoča, da je zavarovan pred tujimi snovmi oz. antigeni. Delimo jo na prirojeno in pridobljeno. Prva je usmerjena proti različnim tujkom antigensko nespecifično. Filogenetsko je mnogo starejša od pridobljene, antigensko specifične imunosti. Sestavljajo jo tri poglavite komponente, in sicer:

- anatomske pregrade (koža ter sluznice prebavil in dihal),
- različne topne molekule, prisotne v telesnih tekočinah oz. humoralna bariera (komplement, proteini akutne faze, citokini), ter
- specializirane celice (nevtrofilci, eozinofilci, bazofilci, celice NK, monociti, makrofagi).

Prirojeni antigensko nespecifični imunski odzivi torej vključujejo anatomske, fiziološke, endocitne, fagocitne in vnetne pregrade, ki preprečujejo mikroorganizmom, da bi vstopili v organizem in se v njem ustalili (Slika 1). Gre za prvo obrambno linijo organizma, temu pa nato sledi aktivacija pridobljenega imunskega odziva [1, 2].



Slika 1: Shematski prikaz zunanjih obrambnih barier, ki ščitijo organizem pred okužbami; prirejeno po [37].

Delovanje pridobljene imunosti pa je usmerjeno specifično proti določenemu antigenu. Nosilci celične imunosti so limfociti T. Delujejo lahko neposredno citotoksično ($CD8^+$ limfociti T) ali pa kot celice T pomagalke ($CD4^+ Th$), ki opredeljujejo vrsto celičnega imunskega odziva (Th1, Th2, Th17, ...) ter omogočajo učinkovito pretvorbo aktiviranih limfocitov B v plazmatke. Limfociti B so nosilci humoralne pridobljene imunosti, ki se po antigensko specifični aktivaciji pretvorijo v plazmatke, v katerih poteka proizvodnja protiteles (Ab).

Osnovne lastnosti pridobljenega imunskega odziva so:

- sposobnost razlikovanja med lastnim in tujim,
- antigenska specifičnost reakcij,

- klonska celična ekspanzija, ter
- imunski spomin.

Pridobljeni imunski odziv poteka v dveh, medsebojno soodvisno povezanih fazah; in sicer prepoznavanju antigena in posledičnem odzivu nanj, ki ga predstavlja aktivacija efektorskih celic in topnih biogenih molekul. Poglavitne celice, ki sodelujejo v nastanku in poteku pridobljenega imunskega odziva, so antogene predstavljajoče celice (APC), limfociti T in limfociti B.

Limfociti B in T imajo na membranah izjemno polimorfne, klonsko porazdeljene receptorje, ki prepoznavajo antogene. Receptorji na klonih limfocitov B so transmembranske molekule protiteles razredov IgM in IgD, ki antigen prepozna in veže neposredno. Limfociti T pa prepozna antogene s svojimi klonsko porazdeljenimi T celičnimi receptorji (TCR) samo, kadar so ti v obliki peptidov vezani na molekule poglavitnega kompleksa tkivne skladnosti razredov I (MHC I) ali II (MHC II), izraženih na površini celic. Kot smo že omenili, lahko limfocite T razdelimo v dve poglavitni podskupini: celice T pomagalke (celice T_h) in citotoksične celice T (CTL). Celice T_h izražajo membranski glikoprotein CD4 in s svojimi TCR prepozna antogene vezane na molekule MHC razreda II, medtem ko je za CTL značilen glikoprotein CD8, njihovi TCR pa prepozna antogene vezane na molekule MHC razreda I.

Zunajcelične antogene privzemajo APC: monociti/makrofagi, mieloidne dendritične celice (DC) in celice B. V njih se antigeni predelajo, nastali antigenski peptidi pa se vežejo na molekule MHC razreda II in se prenesejo na njihovo površino, kjer jih nato lahko prepozna celice T_h .

Znotrajcelični antigeni, npr. virusni ali tumorski antigeni, nastali v spremenjenih lastnih celicah se razgradijo v citoplazmi in se na celičnih površinah izrazijo vezani na molekule MHC razreda I. Tu jih nato s svojimi TCR prepozna CTL.

Interakcija imunsko zmožnega klena limfocita T z antigenom, izraženim v okviru molekule MHC na površini APC, ga spodbudi k razmnoževanju in diferenciaciji v efektorske in spominske celice. Prvo izpostavljanje antigenu sproži primarni imunski odziv. Po končanju efektorskega dela odziva, nastale spominske celice sprožijo še hitrejši in močnejši imunski odziv na drugo in vsako naslednjo prisotnost enakega antiga.

Imunski sistem torej razvije celično posredovane in humorale imunske odzive. Humoralni odziv je zelo učinkovit pri odstranjevanju izvenceličnih antigenov, celično posredovani pa pri uničevanju endogenih antigenov. Efektorske celice celično posredovanega imunskega

odziva so aktivirane celice T_h , ki proizvajajo številne citokine in CTL, ki lahko uničijo spremenjene lastne celice. Aktivacija celic T_h je potrebna za obe vrsti imunskeih odzivov [1, 2, 3].

1.1.2 Imunska toleranca

Imunska toleranca je stanje neodzivnosti imunskega sistema na snovi, celice ali tkiva, ki imajo sicer sposobnost, da izzovejo imunski odziv. Predstavlja pomemben del homeostaze imunskega sistema, ki zagotavlja celovitost našega organizma. Imunski odziv vključuje aktivacijo številnih dejavnikov, ki omogočajo, da se s pomočjo celične in protitelesne imunosti uspešno obranimo pred škodljivimi, telesu tujimi snovmi in dejavniki. Seveda pa mora biti ta ustrezno nadzorovana in primerno uravnavana z nasprotno delujočim, zaviralnim procesom, ki ga omogoča imunska toleranca. To dinamično ravnoesje med aktivacijo in toleranco, ki je ključnega pomena pri zagotavljanju homeostaznih mehanizmov in posledično za zdravje vsakega posameznika, lahko zagotavlja le dobro nadzorovano ter uravnoteženo delovanje efektorskih imunskeih celic (celic NK, limfocitov T_h , CTL in limfocitov B) in ostalih aktivacijskih dejavnikov na eni, ter nasprotno delujočih imunosupresivnih celic (različne vrste regulatornih CD4 $^+$ in CD8 $^+$ limfocitov T, tolerogene APC) in ostalih zaviralnih dejavnikov, na drugi strani. V primeru porušenja tega ravnoesja se lahko pojavijo bodisi avtoimunske bolezni, ki so posledica preprečene reaktivnosti zoper lastne antigene, ali pa nebrzdran razrast rakavih celic zaradi prekomernega negativnega uravnavanja imunskega sistema, ki lahko popolnoma izniči delovanje protitumorskih efektorskih mehanizmov. Osnovni nalogi imunske tolerance sta nedvomno zagotavljanje in vzdrževanje nereaktivnosti na telesu lastne antigene [4].

Imunsko toleranco delimo na osrednjo ali centralno in periferno, odvisno od tega ali pride do aktivacije celic v kostnem mozgu in timusu (centralna) ali pa v bezgavkah in drugih tkivih (periferna). Mehanizmi vzpostavitev obeh vrst toleranc so različni njun končni učinek pa podoben [5, 6].

1.2 Rak

Pri raku se najpogosteje omenja beseda tumor. Ta opisuje novotvorbo, ki je lahko benigna z lokalno omejeno rastjo ali maligna, sposobna tvorjenja razsevkov oz. metastaz. Rak je skupno ime za različne vrste malignih tumorjev. Pomeni tudi bolezen celic, ki pravzaprav poteka na molekularnem genskem nivoju. Osnova za nastanek raka je nenadzorovana delitev celic in njihova sposobnost, da se naselijo v okoliških in tudi oddaljenejših tkivih.

Vzrok za to so lahko poškodbe DNA oziroma mutacije določenih vitalnih genov, ki nadzirajo celično delitev. Že ena sama tovrstna mutacija lahko privede do porušenja nadzora delitve celic in tvorbe tumorja.

1.2.1 Kancerogeneza

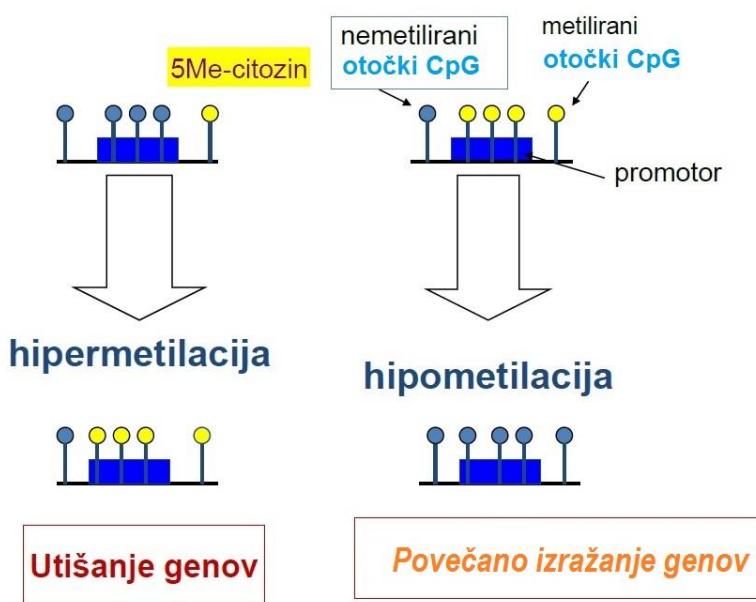
V organizmu vse življenje poteka praktično nepredstavljivo število celičnih delitev in posledično obstaja velika verjetnost, da pride pri kopiranju dednega materiala do spontanih mutacij genov. V vsaki celici obstaja nadzorni sistem celičnega cikla, ki je odgovoren za pravilno kopiranje dednega materiala in ustrezeno delitev v hčerinske celice. V primeru, ko pride do poškodbe molekule DNA zaradi različnih notranjih ali zunanjih dejavnikov kot so: nedokončani znotrajcelični procesi ali neugodno zunajcelično okolje, lahko kontrolni sistem zaustavi proces kopiranja DNA ali celične delitve in tako celici zagotovi dovolj časa, da popravi nastale napake. V primeru, da tega celični popravljalni sistem ne uspe zaznati in odpraviti, lahko celica sama sproži programirano celično smrt (apoptoza), obstajajo pa tudi še drugi, dodatni varnostni mehanizmi [1, 2].

Kljub učinkovitemu nadzornemu sistemu, ki sproti odpravlja mutacije, pa se lahko vseeno zgodi, da se mu mutirana celica izogne. Taka celica potrebuje za svoje preživetje selektivno prednost pred normalnimi celicami, ki jo pridobi s progresivnim kopičenjem mutacij skozi vrsto uspešnih delitev. Pri tem pride do naravnega izbora, saj ima vsaka naslednja generacija potomk pogosteje izražene tiste nededorovane lastnosti, ki ji dajejo večjo možnost za preživetje in nadaljnje razmnoževanje, zato se začnejo mutirane celice proliferirati na škodo normalnih. K mutacijam bistveno prispevajo karcinogeni, periodične celične poškodbe zaradi kroničnega vnetja, različne vrste sevanj (UV, X, itd.) in za celice neugodno mikrookolje.

Kancerogenezo razdelimo v 3 stopnje:

1. Iniciacija: med podvojevanjem DNA se kopičijo mutacije genov, katerih posledica je lahko nenadzorovan izražanje onkogenov in inaktivacija tumorsupresorskih genov, spremeni pa se tudi stopnja njihove metilacije. Na promotorskih regijah onkogenov se stopnja metilacije zmanjša (hipometilacija, ki povzroči zvečano izražanje teh genov), pri tumorsupresorskih genih pa poveča (hipermetilacija, ki povzroči zmanjšano izražanje teh genov) (Slika 2). Posledica teh dogodkov je izguba kontrole nad celično rastjo in delitvijo (proliferacijo).

- Promocija: mutirane celice se delijo naprej in pri tem se lahko kopičijo nove mutacije, torej njihovo število raste. Proliferacija tumorskih celic ni nujno večja od tiste, ki jo izvajajo nekatere vrste normalnih celic. So pa tumorske celice izjemno heterogene, kar še poveča verjetnost njihovega preživetja in uspešnost izogibanja imunskemu sistemu.
- Maligna progresija: transformirane tumorske celice močno spodbujajo angiogenezo, s čimer pridejo v ospredje njihove maligne lastnosti, pa tudi dotok protitumorskih imunskih celic ter seveda pojav metastaz.



Slika 2: Princip epigenetskega ravnovesja izražanja genov.

1.2.2 Interakcije med imunskim sistemom in tumorskim tkivom

Razvoj tumorskega tkiva je torej povezan z nenormalno proliferacijo celic, ki je posledica izgube ali spremembe regulacije celične rasti. Zaradi mutacij določenih genov, ki jih lahko povzročijo kemični ali fizikalni dejavniki, ki tako izzovejo povečano izražanje onkogenov ali zmanjšano izražanje tumor supresorskih genov, ki so zadolženi za nadzor celične rasti. Kancerogene mutacije pa lahko povzročijo tudi nekateri virusi. Teoretično naj bi se rakovo obolenje pričelo z eno samo mutirano celico, ki se lahko nenadzorovano deli, zato naj bi bile vse tumorske celice potomke iste celice. Zaradi genomske nestabilnosti rakavih celic je verjetnost mutacij velika. Med njimi se pojavijo razlike, zato je njihova populacija navadno precej heterogena. Nekatere tumorske celice na svojih površinah izražajo

spremenjene proteine, ki nastanejo po transkripciji spremenjene genske informacije. Običajno je to posledica točkovnih mutacij, možne pa so tudi delecije in insercije daljših genskih zaporedij. Lahko nastanejo tudi fuzijski proteini, ki so rezultat kromosomskih translokacij. Takšne antigene izkazujejo izključno tumorske celice, zato jih imenujemo tudi za tumorje specifični antigeni. Poznamo tudi s tumorji povezane antigene, ki se v svoji strukturi bistveno ne razlikujejo od telesu lastnih, so pa na tumorskih celicah prisotni v veliko večjem številu kot na normalnih celicah. Tumorske celice lahko na svojih površinah izražajo tudi proteine, ki nastanejo zaradi transkripcije sicer neizraženih genov ali pa takšnih, ki izhajajo iz genoma onkogenih virusov. Prav tako se lahko močno zmanjša njihovo izražanje sicer običajno prisotnih površinskih molekul. Nekatere tumorske celice se dediferencirajo in zato lahko izražajo proteine, ki so navadno prisotni le v nediferenciranih zarodnih celicah. Ker so te molekule izražene na različnih celicah zarodkov, jih imenujemo onkofetalni antigeni. Ti se v odraslih posameznikih sicer izražajo v določenih tkivih, vendar pa v bistveno manjšem obsegu. Onkofetalni antigeni sicer ne inducirajo imunskega odziva, se pa uporablajo kot diagnostični/prognostični označevalci prisotnosti tumorjev. Spremenjene antigenske lastnosti tumorskih celic torej omogočajo imunskemu sistemu razlikovanje med lastnimi zdravimi in transformiranimi celicami ter s tem možnost nastanka usmerjenega specifičnega protitumorskoga napada efektorskih imunskeih celic. Včasih je razlikovanje med lastnimi in modificiranimi antigeni oteženo, saj so tumorske celice kljub vsemu telesu lastne, zato so razlike med njimi majhne [2]. Teoretično bi seveda lahko imunski sistem kljub temu obvaroval gostitelja pred razvojem tumorskega tkiva. Vendar pa so se tumorske celice pogosto zmožne obraniti pred protitumorskim imunskim odzivom. Mehanizmi, s katerimi se lahko izognejo imunskim odzivom so, tako kot tumorske celice, precej raznoliki. V procesu imunske selekcije se imunski sistem oblikuje tako, da se odzove na antigenske značilnosti, ki jih izkazujejo tumorske celice. Celice, proti katerim se imunski sistem pravilno odzove, postanejo tarča in žrtve imunskega napada. Ker pa so tumorske celice zaradi pospešene delitve in večje genomske nestabilnosti dovezetnejše za nadaljnje mutacije, nekatere med njimi mutirajo tako, da izražajo manjše količine antigenskih determinant, zato efektorske imunske celice teh tarč ne zaznajo več kot tuje in jih ne napadajo. Posledično imajo te tumorske celice prednost pred drugimi malignimi celicami, ki imunogene antigene še izražajo, zato se njihov delež v populaciji znatno poveča. V primeru uporabe imunske modulacije s protitelesi, njihova vezava na površinske membranske antigene povzroči odstranitev le-teh

s površine celice. To se lahko zgodi zaradi endocitoze ali odluščenja teh kompleksov s površine tumorskih celic, kar pomeni, da postane taka celica nevidna za efektorske celice imunskega sistema [38].

Vezava protiteles na tumorske antigene pa sicer označi tumorske celice za lizo s celicami NK ali s sistemom komplementa, ki pa je v tumorskem okolju izrazito otežena. Vezava protiteles na tumorske antigene lahko povzroči tudi stimulacijo celične rasti, verjetno zaradi aktivacije signalne poti, ki je sklopljena z receptorji za celično proliferacijo.

Blokirajoči dejavniki imunskega odziva so topne molekule, ki so sposobne zavreti protitumorski imunski odziv (protivnetni citokini npr. IL-10, TGF- β , določeni kemokini in rastni dejavniki). Poleg tega tumorsko mikrookolje, ki preprečuje protitumorsko delovanje imunskega sistema, oblikujejo tudi mieloidne supresorske celice, in sicer s proizvodnjo encimov arginaze, inducibilne sintetaze dušikovega oksida (iNOS) in ciklooksigenaze 2 (COX2), protivnetnih citokinov IL-10 in TGF- β ter tako, da reducirajo Treg [39].

1.2.3 Vzdrževanje imunosupresivnega mikrookolja v tumorjih

Protivnetno sistemsко okolje oz. sistemska imunosupresija je pogost pojav pri bolnikih z rakom. To je neposredna ali posredna posledica delovanja protivnetnih inhibitornih citokinov in drugih biogenih dejavnikov, ki jih proizvajajo tumorske in med njimi prisotne druge vrste celic. Protitumorno delovanje imunskega sistema je zato okrnjeno ali povsem zatrženo. Delovanje dejavnikov, ki zavirajo ali negativno modulirajo protitumorski imunski odziv, je zelo učinkovito lokalno, torej omejeno na mikrookolje tumorskega tkiva.

Celice, ki se nahajajo v tumorskem tkivu in ne izvirajo iz transformiranih rakavih celic, so celice imunskega sistema in novonastalega žilja. Tudi te v neustreznem mikrookolju pomembno vplivajo na razvoj in širjenje tumorskih celic, saj pospešujejo neovaskularizacijo tumorjev in izločajo citokine ter druge biogene dejavnike, ki omogočajo s strani imunskega sistema neovirano proliferacijo transformiranih celic in njihov razvoj. Imunske celice, ki se nahajajo v tumorskih tkivih so limfociti, celice NK, makrofagi, dendritične celice, eozinofilci, mastociti ter nezrele in supresivne celice mieloičnega izvora. Pri rakavih obolenjih se torej protitumorski imunski odziv razvije, a je zaradi neugodnih razmer, ki jih pogojuje tumorsko tkivo, neuspešen pri njegovem zaviranju in uničevanju [40].

1.2.4 Regulatorni limfociti T (Treg)

Znotraj CD4⁺ in CD8⁺ limfocitov T poznamo številne celične podvrste (Preglednica I). Med njimi so naivne celice, ki še niso prišle v stik z antigenom, spominske, aktivirane oziroma efektorske pa tudi supresorske oz. regulatorne celice T. Slednje imajo imunske odzive tako v fizioloških kot patofizioloških pogojih, zato so vedno pogosteje tarča številnih raziskav. Naravne celice Treg nastanejo pri ljudeh po rojstvu med dozorevanjem limfocitov T v priželjcu in pri odraslem človeku predstavljajo le 5-10 % vseh CD4⁺ limfocitov T [7, 8, 9, 10]. Ob izplavitvi iz timusa v periferijo je repertoar njihovih TCR usmerjen v prepoznavanje organizmu lastnih antigenov. Njihovo proliferacijo omogoča specifično prepoznavanje lastnih antigenov ob hkratni interakciji ko-stimulatornih molekul CD28 z molekulami CD80 in CD86 na APC v prisotnosti interlevkina 2 (IL-2) [11, 12]. Celice Treg izražajo razne površinske molekule kot so: CD62L (L-selektin), CTLA-4 (ang. Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4) ter GITR (ang. Glucocorticoid-Induced Tumour-Necrosis factor Receptor-related protein). Zanje je značilen specifični jedrni transkripcijski dejavnik Foxp3, ki je ključnega pomena za njihovo imunosupresorsko delovanje, saj vpliva na razvojno diferenciacijo celic Treg, tako v priželjcu kot na periferiji [13]. V miših, ki so jim odstranili gen za Foxp3, je prišlo do drastičnega upada celic Treg in posledično do hitrega razvoja hude oblike limfoproliferativnega avtoimunskega sindroma. Podobno bolezensko stanje razvijejo tudi posamezniki, ki trpijo za redko recessivno genetsko motnjo, imenovano IPEX (ang. Immunodysregulation, Polyendocrinopathy and Enteropathy, X-linked syndrome). Bolezenski znaki se pri tovrstnih bolnikih kažejo v zelo agresivnem razvoju avtoimunskih obolenj, katerih posledica je zgodnja smrt. Gre za posledico različnih mutacij v genu za Foxp3 [14]. Mehanizem delovanja limfocitov Treg naj bi bil v veliki meri odvisen od sočasnih tesnih medceličnih stikov med APC, Treg in avtoreaktivnimi limfociti T, poleg tega pa tudi od sposobnosti Treg, da proizvajajo in izločajo topne imunosupresivne molekule. Danes vemo, da sta za zaviranje imunskih odzivov, s strani Treg, odgovorna predvsem CTLA-4 in površinsko vezani transformirajoči rastni dejavnik beta (TGF-β) [14, 41].

S poskusi na miših so potrdili pomembno vlogo limfocitov T v imunskega nadzoru tumorskih tkiv. Ugotovili so, da limfociti T, ki infiltrirajo tumorska tkiva, zavirajo njihovo proliferacijo. Zvišani nivoji CD3 mRNA v tumorskih tkivih pa so povezani z boljšimi izidi zdravljenja. Molekulski kompleks CD3 (ang. Cluster Of Differentiation) je tipična signalna komponenta kompleksa TCR. Vloga regulatornih limfocitov T (Treg) je nasprotna vlogi

efektorskih celic T, saj prvi nadzorujejo odziv slednjih in posredujejo imunsko toleranco oz. neaktivnost, kar pomeni, da imunski sistem prizanese določenim specifičnim antigenom in proti njim ne sproži odziva. Celice Treg na svoji površini izražajo molekule CD3, CD4, receptor za IL-2 CD25, v notranjosti pa FOXP3. Povečano število regulatornih limfocitov T CD4⁺CD25⁺ naj bi olajšalo razrast tumorjev. To potrjujejo poročila različnih raziskav, saj so v vzorcih tumorjev jeter, želodca in požiralnika ugotovili njihovo zvišano število [42, 43]. Prav tako so poročali o povezavi med nižjim številom CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ celic v tumorskih tkivih in boljšimi izidi zdravljenja raka na jajčnikih ter manjšim tveganjem za ponovitev prvostopenjskih pljučnih rakov [15]. Raziskave so pokazale tudi, da odstranitev CD25⁺ celic statistično značilno izboljša protitumorski imunski odziv. Regulatorni limfociti T proizvajajo in izločajo večje količine transformirajočega rastnega dejavnika beta (TGF-β; ang. Transforming Growth Factor β) in interlevkina 10 (IL-10), ki sta oba močna protivnetna citokina, sposobna posredovati imunosupresivne učinke na druge imunske celice. Na svojih površinah izražajo tudi heterotrimerni receptorski kompleks CD25/CD122/CD132, ki predstavlja visokoafinitetni receptor za IL-2, citokin, ki je pomemben provnetni/protitumorski dejavnik, in sicer v primerjavi z nizkoafinitetnim dimernim kompleksom CD25/CD122, ki je prisoten na drugih limfocitih T. Ti receptorji lahko delujejo kot ponori za IL-2 v tumorskih tkivih in tako učinkovito zmanjšujejo njegovo vnetno protitumorsko učinkovanje. Celice Treg izražajo tudi površinske molekule kot so proteini programirane celične smrti 1 (PD-1; ang. Programmed Cell Death Protein 1) in receptorje iz družine tumorje-nekrotizirajočih dejavnikov GITR (ang. Glucocorticoid-Induced TNFR-Related Protein), ki se oboji aktivirajo po vezavi z njihovimi ligandi, izraženimi na APC, PD-1-L in GITR-L, s čimer prispevajo k ohranjanju in širitvi imunosupresivnega oz. imunotolerogenega tumorskega mikrookolja. Protitelesa, ki se vežejo na CTLA-4 (ang. Citotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4) in PD-1 so v raziskavah na miših in ljudeh pokazala moč ojačitve samega imunskega odziva proti tumorjem in nazadovanje bolezni.

Ker tudi aktivirani efektorski limfociti T izražajo molekule, ki se nahajajo na in v Treg, je natančna kvantifikacija slednjih precej otežena in posledično nemogoča z uporabo klasičnih analiznih metod. Prav zaradi nizke specifičnosti označevalcev ter težav, ki so povezane z izolacijo in vrednotenjem mRNA, izvedbo imunohistokemičnih metod in pretočne citometrije, si objavljeni podatki na tem področju precej nasprotujejo. Analize izražanja specifične mRNA v tumorskem tkivu ne moremo povezati s številom

proučevanih celic, saj je to odvisno le od obsega transkripcije. Uporaba potenciometrije je v primeru trdnih tkiv precej zahtevnejša, saj je potrebna disociacija celic v suspenzijo. Imunohistokemične analize, ki temeljijo na vezavi specifičnih protiteles na njihove antigenske ligande, pa so zgolj semikvantitativne in jih ne moremo povezati s številom celic, ampak le z izražanjem antigenskih determinant na njihovi površini. Analiza metilacijskih vzorcev DNA pa nam omogoča tudi kvantitativno določitev posameznih vrst celic. Vsaka celica namreč vsebuje dve kopiji zapisa DNA, zato je to število kopij neposredno povezano s številom celic. Vse celice posameznega organizma namreč vsebujejo identičen zapis DNA, ki pa se med različnimi vrstami celic ločijo na epigenetskem nivoju. Epigenetika pomembno vpliva na izražanje genov, s tem pa na diferenciacijo celic in številnih drugih procesov.

Vemo, da ima imunski sistem v razvoju tumorskega tkiva pomembno vlogo, pri čemer pa prispevki posameznih imunskeih celic in njihovih mehanizmov k vzdrževanju tumorskega mikrookolja še niso povsem razjasnjeni. Prav tako ni vedno povsem jasno, kakšne vplive imajo tumorske celice na celice imunskega sistema v cilju, da se izognejo učinkovitemu imunskemu odzivu. Veliko vprašanj na področju protitumorskega imunskega odziva ostaja nepojasnjениh predvsem zaradi kompleksnosti medsebojnih vplivov različnih celic in njihove heterogenosti. Deloma je to tudi posledica pomanjkanja zanesljivih metod za specifično opredeljevanje vrste in števila celic v trdnih tumorjih. Z raziskavami so ugotovili, da so epigenetski označevalci lahko zelo uporabni za določanje prisotnosti in ugotavljanje deležev posameznih vrst celic. Primer takšnega epigenetskega označevalca je specifično gensko področje TSDR (ang. Treg Specificaly Demethylated Region) znotraj gena FOXP3. Samo za Treg je namreč značilen točno določen metilacijski vzorec, ki omogoča specifično določevanje te podvrste limfocitov, kar z drugimi metodami ni vedno mogoče.

Preglednica I: Podvrste CD4⁺ in CD8⁺ regulatornih limfocitov T [16].

Celični tip	Mesto izvora	Predlagan mehanizem supresije
CD4 ⁺ celice T CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ Celice Treg	Priželjc	<i>In vitro</i> : celični kontakt <i>In vivo</i> : različni mehanizmi delovanja
CD4 ⁺ IL-10 ⁺ FOXP3 ⁻	Periferija	IL-10, TGF-β

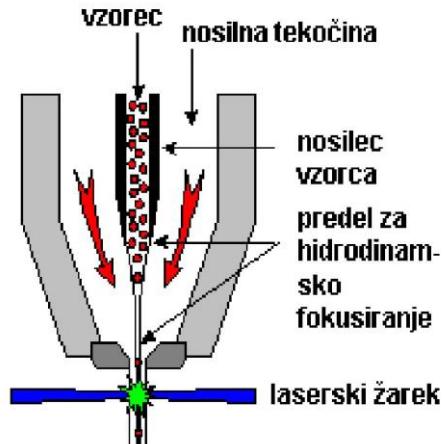
Celice Tr1		(ne nastane v vseh primerih)
CD4 ⁺ TGFb ⁺ Celice Th3	Periferija	TGF- β
CD8⁺ celice T		
CD8 ⁺ CD25 ⁺ celice T	Priželjc	TGF- β in CTLA-4
CD8 ⁺ CD28 ⁻ celice Ts	Periferija	ILT3, ILT4
CD8 ⁺ CD62 ⁺ CD122 ⁺ celice T	Ni definirano	Ni definirano
CD8 ⁺ IL-10 ⁺ celice T	Periferija	IL-10

1.3 Določanje deleža naravnih FOXP3⁺ regulatornih limfocitov T (Treg)

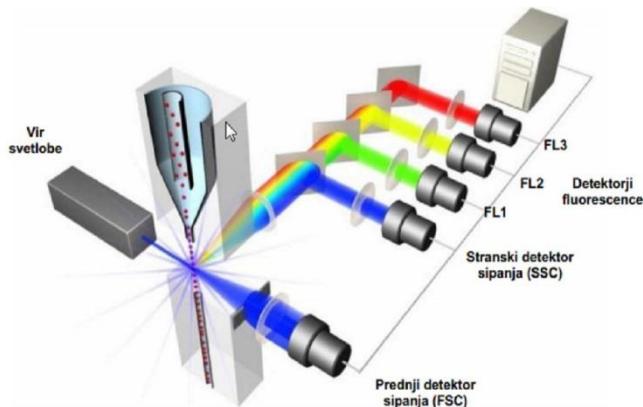
1.3.1 Pretočna citometrija in s fluorescenco aktivirano celično ločevanje FACS (ang. Fluorescence-Activated Cell Sorting)

V večceličnih organizmih se celice med seboj razlikujejo v proteinih, ki jih izražajo, zato jih lahko ločimo glede na njihove fenotipske lastnosti. Pretočna citometrija je metoda, s katero lahko določamo, koliko celic izraža določene proteine in v kakšnem obsegu. Pomemben del te metode je hidrodinamsko fokusiranje, ki celice v suspenziji razvrsti eno za drugo v stekleni kapilari in tako omogoči, da le-te skozi mesto interakcije z laserskim žarkom prehajajo posamično. Celično suspenzijo najprej injiciramo v nosilno tekočino, ki z visoko hitrostjo potuje skozi šobo. Ta vibrira z optimalno frekvenco, tako da se na določeni razdalji od nje tvorijo kapljice (Slika 3). Ko celice ena za drugo v nosilni tekočini pridejo v kapilaro, skozi tok curka posvetimo z lasersko svetlobo. Del te se zaradi prisotnosti celic razprši in na podlagi merjenja razpršene svetlobe na fotopomnoževalki lahko določimo njihovo število in velikost. Stransko sisanje svetlobe ali SSC (ang. Side Scatter Count) nam daje informacijo o notranji granuliranosti posameznih vrst celic, na podlagi česar jih lahko ločimo med seboj. Prednje sisanje svetlobe ali FSC (ang. Forward Scatter Count) pa nam služi za določanje števila in velikosti posameznih vrst celic. Kadar želimo ločiti med posameznimi vrstami celic, lahko to storimo tako, da jih označimo s specifičnimi protitelesi, označenimi z različnimi fluorokromi. To so fluorescenčna barvila, ki absorbirajo lasersko svetlobo določenih valovnih dolžin, nato pa oddajo svetlobo drugih valovnih dolžin. Emitirano svetlobo zazna fotopomnoževalka ali vrstni detektor svetlobe. Z

obdelavo podatkov o razpršenosti svetlobe in fluorescenci lahko računalnik v aparaturi za FACS določi katere vrste celic se bodo ločevale od drugih in zbirale (Slika 4).



Slika 3: Shematski prikaz pretočne celice, ki omogoča hidrodinamsko fokusiranje celic; pritejeno po [44].



Slika 4: Shematski prikaz ključnih sestavnih delov pretočnega citometra; pritejeno po [45].

S pretočno citometrijo lahko določimo delež Treg bodisi z znotrajceličnim fluorescenčnim označevanjem FOXP3 ali pa z uporabo specifičnih fluorescenčno označenih protiteles, ki prepoznavajo površinske molekule CD4 (koreceptor za TCR), CD25 (receptor za interlevkin - IL-2) in CD127 (receptor za interlevkin 7 - IL-7). Pri tem se osredotočamo na analizo celic z naslednjim tipičnim vzorcem fluorescence; $CD4^{++}CD25^{++}CD127^{\text{nizko}}$.

1.3.2 Epigenetika

Izraz epigenetika je leta 1942 prvi uporabil Conrad Hal Waddington in z njim opisal mehanizme, ki naj bi bili nad samo genetiko (grška beseda *epi-*, pomeni *nad nečim* oz. *nekje drugje*). Epigenetika je veda, ki preučuje podedovane značilnosti aktivnosti genov, ki niso posledica razlik v nukleotidnem zaporedju DNA. Torej bi si ta pojem lahko razlagali kot dedovanje nečesa, kar ni odvisno od zaporedja DNA. Epigenetika torej preučuje razlike v izražanju genov, ki jih povzročijo kemijske modifikacije določenih baznih parov v molekuli DNA. Epigenetske spremembe lahko pomembno vplivajo na aktivacijo določenih genov, pri čemer pa ne spreminjajo nukleotidnega zaporedja DNA. Tovrstne modifikacije se ohranijo tudi med celično delitvijo [46,47]. Do večine le-teh pride tekom življenskega cikla posameznega organizma. V primeru, da se genska inaktivacija zgodi v spermiju ali jajčni celici in pride nato do oploditve, se epigenetska sprememba prenese na naslednjo generacijo [17]. To spoznanje poraja vprašanje o tem, ali lahko epigenetske spremembe vendarle povzročijo tudi spremembe v osnovni strukturi molekule DNA.

Epigenetski mehanizmi so vpleteni v številne procese, med katerimi so najpomembnejši: izražanje genov, kromosomska stabilnost/nestabilnost, celična diferenciacija, vtisnjene (ang. imprinting), inaktivacija kromosoma X, karcinogeneza in staranje. Več vrst dedovanja epigenetskih sistemov lahko igra vlogo v celičnem spominu [18]. Zelo dobro so preučili epigenetski vpliv hrane na podgane, ki so uživale različne diete [19]. Nekatere snovi v prehrani namreč lahko na epigenetski način povečajo koncentracije popravljalnih encimov DNA, kot sta popravljala encima naravno prisotnih mutagenih poškodb DNA-MGMT (ang. O⁶-methylguanine DNA methyltransferase) in MLH1 (ang. MutL Homolog 1) ter tumor supresorski protein p53 [20, 21, 22].

1.3.3 Metilacija DNA

Metilacija je proces prenosa metilne skupine z ene kemijske komponente na drugo, omogočajo jo specifični encimi. Prenos metilne skupine je pomemben za ohranjanje številnih biokemijskih reakcij, kot so npr. sinteza DNA in RNA, tvorba kreatinina, odziv imunskega sistema na okužbo z virusi, ipd. Metilacija DNA je tudi pomemben epigenetski dejavnik, ki nadzoruje izražanje genov. Je eden od najpogostejših načinov kemijskih sprememb DNA in je prisotna v genomih različnih organizmov, tako prokariontov kot evkariontov. Pri prvih metilacija DNA poteče na citozinskih in adeninskih bazah.

Restriktivno modifikacijski sistem vsebuje DNA metilaze, ki ščitijo gostiteljsko zaporedje DNA pred razgradnjo z njihovimi restriktivnimi encimi, ki cepijo intaktno tujo DNA. V primeru citozina se metilacija DNA pojavi na mestu C-5 ali N-4, v primeru adenina pa na mestu N-6 [48]. Vse metilaze uporabljajo kot donor metilne skupine kofaktor S-adenozil metionin (SAM). Pri večceličnih evkariontih pa je metilacija verjetno omejena samo na citozinske baze [49]. Kot smo že omenili metilacija DNA prepreči izražanje genov. Poznamo dve vrsti metilacije DNA, prva je vzdrževalna, ki skrbi, da je tudi hčerinska DNA po podvojevanju pravilno metilirana, druga pa je metilacija *de novo*, ki se zgodi na popolnoma novih predelih genoma kot odziv na okoljske dražljaje. Pogosto pri utišanju genov opazimo interakcijo med metilacijo DNA, histonskimi deacetilazami in kompleksi proteinov remodelacije, saj sama metilacija ni dovolj za popolno inaktivacijo genov. S poskusi so dokazali, da metilacija DNA poskrbi predvsem za to, da utišani geni tudi ostanejo taki. Potrebna je tudi za vtisnjene (ang. imprinting) genov. Tako označeni geni imajo metiliran samo en alel (prepisovanje gena poteka le z enega alela), saj bi v nasprotnem primeru lahko prišlo do poškodbe organizma. Metilacija lahko povzroči, da se posamezen gen prepisuje npr. le z materinega kromosoma, drugi pa le z očetovega. Metilacija je tudi del celičnega spomina. Po oploditvi se metilacijski vzorec prenese v zigoto, a se po 5 dneh popolnoma izbriše, kasneje pa ponovno vzpostavi in se ohranja med podvojevanjem DNA. Pri sesalcih je metilacija DNA izjemno pomembna, saj njena izguba vodi v ustavitev rasti ali apoptoze v zdravih in rakavih celicah [50]. Nujno je potrebna tudi za normalen embriološki razvoj. Ključna vloga metilacije DNA je nadzorovanje izražanja genov, in sicer tako, da so metilacijska mesta v DNA zavrti. Metilacija DNA torej igra ključno vlogo v nadzorovanju celičnih procesov, vključno z embrionalnim razvojem, transkripcijo, deaktivacijo kromosoma X in genskim vtisnjanjem [51].

2 NAMEN DELA

V okviru magistrske naloge bomo s pomočjo tehnologije rekombinantne DNA pripravili standardne reagente za specifično epigenetsko določanje deleža regulatornih limfocitov T (Treg) znotraj celotne količine CD3⁺ celic T. Pri tem bomo izkoristili epigenetski vzorec metilacije specifičnih področij v genih za FOXP3 in CD3. Test, ki temelji na uporabi

plazmidov, bomo preizkusili na manjšem številu vzorcev DNA zdravih oseb in bolnikov z rakom. Pričakujemo, da bodo imeli bolniki večje deleže celic Treg kot zdravi posamezniki.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Plazmidni standardi

S pomočjo tehnologije rekombinantne DNA smo izdelali 2 standardna plazmida. Plazmid je majhna molekula DNA, ki je fizično ločena od kromosomske DNA in se lahko neodvisno od nje replicira v celici. Plazmide najpogosteje najdemo v obliki majhnih okroglih dvoverižnih molekul DNA v bakterijah. Vsebujejo gene, ki jim pomagajo pri preživetju (npr. geni za odpornost na antibiotike). Ti se pogosto prenašajo iz ene bakterije v drugo oz. iz ene vrste bakterij v drugo, kar s pridom izkoriščamo pri rekombinantni tehnologiji. Tako pogosto uporabljamо umetne plazmide kot vektorje za molekulsko kloniranje po vnosu sekvence rekombinantne DNA v organizem gostitelja s procesom transfekcije.

Plazmidni vektorji imajo naslednje osnovne lastnosti:

- mesto ORI (ang. Origin of Replication), ki označuje mesto začetka podvojevanja;
- mesto MCS (ang. Multiple Cloning Site) imenovano tudi poliklonsko mesto, ki vsebuje zapise za številne restriktijske encime;
- mesto za rezistenco, npr. Amp^r, ki vsebuje zapis za encim, ki razgradi ampicilin X);
- sposobni so avtonomnega pomnoževanja;
- ne smejo biti preveliki, da jih lahko ločimo od kromosomske DNA.

Pri našem delu smo plazmide uporabili za izdelavo referenčnega reakcijskega materiala. Izdelali smo plazmid pGOV4 in vanj vgradili zaporedja obeh genov, ki smo ju preučevali, torej FOXP3 in CD3 ter zaporedje kontrolnega gena GAPDH. Izdelali smo 2 plazmida, od katerih smo v zaporedju drugega, na mestih kjer so bila v prvem zaporedja CG, nukleotid C (citozin) zamenjali s T (timin). Prvega smo poimenovali plazmid CpG, drugega pa plazmid TpG (Preglednica II).

Preglednica II: Nukleotidni zaporedji vstavljeni v plazmid pGOV4, s katerimi smo pripravili plazmida CpG in TpG.

Plazmid	Nukleotidno zaporedje [5'→3']	Dolžina (bp)
Plazmid CpG	GCGGCCGCCCTAAACACTACCACATCTCAAAACCCCTTAAA AAAAACCATCAACCCCATAACACAAACCATAACAACTAAA TTTCTGATCGTTTGATTGTTAGATTTTTGTTATTGAT GTTATGGTGGTTGGATGTGTTGGGTTTATTGATATTATGG AGGAAGAGAAGAGGGCTCGACGGTTTGGTATTGTAGGTTT TGGGATGTTAGTGTGTTAGTGGGTGTATTTGTTGGATGTT GTGTTGTGGTAGAGTGGTTATGTTGTAATTGG	284
Plazmid TpG	GCGGCCGCCCTAAACACTACCACATCTCGAAACCCCTTAAA AAAAACCGTCGACCCCATAACCGCAAACCGTAACAACAACTAAA TTTCTGATCGTTTCGATTGTTAGATTTTTCGTTATTGAC GTTATGGCGGTGGATGCGTCGGTTTATCGATATTACGG AGGAAGAGAAGAGGGCTCGACGGTTTGGTATTGTAGGTTT TGGGATGTTAGTGTGTTAGTGGGTGTATTTGTTGGATGTT GTGTTGTGGTAGAGTGGTTATGTTGTAATTGG	284

3.2 Oligonukleotidni začetniki

Za opredelitev izražanja genov FOXP3, CD3 in GAPDH smo uporabili metodo qPCR. Za vsako preučevano gensko regijo smo razvili svoj sistem qPCR, ki je selektivno prepozna matrico TpG in drugega, ki je prepozna izključno matrico CpG. Kot standard za količinsko ovrednotenje števila kopij posameznih genov oziroma njihovo kvantifikacijo, smo uporabili plazmida za oba genska lokusa (FOXP3 in CD3), in sicer v variantah s TpG in CpG. Zato smo morali za vsak preučevani gen pripraviti različne oligonukleotidne začetnike. Skonstruirali smo 10 različnih oligonukleotidnih začetnikov, in sicer: za gen FOXP3 2 istosmerne (CpG in TpG) in 2 protismerna (CpG in TpG); za gen CD3 prav tako 2 istosmerne (CpG in TpG) in 2 protismerna (CpG in TpG) ter za gen GAPDH 1 istosmerni (TpG) in 1 protismerni (TpG) (Preglednica III).

Preglednica III: Lastnosti uporabljenih oligonukleotidnih začetnikov (Sigma-Aldrich, Nemčija).

Oligonukleotidni začetniki	Sekvenca	Število baz
FOXP3_CpG_F_RT	5` GTTTTCGATTTGTTAGATTTTCGTT	28
FOXP3_CpG_R_RT	5` CCTCTTCTCTCCTCCGTGGTGTGCG	25
FOXP3_TpG_F_RT	5` GTTTTGATTGTTAGATTTTTGTT	28
FOXP3_TpG_R_RT	5` CCTCTTCTCTCCTCCATGGTGTCA	25
CD3_CpG_F_RT	5` CTAAACACTACCACATCTCGA	21
CD3_CpG_R_RT	5` AAATTAGTTGTTACGGTTGC	22
CD3_TpG_F_RT	5` CCTAAACACTACCACATCTCAA	22
CD3_TpG_R_RT	5` AGAAATTAGTTGTTATGGTTGT	24
GAPDH_TpG_F_RT	5` GGTTTTGGTATTGTAGGTTT	22
GAPDH_TpG_R_RT	5` CCAATTACAACATAACAAACCA	21

3.3 Ostali reagenti in oprema

3.3.1 Reagenti:

- Avtoklavirana ultra čista voda
- SYBR® Select Master Mix (Thermo Fisher Scientific, ZDA)
- Oligonukleotidni začetniki (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Plazmid CpG in plazmid TpG
- Agaroza - Agarose for rutine use (Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Nemčija)
- Pufer TAE (Tris-acetat in EDTA), redčen 1:50
- Barvilo Sybr safe DNA gel stain (Invitrogen, ZDA)
- Produceti PCR
- Nanašalni pufer (ksilencianol, Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Označevalec velikosti DNA - PCR Markers G316A z odseki velikosti: 50, 150, 300, 500, 700 in 1000 bp (Promega Corp., ZDA)
- Pribor za bisulfitno pretvorbo - EpiTect Fast Bisulfite Conversion Kit (QIAGEN, Nemčija)

3.3.2 Aparature in pribor:

- Avtoklav (Kambič laboratorijska oprema, Slovenija)
- Ciklični termostat C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, ZDA)
- Delovna komora za PCR - DNA/RNA UV-Cleaner UVC/T-M-AR (Biosan, Latvija)
- Mikrocentrifuga Combi-Spin FVL-2400N (Biosan, Latvija)
- Polavtomatske pipete: 0,1-2,5 µL, 0,5-10 µL, 2-20 µL in 20-200 µL (Eppendorf, Nemčija)
- Avtoklavirani nastavki za polavtomatske pipete (Sarstedt, Nemčija)
- Avtoklavirane 0,2 in 1,5 mL epruvete s pokrovčki (Sarstedt, Nemčija)
- Brezprašne rokavice Safeskin PFE (Kimberly-Clark)
- Elektronska tehnicka EW Precision balance (Kern & Sohn GmbH, Nemčija)
- Mikrovalovna pečica
- Kadička za elektroforezo Wide mini-sub cell gt (Bio-Rad, ZDA)
- Vir napetosti - Power pac basic 300 v/400 ma/75 w (Bio-Rad, ZDA)
- Komora z UV svetlobo - g:box (Syngene, Velika Britanija)
- Računalnik s programsko opremo Gene snap (Syngene, Velika Britanija)
- Kalup za agarozni gel - nosilec (10x15 cm) in 2 glavnička (vsak po 30 žepkov)
- Erlenmajerica s širokim vratom (250 ml)
- Merilni valj (100 ml)
- Urno steklo
- Brezprašne vijolične rokavice Purple Nitrile (Kimberly-Clark)
- Ciklični termostat - C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, ZDA)

3.4 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

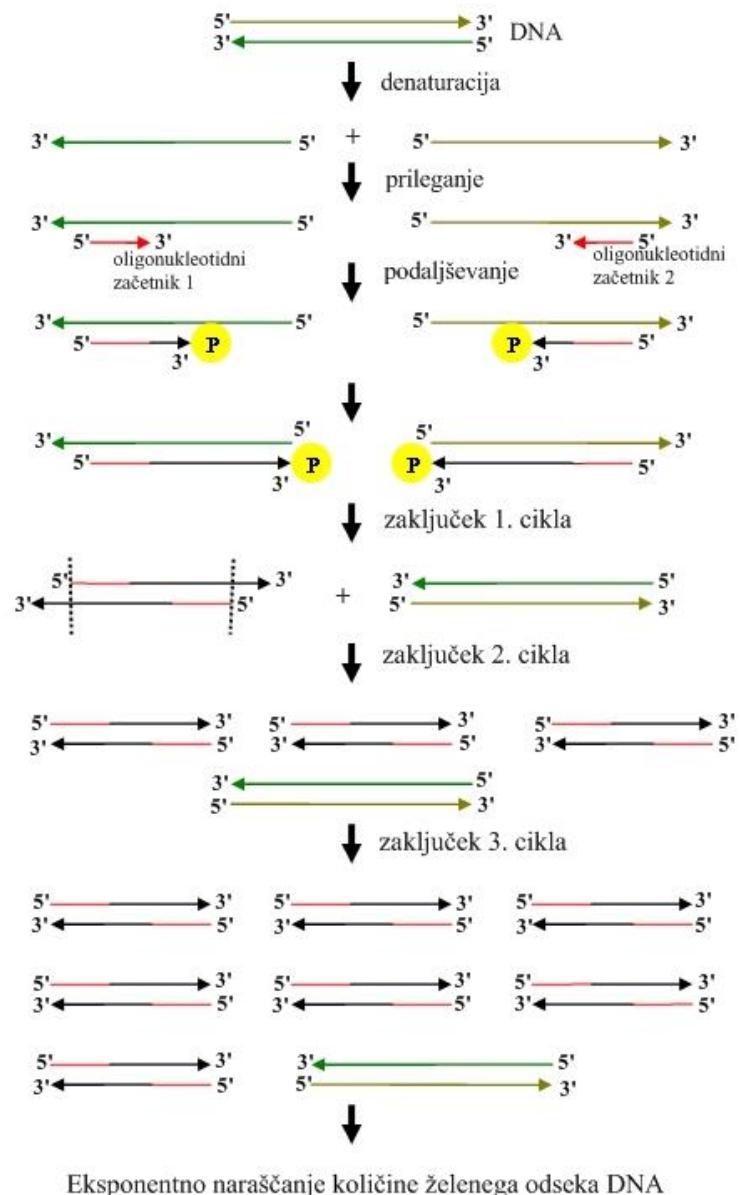
3.4.1 Princip in postopek verižne reakcije s polimerazo

Verižna reakcija s polimerazo DNA ali PCR (ang. Polymerase Chain Reaction) je molekularna biološka biokemijska metoda namenjena cikličnemu pomnoževanju želenih odsekov nukleinskih kislin v molekuli DNA. Tarčni odsek DNA najprej omejimo z vezavo dveh specifičnih oligonukleotidnih začetnikov. Pomnoževanje tako omejenega odseka DNA poteka tako, da oligonukleotidnima začetnikoma, ki sta komplementarna začetnemu

in končnemu delu izbranega predela DNA, ki ga želimo kopirati, dodamo posamične nukleotide (gradnike DNA), ustrezen pufer in encim, ki iz dodanih nukleotidov zgradi novo, komplementarno verigo DNA. Metoda PCR je postopek *in vitro*, ki je pogosto predstopenja številnih bioloških molekularnih metod. Reakcija poteka verižno v več ciklih, kar pomeni, da jo večkrat zapored ponovimo. Pri vsaki ponovitvi se število kopij pomnoževanega odseka podvoji. Tako lahko npr. po 20 ponovitvah reakcije dobimo iz 1 kopije DNA teroretično več kot 1×10^6 kopij. Po »n« ciklih PCR število kopij tako znaša 2^n . Vsak pomnoževalni cikel je sestavljen iz treh stopenj, ki so določene z različnimi temperaturami reakcij (Slika 5):

1. **Denaturacija:** matrična dvoverižna vijačnica se zaradi visoke temperature (~ 95 °C) razklene na dve komplementarni verigi DNA.
2. **Prileganje:** znižanje temperature na 40-60 °C povzroči prileganje oligonukleotidnih začetnikov na komplementarni zaporedji obeh enoverižnih delov matrične DNA. Uporabljena temperatura je ponavadi nekaj stopinj nižja od temperature tališča oligonukleotidnih začetnikov.
3. **Podaljševanje:** temperaturo zvišamo na optimalno vrednost za delovanje termostabilne polimeraze DNA (~ 72 °C). Encim zgradi novo komplementarno DNA v smeri 5'→3', ta pa nato služi kot matrica za nadaljnje pomnoževanje.

Pogoje reakcije spremojamo glede na to katera oligonukleotidna začetnika, matrično DNA in encim uporabimo (Preglednica IV). Poleg reakcijske zmesi za vzorce vedno pripravimo tudi negativno kontrolo, v kateri vzorčno DNA nadomestimo z ultračisto vodo. S pomočjo negativne kontrole lahko zaznamo morebitno kontaminacijo reagentov.



Slika 5: Potek reakcije PCR, (P = polimeraza); povzeto po [53].

Preglednica IV: Sestava reakcijske zmesi za reakcijo PCR.

Sestavina	Funkcija
Matrična DNA	Vsebuje odsek, ki ga pomnožujemo.
Dva oligonukleotidna začetnika	Označita začetek in konec odseka, ki ga želimo pomnožiti.
Polimeraza DNA	Encim, ki katalizira sintezo novih verig DNA.

Deoksiribonukleozid-trifosfati (dNTP)	Gradniki novo nastalih verig DNA (dATP, dTTP, dCTP, dGTP).
Pufer	Zagotavlja optimalne pogoje za delovanje encima.
MgCl ₂	Mg ²⁺ ioni so kofaktorji polimeraze DNA, vplivajo pa tudi na prileganje oligonukleotidnih začetnikov in specifičnost nastalega produkta.

3.4.2 Princip in postopek kvantitativne verižne reakcije s polimerazo (qPCR)

Kvantitativna PCR oziroma verižna reakcija s polimerazo v realnem času je nadgradnja standardne reakcije PCR. Prednost qPCR je sprotno kvantitativno spremjanje količine nastalega produkta v vsakem ciklu, bodisi z uporabo fluorescentnih barvil ali pa fluorescentno označenih sond. Tovrstni rezultati so na voljo hitreje in z manj variabilnostmi kot v primeru standardne reakcije PCR. V našem primeru smo uporabljali qPCR s fluorescentnim barvilm Sybr Green, ki potem, ko se interkalira v nastajajočo dvojno verigo DNA, med obsevanjem z določeno valovno dolžino laserske svetlobe fluorescira. Pri analizi podatkov je pomemben parameter takoimenovani cikel kvantifikacije (C_p). To je zaporedno število cikla, pri katerem fluorescenčni signal postane statistično značilno večji od tistega, ki ga odčitavamo, ko je fluorescensa še nezadostna. Količina kopij DNA, ki jo zaznamo po določenem ciklu pa je sorazmerna začetnemu številu kopij DNA v vzorcu. Večje kot je začetno število kopij v vzorcu, prej opazimo porast fluorescence. Z uporabo standardne krivulje pa lahko podatke, ki jih dobimo s qPCR, uporabimo za natančno določitev števila nastalih kopij tarčnega zaporedja v preiskovanem vzorcu. Standarno krivuljo izdelamo tako, da serijsko redčimo znane koncentracije tarčne matrične DNA, v našem primeru torej plazmidne DNA in jih nato pomnožujemo s qPCR. Logaritemske vrednosti izmerjenih koncentracij nato nanašamo na os x, medtem ko na os y nanašamo vrednosti C_p. S pomočjo standardne krivulje lahko določimo tudi koeficient korelacije, učinkovitost pomnoževanja in dinamično območje, to je koncentracijsko območje, v katerem je krivulja linearita.

3.4.3 Optimizacija pogojev verižne reakcije s polimerazo (PCR)

Na potek, specifičnost in izkoristek reakcije PCR vplivajo številni dejavniki. Optimizacijo postopka PCR lahko dosežemo na več načinov, in sicer s spremenjanjem sestave reakcijske

zmesi (pufer, dNTP, MgCl₂, začetni oligonukleotidi, polimeraza in matrična DNA), časa in temperature posameznih stopenj reakcije ter števila ciklov. Naše optimalne pogoje smo določili eksperimentalno, ob upoštevanju dolžine izbranih odsekov DNA ter lastnosti oligonukleotidnih začetnikov. Zelo pomembna je bila izbira slednjih, ki smo jih načrtovali tako, da smo preprečili njihovo morebitno nespecifično prileganje na enoverižno matrično DNA. Zaporedja oligonukleotidnih začetnikov morajo biti čim bolj nekomplementarna, saj bi se v nasprotnem primeru lahko tvorili dimeri. Pri njihovem načrtovanju smo upoštevali naslednja splošna pravila kot so:

- dolžina med 18 in 28 bp;
- skupna vsebnost baz G in C med 50 in 60 %;
- temperatura tališča (T_m) 50-80 °C;
- izogibanje tvorbi sekundarnih struktur kot so lasnice, navzkrižni dimeri, dimeri znotraj posameznega oligonukleotidnega začetnika;
- prisotnost največ 3 baz tipa G in C na 3' koncu, saj ti dve tvorita močnejše vezi kot T in A in zato lahko preprečita denaturacijo pri sicer ustrezni vrednosti T_m ;
- izogibanje zaporednim dinukleotidnim ponovitvam, npr. ATATATAT, ki lahko vodijo v tvorbo napačnih kopij.

3.5 Agarozna gelska elektroforeza (AGE)

Agarozna gelska elektroforeza je standardna metoda, ki jo uporabljamo za ločevanje, zaznavanje in čiščenje nukleinskih kislin na osnovi njihove molekulske mase. Temelji na potovanju nabitih delcev v agaroznem gelu pod vplivom enosmernega električnega toka. Ker so nukleinske kisline zaradi svojih fosfatnih skupin negativno nabite, se začno v električnem polju premikati proti pozitivno nabični anodi. Hitrost njihovega potovanja je odvisna od: velikosti DNA, njene oblike, koncentracije agaroze, napetosti električnega polja, sestave elektroforetskega pufra ter interkalirajočih barvil. Po končani elektroforezi smo molekule DNA v gelu detektirali z barvilm, ki se vrine med bazne pare DNA in fluorescira pri obsevanju z UV svetlobo. S to metodo smo torej preverjali uspešnost poteka reakcij PCR, in sicer: nastanek specifičnih produktov, njegovih okvirnih velikosti, specifičnost reakcij PCR ter okvirnih koncentracij pomnoženih fragmentov DNA.

3.5.1 Priprava 2 % agaroznega gela

V digestoriju smo pripravili kalup za izdelavo agaroznega gela. V podstavek, ki smo ga predhodno poravnali, smo pričvrstili nosilec za gel, iz hladilnika vzeli barvilo Sybr safe in ga, zaščitenega pred svetlobo, pustili v digestoriju, da se je ogrelo na sobno T. V erlenmajerico smo zatehtali 1,5 g agaroze, dodali 75 mL pufra 1xTAE (ang. Tris-acetate-EDTA) in vsebino dobro premešali. Erlenmajerico smo pokrili z urnim steklom in stehtali (določili taro). Vsebino smo v mikrovalovni pečici segreli do vrenja, jo vmes nekajkrat premešali in jo nato nekaj časa pustili rahlo vreti, vse dokler se agarosa ni popolnoma raztopila v pufru. Erlenmajerico smo nato ponovno stehtali in vanjo dodali ustrezeno količino destilirane vode, ki je med segrevanjem izhlapela. Raztopino smo postavili v digestorij in počakali, da se je ohladila na 60-70 °C. Nato smo ji dodali 3,0 µL barvila Sybr safe in jo dobro premešali. Obarvano raztopino smo vlili v nosilec za gel, na katerega smo pričvrstili dva glavnička, s pomočjo katerih smo naredili 30 žepkov. Po približno 30 minutah smo ju iz gela previdno odstranili in ga iz nosilca prenesli v datirano in podpisano plastično vrečko. Gel smo do uporabe shranili v hladilniku (4 °C).

3.5.2 Priprava vzorcev za AGE

Pripravljeni gel smo obrezali do primerne velikosti, glede na to, koliko vzorcev smo analizirali in ga položili v kadičko za elektroforezo, v kateri je bil elektroforezni pufer TAE. Vsakemu vzorcu (10 µL), poleg tega pa tudi označevalcu velikosti PCR Markers (7 µL), smo dodali po 2 µL nanašalnega pufra, ki je vseboval barvilo za lažji nanos na gel. Vzorce in označevalce velikosti smo nato nanesli na gel in si zabeležili njihove položaje.

3.5.3 Pogoji za izvedbo elektroforeze

Elektroforezno kadičko smo pokrili s pokrovom, jo priključili na vir enosmerne napetosti (U=100V) in pustili vključeno 20 minut.

3.5.4 Slikanje gela po elektroforezi

Po končani elektroforezi smo gel prenesli v komoro G:Box. S pomočjo ustrezne programske opreme (Gene Snap) smo gel fotografirali pod UV svetlobo, nato pa na digitalni fotografiji analizirali položaj in intenzivnost lis.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Optimizacija reakcij PCR

Pri optimizaciji pogojev reakcije PCR smo največ pozornosti posvetili izbiri optimalne temperature prileganja oligonukleotidnih začetnikov. To smo določili s pomočjo metode PCR, kjer smo stopnjo prileganja izvedli pri različnih temperaturah (Preglednici V in VI). Tako dobljene produkte PCR smo nato analizirali z agarozno gelsko elektroforezo (Sliki 6 in 7).

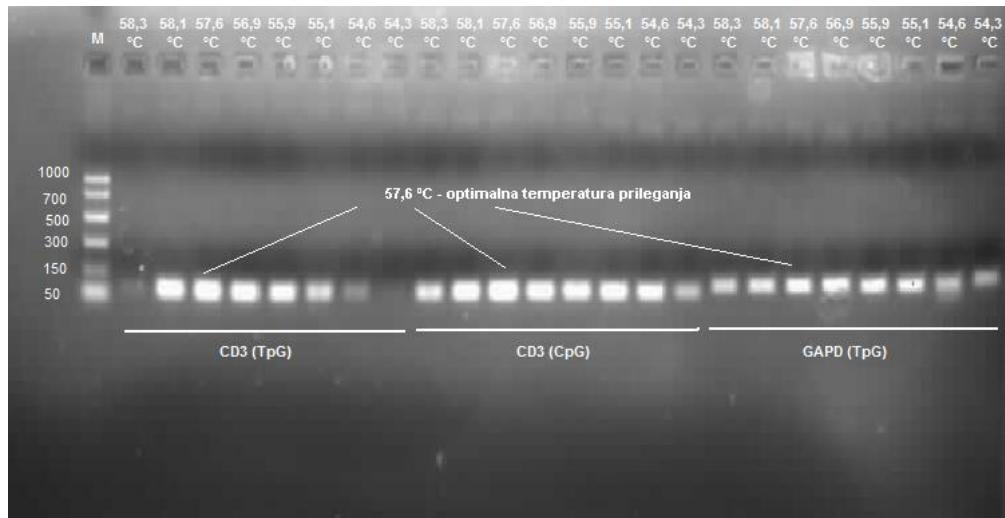
Preglednica V: Predstavitev temperaturnega programa optimizirane reakcije PCR za pomnoževanja genov CD3 in GAPDH.

Stopnja reakcije	CD3 in GAPDH		
	T (°C)	t (min)	Število ciklov
Začetna denaturacija	95,0	5:00	42
Denaturacija	95,0	0:15	
Prileganje oligonukleotidnih začetnikov	54,3 – 58,3	0:30	
Podaljševanje	72,0	0:30	
Končno podaljševanje	72,0	5:00	
Prekinitve reakcije	12,0	∞	

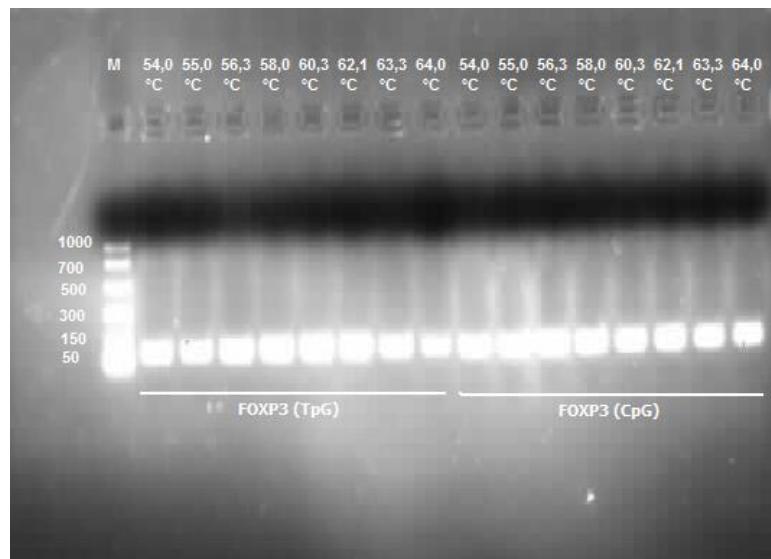
Preglednica VI: Predstavitev temperaturnega programa optimizirane reakcije PCR za pomnoževanja genov FOXP3.

Stopnja reakcije	FOXP3		
	T (°C)	t (min)	število ciklov
Začetna denaturacija	95,0	5:00	42
Denaturacija	95,0	0:15	
Prileganje oligonukleotidnih začetnikov	54,0 – 64,0	0:30	
Podaljševanje	72,0	0:30	
Končno podaljševanje	72,0	5:00	
Prekinitve reakcije	12,0	∞	

Prekinitve reakcije	12,0	∞	
---------------------	------	----------	--



Slika 6: Rezultat agarozne gelske elektroforeze - optimizacija reakcije PCR za gena CD3 in GAPDH.



Slika 7: Rezultat agarozne gelske elektroforeze - optimizacija reakcije PCR za gen FOXP3.

4.2 Priprava in redčenje plazmidnih standardov

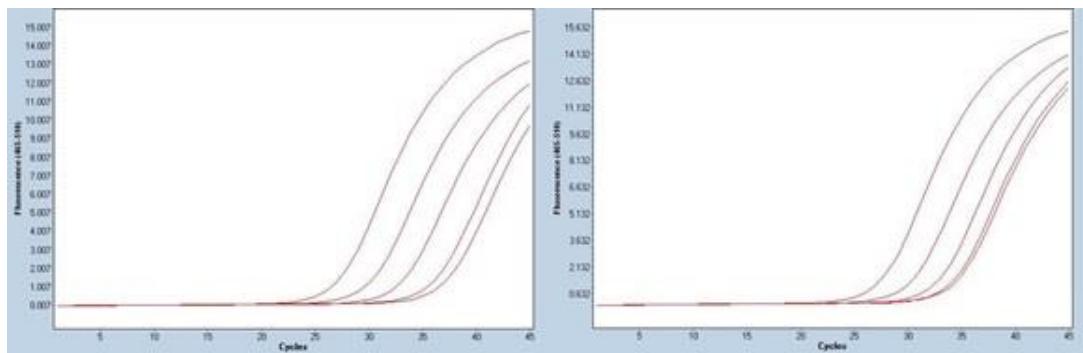
Ko smo od proizvajalca (Gene Oracle Inc., ZDA) dobili oba načrtovana plazmida (Preglednica VII), smo najprej izmerili njuni koncentraciji s pomočjo spektrofotometra (Nanodrop ND-1000, Thermo Scientific, ZDA) ter se nato lotili redčenja. Oba smo redčili tako, da smo dobili osnovno raztopino s po 12.500 molekulami DNA. To smo nato redčili še v štirih korakih, da smo pripravili redčitve s po 2.500, 500, 100 in 20 molekulami.

Preglednica VII: Lastnosti uporabljenih plazmidov CpG in TpG.

Plazmid CpG	Plazmid TpG
Število baznih parov: 3376 bp	Število baznih parov: 3376 bp
Molekulska masa: MW=2085834,4 g/mol	Molekulska masa: MW=2085820,4 g/mol
Koncentracija: c=21,8 ng/µl	Koncentracija: c=15,3 ng/µl
Množina: n=1,05x10 ⁻¹⁴	Množina n=7,34x10 ⁻¹⁵
Št. plazmidnih molekul: 6,324x10 ⁹	Št. plazmidnih molekul: 4,42x10 ⁹

Plazmid CpG smo najprej redčili 50,9-krat (5 µL raztopine plazmida CpG + 249,6 µL ultračiste vode), plazmid TpG pa 35,4-krat (5 µL raztopine plazmida TpG + 171,8 µL ultračiste vode). Tako smo pripravili raztopini s po 125.000.000 molekul vsakega od plazmidov, ki smo ju nadalje redčili 10-krat (100 µL + 900 µL ultračiste vode) in dobili zalogovni raztopini s po 12.500.000 molekulami. Del teh dveh raztopin smo najprej uporabili za izvedbo postopka qPCR za gen GAPDH, nato pa ju še 10-krat razredčili, da smo dobili 1.250.000 molekul. Ostanek zalogovnih raztopin s po 12.500.000 molekul plazmidov smo razdelili na 3 dele in jih shranili v zamrzovalniku (-20 °C). Raztopini s po 1.250.000 molekulami smo trikrat zapored 10-krat redčili, da smo dobili želeni osnovni redčitvi s po 12.500 molekulami plazmidov. Nato smo ju še štirikrat zapovrstjo 5-kratno razredčili (200 µL + 800 µL ultračiste vode), in tako pripravili še načrtovane standardne redčitve, in sicer s po 2.500, 500, 100 in 20 molekul, ki smo jih uporabljali v nadaljevanju. S pomočjo reakcije qPCR za gen GAPDH, v kateri smo uporabili oba plazmida, smo dokazali, da smo ju pravilno redčili. To smo ugotovili tako, da smo primerjali grafe, ki smo jih dobili z merjenjem jakosti fluorescence v odvisnosti od števila reakcijskih ciklov. Na grafih (Slika 8) vidimo, da se krivulje posameznih oziroma enakih redčitev plazmidov

prekrivajo. Če se posamični krivulji ujemata v številu ciklov, lahko trdimo, da imamo v redčitvah, pri katerih so krivulje identične, enako število molekul plazmidov (Slika 8, Preglednici VIII in IX). Gen GAPDH smo izbrali načrtno, ker je to takoimenovani hišni gen (ang. housekeeping gene) potreben za vse žive organizme, ki kot vir energije uporabljajo ogljikove hidrate, zato se njegovo izražanje v različnih vrstah celic ne spreminja bistveno. Gen GAPDH naravno kodira izražanje proteina oziroma encima, ki sodeluje pri metabolizmu ogljikovih hidratov. Zaporedji za gen GAPDH sta bili enaki v obeh plazmidih. Ker so v tem genu vsi nukleotidi C nemetilirani, se po bisulfitni obdelavi DNA vsi spremenijo v nukleotide T. S tem smo zagotovili, da je reakcija PCR potekala povsem enako z obema plazmidoma. Pravilnost redčenja smo potrdili tudi s pomočjo Studentovega t testa, s katerim nismo zaznali statistično značilnih razlik med rezultati qPCR obeh primerjanih poskusov ($p=0,74$).



Slika 8: Grafična predstavitev specifičnih reakcij qPCR za GAPDH. Levo: potek specifičnih reakcij za plazmid CpG z oligonukleotidnima začetnikoma GAPDH_TpG pri redčitvah z 12.500, 2.500, 500, 100 in 20 plazmidnih molekul. Desno: potek specifičnih reakcij za plazmid TpG z oligonukleotidnima začetnikoma GAPDH_TpG, pri redčitvah z 12.500, 2.500, 500, 100 in 20 plazmidnih molekul.

Preglednica VIII: Sestava reakcijske zmesi qPCR za pomnoževanje gena GAPDH in za dokaz pravilnega redčenja plazmidnih standardov.

Reakcijska zmes za plazmid CpG	Količina	Reakcijska zmes za plazmid TpG	Količina
Ultračista voda	2,0 µL	Ultračista voda	2,0 µL

SYBR® Select Master Mix	5,0 µL	SYBR® Select Master Mix	5,0 µL
Smerni oligonukleotidni začetnik GAPDH_TpG_F_RT	0,5 µL	Smerni oligonukleotidni začetnik GAPDH_TpG_F_RT	0,5 µL
Protismerni oligonukleotidni začetnik GAPDH_TpG_R_RT	0,5 µL	Protismerni oligonukleotidni začetnik GAPDH_TpG_R_RT	0,5 µL
Plazmid CpG	2,0 µL	Plazmid TpG	2,0 µL

Preglednica IX: Temperaturni program reakcije qPCR za pomnoževanje gena GAPDH in za dokaz pravilnega redčenja plazmidnih standardov.

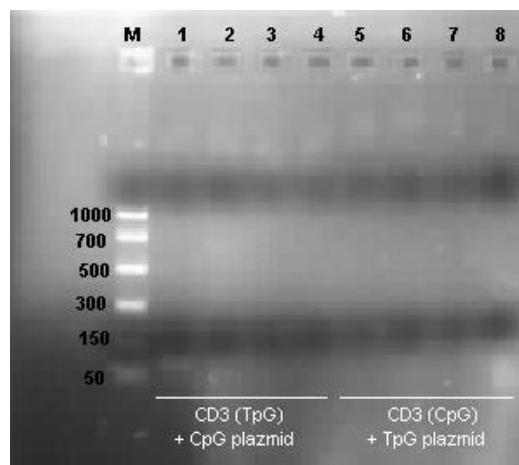
Stopnja reakcije	GAPDH		
	T °(C)	t (min)	Število ciklov
Začetna denaturacija	95,0	5:00	
Denaturacija	95,0	0:15	
Prileganje oligonukleotidnih začetnikov	58,0	0:30	45
Podaljševanje	72,0	0:30	

4.3 Selektivnost reakcije PCR

Za dokaz selektivnosti reakcije PCR smo izvedli poseben poskus. Načrtovali smo ga tako, da smo v zmes za reakcijo PCR, ki je vsebovala specifična oligonukleotidna začetnika CD3 za plazmid TpG, dodali plazmid CpG (Preglednica X). Obratno pa smo v zmes za drugo reakcijo PCR, ki je vsebovala oligonukleotidna začetnika, CD3 za plazmid CpG, dodali plazmid TpG. Po obeh končanih reakcijah PCR, v katerih smo pomnoževali gen za CD3, smo vzorca nanesli na agarozni gel, izvedli elektroforezo in posneli sliko pod UV svetlobo. Ugotovili smo, da po pričakovanju nobena od reakcij ni potekla, saj na gelu ni bilo nobene lise (Slika 9).

Preglednica X: Sestava reakcijske zmesi PCR za dokaz selektivnosti reakcij za gen CD3.

Sestavine	Količina	Sestavine	Količina
Ultračista voda	3,0 µL	Ultračista voda	3,0 µL
SYBR® Select Master Mix	5,0 µL	SYBR® Select Master Mix	5,0 µL
Smerni oligonukleotidni začetnik CD3 TpG	0,5 µL	Smerni oligonukleotidni začetnik CD3 CpG	0,5 µL
Protismerni oligonukleotidni začetnik CD3 TpG	0,5 µL	Protismerni oligonukleotidni začetnik CD3 CpG	0,5 µL
Plazmid CpG	1,0 µL	Plazmid TpG	1,0 µL

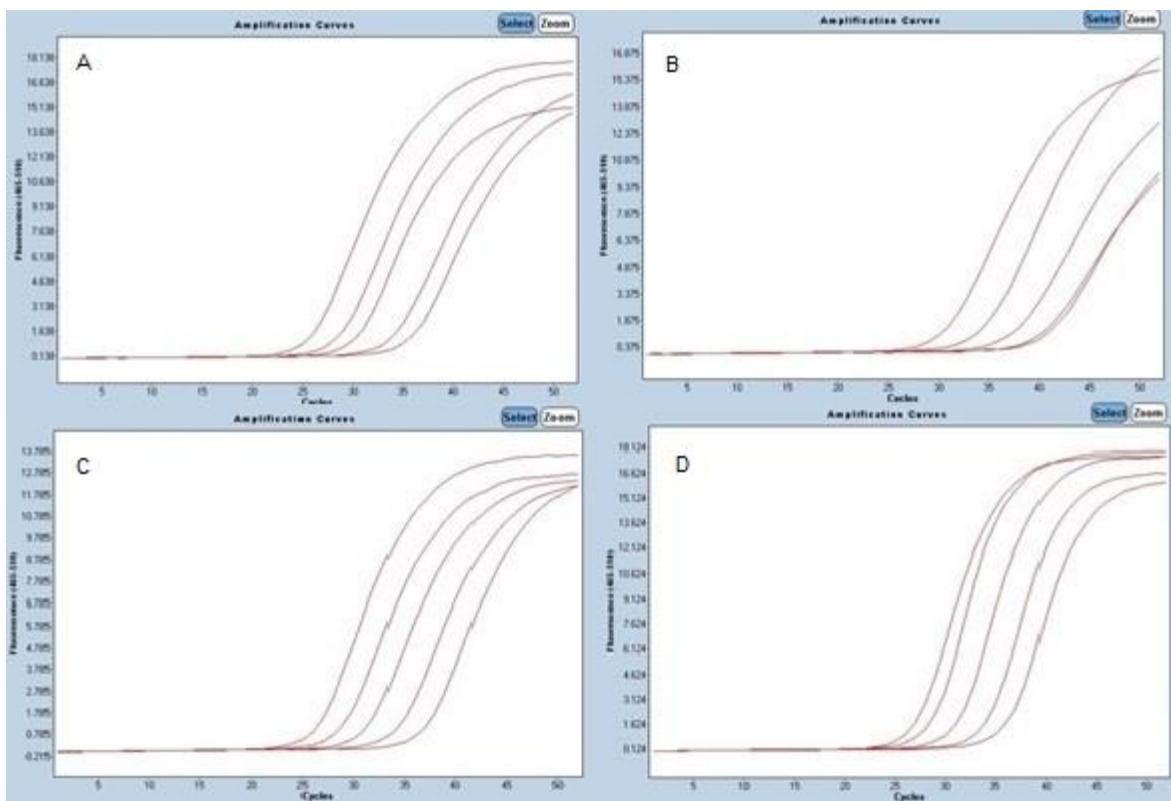


Slika 9: Rezultat agarozne gelske elektroforeze za prikaz selektivnosti reakcij PCR.

4.4 Izračun standardnih odklonov

Med preizkušanjem metode smo določili tudi standardne odklone (SD; ang. Standard Deviation) pri postopku priprave reakcijske zmesi za qPCR. To smo storili tako, da smo uporabili dva različna načina dodajanja standardnih redčitev plazmidov (Preglednica XI). V prvem poskusu smo med pripravo reakcijske zmesi plazmidno DNA dodali v osnovne reakcijske mešanice (master mix) in te nato odpipetirali v posamične reakcijske zmesi. Osnovno reakcijsko mešanico smo pripravili tako, da smo v epruveto dodali ultračisto

vodo, SYBR® Select Master Mix ter smerni in protismerni oligonukleotidni začetnik. Tej zmesi pa smo nato dodali še plazmidno DNA in vse dobro premešali. Iz tako pripravljene reakcijske mešanice qPCR smo nato s pipeto odpipetirali in enakomerno nanesli ustrezne volumne v vdolbinice mikrotitrsko plošče za qPCR. V drugem poskusu pa smo najprej pripravili "Master mix" na enak način kot prej in nato ustrezne volumne odpipetirali v vdolbinice mikrotitrsko plošče za qPCR. Šele nato smo v vsako vdolbinico posamično dodali ustrezne količine raztopin plazmidnih DNA. Po izvedbi reakcije qPCR smo preverili rezultate obeh poskusov (Slika 10). Z njihovo primerjavo smo ugotovili, da je bil drugi način priprave reakcijskih zmesi, torej dodajanje plazmidne DNA posebej, primernejši, saj smo v tem primeru dobili boljše rezultate oz. ponovljivost, kar vidimo na sliki 10.



Slika 10: **A:** reakcija qPCR z reakcijsko zmesjo za gen CD3 in plazmid CpG, v katero smo dodali tudi plazmidno DNA. **C:** reakcija qPCR z reakcijsko zmesjo za gen CD3 in plazmid CpG, ki smo ji naknadno dodali plazmidno DNA. **B:** Reakcija qPCR z reakcijsko zmesjo za gen CD3 in plazmid TpG, v katero smo dodali tudi plazmidno DNA. **D:** reakcija qPCR z reakcijsko zmesjo za gen CD3 in plazmid TpG, ki smo ji naknadno dodali plazmidno DNA.

Preglednica XI: Priprava rekvijske zmesi za ugotavljanje standardne deviacije metode (A) in optimizirani temperaturni program reakcije qPCR (B).

Sestavine	Količina	A
Ultračista voda	2,0 µL	
SYBR® Select Master Mix	5,0 µL	
Smerni oligonukleotidni začetnik	0,5 µL	
Protismerni oligonukleotidni začetnik	0,5 µL	
Plazmid	2,0 µL	

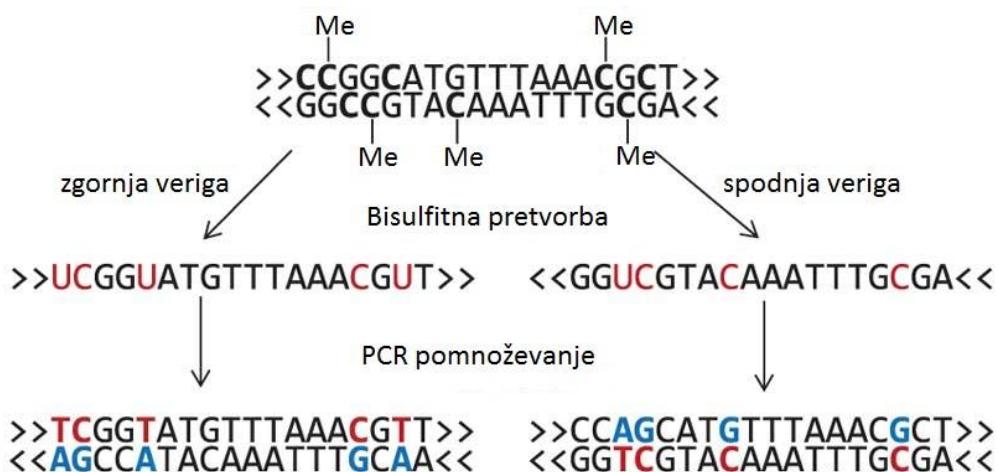
Stopnja reakcije	CD3		
	T (°C)	t (min)	Število ciklov
Začetna denaturacija	95,0	5:00	
Denaturacija	95,0	0:15	
Prileganje oligonukleotidnih začetnikov	58,0	0:30	
Podaljševanje	72,0	0:30	52

B

4.5 Bisulfitna pretvorba DNA

Metilacija citozinskih dušikovih baz (C) je pomembna za regulacijo transkripcije genoma pri sesalcih in predstavlja epigenetski dogodek, ki je, kot smo že omenili, povezan z nadzorom embrionalnega razvoja, genomskega vtisnjenja, inaktivacije kromosoma X, celične diferenciacije in proliferacije. Nenormalni vzorci metilacije DNA so povezani z nestabilnostjo DNA, posledica česar so lahko razne dedne ali pridobljene bolezni, med katerimi so tudi rakava obolenja. Metilacija je specifična za mesto C5 citozinskega obroča znotraj dinukleotidov citozin – gvanin (CpG) in je neposredno povezana s tesnejšim zvijanjem kromatina ter posledično zmanjšano dostopnostjo DNA za transkripcijske dejavnike. Kjer DNA ni metilirana, pa so kromatinska vlakna manj tesno povezana in zato dostopnejša za transkripcijske mehanizme. Regulatorna področja nekaterih genov vsebujejo veliko število dinukleotidov CpG, ki jih imenujemo otočki CpG.

Med bisulfitno obdelavo genomske DNA se nemetilirani C pretvorijo v uracil (U), v dušikovo bazo, ki v RNA zamenjuje timin (T). Nasprotno pa tisti C (na mestu 5), ki so metilirani ostanejo nespremenjeni. Reakcija poteče v več stopnjah, v katerih se protonirani C deaminira do U preko reverzibilnega nastanka sulfoniranega adukta (Slika 11). Reakcija je torej selektivna za C, ki niso metilirani, najverjetneje zaradi steričnega oviranja metilne skupine pri *cis*-adiciji bisulfitnega aniona na 5,6- dvojno vez. V bisulfitno reakcijo vstopa le enoveržna DNA, zato moramo genomsko DNA, preden jo podvržemo temu postopku, denaturirati. Spremembu sekvence DNA nam tako omogoča razlikovanje med posameznimi metilacijskimi vzorci. V okviru magistrske naloge smo reakcijo bisulfitne pretvorbe uporabili zato, da smo lahko ločili genske lokuse z metiliranimi od tistih z nemetiliranimi otočki CpG v promotorskih regijah preučevanih genov FOXP3, CD3 in GAPDH.



Slika 11: Prikaz bisulfitne pretvorbe odseka DNA, ki ji sledi specifično pomnoževanje s PCR; prirejeno po [52].

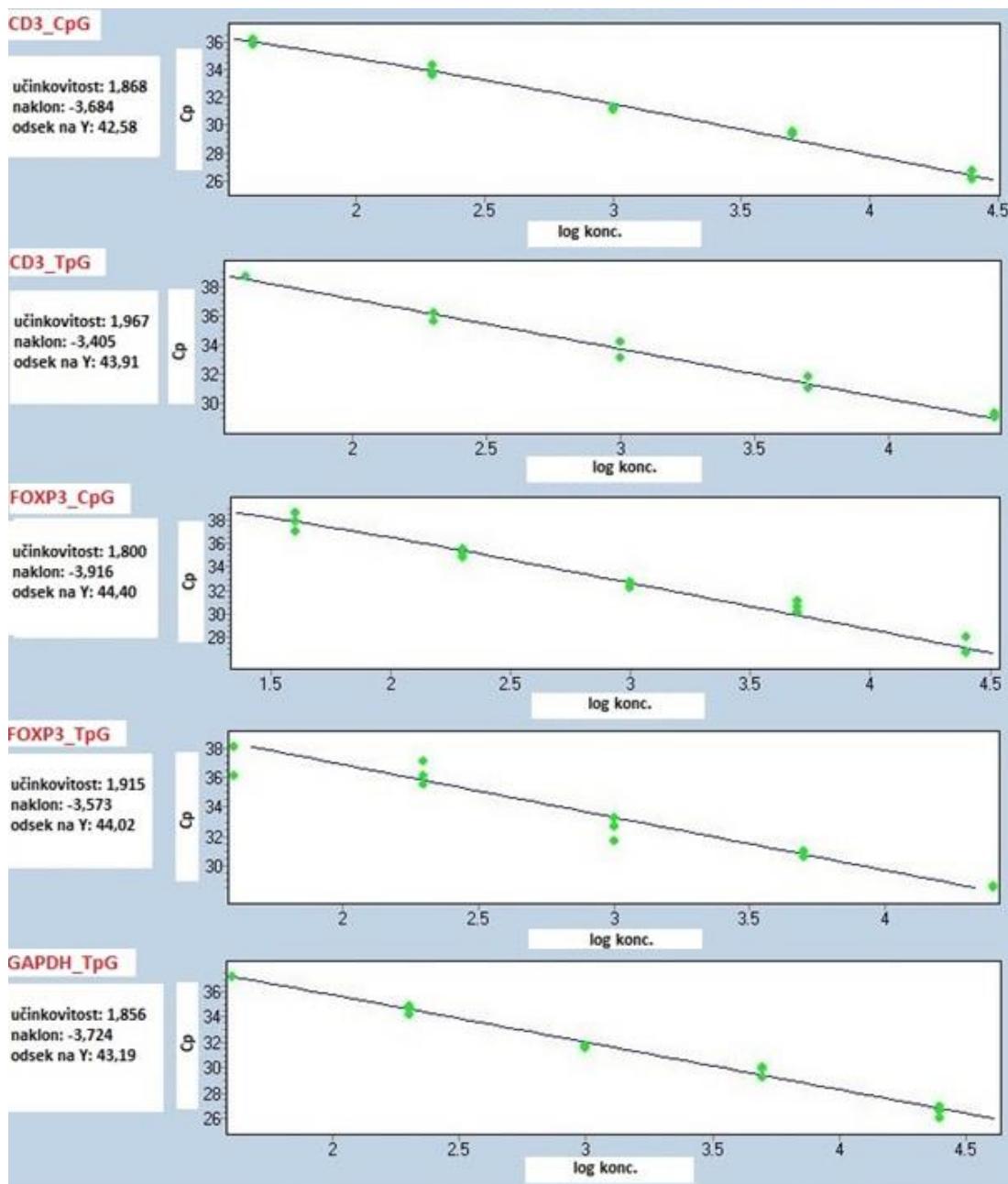
Metilacija C v otočkih CpG kovalentno spremeni molekulo DNA, tako da je dostopnost kromatina za transkripcijske mehanizme močno otežena oz. preprečena. Tako diferencialna metilacija prispeva k transkripcijskemu nadzoru genov [23]. Med bisulfitno pretvorbo genomske DNA se nemetilirani otočki CpG pretvorijo v TpG (varianta TpG), medtem ko se metilirani ne spremeniijo (varianta CpG), kar omogoča razlikovanje med obema variantama [24]. Zato lahko uporabimo epigenetske mehanizme kot orodje za kvantifikacijo in epigenetsko imunofenotipizacijo celic. V našem primeu smo bisulfitno

konverzijo uporabili za pretvorbo TSDR FOXP3, in sicer za identifikacijo in ločevanje Treg (varianta TpG) od ostalih CD3⁺ limfocitov T, vključno z aktiviranimi efektorskimi celicami T, ki prav tako, čeprav le omejeni čas, izražajo FOXP3 (varianta CpG) [25]. Demetilirano gensko področje, značilno za FOXP3 Treg (TSDR) je visoko specifičen označevalec teh celic [26]. Ker pri tej metodi kot analit uporabljam molekulo DNA, ki ima znano število kopij v vsaki celici, ni nobenih vnaprej določenih mej, ki bi ločevale pozitivne in negativne celice. Zato lahko tovrstno analizo opravimo z uporabo celičnih suspenzij, trdnih tkiv ali telesnih tekočin, brez posebnih zahtev glede načinov njihovega shranjevanja, kar močno prispeva k uporabnosti oziroma primernosti te metode.

Podobno kot TSDR za FOXP3 smo uporabili tudi epigenetski vzorec regije CD3 kot specifični označevalec za identifikacijo vseh limfocitov T ali oTL (ang. Overall T Lymphocytes). Vse celice T namreč izražajo molekulski kompleks CD3, geni, ki ga kodirajo, pa vsebujejo nemetilirane otočke CpG. Kot marker smo uporabili tudi epigenetski vzorec gena GAPDH, ki je v vseh celicah dovezten za bisulfitno pretvorbo v varianto TpG, kar pomeni, da so njegovi otočki CpG tukaj nemetilirani. Zaradi teh njegovih lastnosti, ki so enake v vseh somatskih celicah, smo različico TpG GAPDH uporabili kot kontrolo za DNA vseh celic v posameznem vzorcu oziroma za kvantifikacijo celotnega števila kopij DNA v njemu. Za vsako gensko regijo posebej z izjemo GAPDH smo razvili postopke qPCR, ki so bili občutljivi samo za eno ali drugo varianto genskega zaporedja po bisulfitni pretvorbi, torej za CpG ali TpG. Kot standarda za opredelitev števila kopij DNA smo načrtovali in uporabili plazmida, ki sta ustrezala eni ali drugi epigenetski varianti posameznega lokusa. Ker torej vse celice vsebujejo enako količino DNA (po 2 kopiji), je število kopij DNA v vzorcu sorazmerno številu celic v njem. Za pripravo standardne krivulje smo zato uporabili plazmida, ki sta vsebovala zaporedja DNA, ki so bila identična tistim v posameznih genskih regijah ter tudi zaporedja, enaka tistim v posameznih genskih regijah, ki bi jih dobili po reakciji z bisulfitom. Za vsak tarčni gen smo torej konstruirali po dve zaporedji, eno za različico TpG in eno za CpG (Preglednica VII). Plazmida smo nato redčili, da smo dobili raztopine z znanim številom kopij matričnih sekvenc DNA, za vsako epigenetsko varianto posebej (CpG in TpG).

Standardne krivulje reakcij qPCR smo pripravili tako, da smo raztopine plazmidov specifično pomnoževali z ustreznimi oligonukleotidnimi začetniki in določili odvisnost cikla kvantifikacije tarčnih DNA od logaritemskih vrednosti števila matričnih plazmidnih kopij (Slika 12).

Tako smo potrdili linearno odvisnost za vse štiri uporabljeni koncentracijski razrede in ovrgli možnost navzkrižnih reakcij med posameznimi specifičnimi reakcijami qPCR ter nasprotnimi epigenetskimi različicami matričnih molekul DNA (Slika 8).



Slika 12: Standardne umeritvene krivulje posameznih plazmidov za različne CpG in TpG genov CD3 in FOXP3 ter variante TpG hišnega gena GAPDH.

4.6 Analiza deležev Treg in celotnega števila CD3⁺ limfocitov T (oTL) v vzorcih polne krvi bolnikov in zdravih posameznikov

Tako pripravljeni standardni reagenti smo uporabili za analizo 13 vzorcev polne krvi, od tega 5 odvzetih zdravim ljudem in 8 rakavim bolnikom. Določali smo število Treg in celokupno število CD3⁺ limfocitov T (oTL) ter njuno razmerje Treg/oTL (Preglednica XII). Povprečna vrednost deležov celic Treg je bila 3,65% (interval 0,24-6,97%; SD 3,07%) v skupini zdravih oseb ter 6,91% (interval 1,59-15,71%; SD 5,02%) v vzorcih bolnikov. Povprečni vrednosti celokupnega deleža CD3⁺ limfocitov T pa sta bili 68,61% (interval 34,69-80,99; SD 19,26%) pri zdravih in 46,57% (interval 12,18-78,29%; SD 27,45%) pri bolnikih. Povprečna vrednost razmerja Treg/oTL oz. delež Treg, glede na vse CD3⁺ limfocite T, je bila pri zdravih osebah 6,14% (interval 0,8-13,6%; SD 5,61%), kar ustreza podatkom v literaturi, ki temelji na rezultatih pretočne citometrije [27, 28]. Pri bolnikih pa je bila ta vrednost pričakovano višja, in sicer 27,96% (interval 5,4-15,6%; SD 36,15%). Znane so fiziološke vrednosti Treg, in sicer znašajo med 5% in 10% [29, 30, 31]. Glede na to obstaja prepričanje, da je imunsko ravnovesje neporušeno oz. ustrezeno vse dokler delež limfocitov Treg ne preseže desetine deleža vseh limfocitov T. Čeprav smo analizirali zelo majhno število vzorcev, pa lahko opazimo značilen trend povišanja deležev Treg in razmerij Treg/oTL v vzorcih bolnikov z diagnosticiranim rakom.

Naši pilotni eksperimentalni podatki se torej skladajo s poročili številnih raziskav, s katerimi so dokazali, da se z zmanjšanjem števila Treg in povečano frekvenco efektorskih celic T vzpostavi tumorska kontrola [32, 33, 34]. Število CD25⁺ FOXP3⁺ limfocitov T se v rakavih tkivih poveča [27]. Ugotovili so, da so nizke vrednosti CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ celic Treg in visoke vrednosti CD3 mRNA povezane z boljšim preživetjem rakavih bolnikov [35, 36].

Preglednica XII: Rezultati analize vzorcev s pomočjo pripravljenih standardnih reagentov.

Oznaka vzorcev	Delež Treg (%)	Delež vseh CD3 ⁺ limfocitov T; oTL (%)	Razmerje Treg/oTL
Z1	6,97	80,99	0,086
Z2	5,77	77,19	0,074
Z3	0,24	78,41	0,003
Z4	4,71	34,69	0,136

Z5	0,58	71,79	0,008
	$\bar{x}=3,65 \pm 3,07$	$\bar{x}=68,61 \pm 19,26$	$\bar{x}=6,14 \pm 5,61$
B1	15,71	26,79	0,586
B2	1,59	24,17	0,066
B3	3,85	67,19	0,057
B4	6,18	39,68	0,156
B5	4,21	77,68	0,054
B6	11,87	12,18	0,974
B7	4,99	78,29	0,064
	$\bar{x}=6,91 \pm 5,02$	$\bar{x}=46,57 \pm 27,45$	$\bar{x}=27,96 \pm 36,15$

4.7 Zaključna razprava

Pri vrednotenju deležev Treg obstaja težava, saj so med CD25⁺ FOXP3⁺ celicami tudi aktivirani efektorski limfociti T, zato analize, ki temeljijo na uporabi mRNA, IHC ali pretočne citometrije, ne izkazujejo dovolj velike natančnosti pri njihovi kvantifikaciji. Zato smo vzpostavili specifična testa qPCR za natančno kvantifikacijo deležev limfocitov T (CD3⁺) in njihove subpopulacije Treg (FOXP3⁺). Kot kontrolo smo uporabili hišni gen GAPDH, katerega področja CpG se po bisulfitni obdelavi pretvorijo v TpG v prav vseh celicah.

Z uporabo epigenetske analize smo, čeprav le na omejenem številu vzorcev pokazali, da imajo rakavi bolniki neravnovesje v razmerju Treg/oTL. Prav ta značilnost pri različnih vrstah tumorjev kaže na to, da je ta parameter pogosto značilen za tumorska stanja. Obstaja namreč hipoteza, da porušeno ravnovesje Treg/oTL pomembno prispeva k temu, da se imunski sistem ne more ustrezno odzvati na rakavo tkivo, to pa je predpogoj za razvoj vztrajajočih tumorjev [15]. Zato bi bila inhibicija limfocitov Treg lahko ena od možnih tarč v terapiji raka, saj bi s tem ojačali telesu lastne protitumorske imunske odzive.

5 SKLEP

V okviru eksperimentalnega dela magistrske naloge smo uspeli pripraviti referenčne oz. standardne reagente za epigenetsko določanje deležev limfocitov T v bioloških vzorcih. V raziskavah smo uporabili tehnologijo rekombinantne DNA (plazmidi) in vzpostavili epigenetsko metodo, ki kot molekulske označevalce uporablja metilacijske vzorce v molekuli DNA. Pri tem smo upoštevali znano dejstvo, da je samo v celicah Treg določeno

področje gena FOXP3 ves čas nemetilirano, kar omogoča spremeljanje deleža celic Treg s pomočjo reakcije PCR ali drugih metod, ki temeljijo na analizi DNA. Prednost takšne metode je predvsem v njihovi specifičnosti, relativni nezahtevnosti, potencialni uporabnosti v diagnostiki in spremeljanju učinkov zdravljenja raka. Našo metodo smo preizkusili tudi na majhnem številu vzorcev krvi zdravih oseb in bolnikov z rakom ter potrdili pričakovane rezultate, tj. večji delež Treg pri bolnikih z rakom.

Na podlagi naših pilotskih izkušenj in rezultatov menimo, da bi standardne rekombinantne sestavine testa lahko še bolj optimizirali. Tako bi lahko z vključitvijo ustreznih regij preučevanih genov v en sam skupen plazmid ter z uporabo hidrolizirajočih sond, natančneje zaznavali reakcije v eni sami skupni reakcijski zmesi, s čimer bi predvidoma izboljšali robustnost metode, ob tem pa tudi zmanjšali porabo reagentov, vzorcev in časa.

6 LITERATURA

1. D. Male, J. Brostoff, D. Roth, I. Roitt: Immunology 7th Ed, Elsevier, 2006.
2. Vozelj M, Temelji imunologije, DZS, 2001.
3. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ: Immunobiology: The System In Health and Disease 6th Ed, Churchill Livingstone, 2004.
4. Jeras M, Švajger U: Imunska toleranca. Zdravniški vestnik 2011; 12: 944-956.
5. Sprent J, Kishimoto H: The thymus and central tolerance. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2001; 356 (1409): 609-16.
6. Hogquist KA, Baldwin TA, Jameson SC: Central tolerance: learning self-control in the thymus. Nature Reviews Immunology 2005; 10: 772-82.
7. Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, Kuniyasu Y, Shimizu J, Otsuka F, Sakaguchi S: Thymus and autoimmunity: production of CD25⁺CD4⁺ anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. Journal of Immunology 1999; 162(9): 5317-26.
8. Seddon B, Mason D: Peripheral autoantigen induces regulatory T cells that prevent autoimmunity. Journal of Experimental Medicine 1999; 189: 877-882.
9. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M: Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25).

- Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of Immunology* 1995; 155: 1151-1164.
10. Waldmann TA: The interleukin-2 receptor. *Journal of Biological Chemistry* 1991; 266: 2681-2684.
 11. Lerman MA, Larkin J 3rd, Cozzo C, Jordan MS, Caton AJ: CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell repertoire formation in response to varying expression of a neo-self-antigen. *Journal of Immunology* 2004; 173: 236-244.
 12. Tang Q, Henriksen KJ, Boden EK Tooley AJ, Ye J, Subudhi SK, Zheng XX Strom TB, Bluestone JA: Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Journal of Immunology* 2003; 171: 3348-3352.
 13. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S: Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2009; 299: 1057-1061.
 14. Walker MR, Kasprovicz DJ, Gersuk VH, Benard A, Landeghen M, Buckner JH, Ziegler SF: Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4⁺CD25⁻ T cells. *Journal of Clinical Investigation* 2003; 112:1437-1443.
 15. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M, Zhu Y, Wei S, Kryczek I, Daniel B, Gordon A, Myers L, Lackner A, Disis ML, Knutson KL, Chen L, Zou W: Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature Medicine* 2004; 10: 942-9.
 16. Jeras M, Švajger U: Celična terapija z regulatornimi limfociti T - celice kot zdravila. *Farmacevtski vestnik*, 2009; 60 (3): 143-149.
 17. Chandler VL: Paramutation: from maize to mice. *Cell* 2007; 128 (4): 641-5.
 18. Jablonka E, Lachmann M, Lamb JM: Evidence, mechanisms and models for the inheritance of acquired characters. *Journal of Theoretical Biology* 1992; 158 (2): 245-268.
 19. Burdge GC, Hoile SP, Uller T, Thomas NA, Gluckman PD, Hanson MA, Lillycrop KA: Progressive, transgenerational changes in offspring phenotype and epigenotype following nutritional transition. *Public Library of Science (PLOS)* 2011; 6 (11): e28282.
 20. Fang M, Chen D, Yang CS: Dietary polyphenols may affect DNA methylation. *The Journal of Nutrition* 2007; 137 (1): 223S-228S.

21. Kikuno N, Shiina H, Urakami S, Kawamoto K, Hirata H, Tanaka Y, Majid S, Igawa M, Dahiya R: Genistein mediated histone acetylation and demethylation activates tumor suppressor genes in prostate cancer cells. International Journal of Cancer 2008; 123 (3): 552-60.
22. Olaharski AJ, Rine J, Marshall BL, Babiarz J, Zhang L, Verdin E, Smith MT: The flavoring agent dihydrocoumarin reverses epigenetic silencing and inhibits sirtuin deacetylases. PLoS Genetics 2005; 1(6): e77.
23. Straussman R, Nejman D, Roberts D, Steinfeld I, Blum B, Benvenisty N, Simon I, Yakhini Z, Cedar H: Developmental programming of CpG island methylation profiles in the human genome. Nature Structural & Molecular Biology 2009; 16: 564-71.
24. Olek A, Oswald J, Walter J: A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis. Nucleic Acids Research 1996; 24: 5064-6.
25. Baron U, Floess S, Wieczorek G, Baumann K, Grützkau A, Dong J, Thiel J, Boeld TJ, Hoffmann P, Edinger M, Turbachova I, Hamann A, Olek S, Huehn J: DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3⁺ conventional T cells. European Journal of Immunology 2007; 37: 2387-89.
26. Stockis J, Fink W, Francois V, Connerotte T, de Smet C, Knoops L, van der Bruggen P, Boon T, Coulie PG, Lucas S: Comparison of stable human Treg and Th clones by transcriptional profiling. European Journal of Immunology 2009; 39: 869-82.
27. Ormandy LA, Hillemann T, Wedemeyer H, Manns MP, Greten TF, Korangy F: Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. Cancer Research 2005; 65: 2457-2464.
28. Ichihara F, Kono K, Takahashi A, Kawaida H, Sugai H, Fujii H: Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers. Clinical Cancer Research 2003; 9: 4404-4408.
29. Loddenkemper C, Schernus M, Noutsias M, Stein H, Thiel E, Nagorsen D: In situ analysis of FOXP3⁺ regulatory T cells in human colorectal cancer. Journal of Translational Medicine 2006; 4: 52.

30. Meloni F, Morosini M, Solari N, Passadore I, Nascimbene C, Novo M, Ferrari M, Cosentino M, Marino F, Pozzi E, Fietta AM: Foxp3 expressing CD4⁺CD25⁺ and CD8⁺CD28⁻ T regulatory cells in the peripheral blood of patients with lung cancer and pleural mesothelioma. *Human Immunology* 2006; 67: 1-12.
31. Miller AM, Lundberg K, Ozenci V, Banham AH, Hellström M, Egevad L, Pisa P: CD4⁺CD25^{high} T cells are enriched in the tumor and peripheral blood of prostate cancer patients. *Journal of Immunology* 2006; 177: 7398-405.
32. Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S: Induction of tumor immunity by removing CD25⁺CD4⁺ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *Journal of Immunology* 1999; 163: 5211-5218.
33. Baier PK, Wimmenauer S, Hirsch T, von Specht BU, von Kleist S, Keller H, Farthmann EH: Analysis of the T cell receptor variability of tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal carcinomas. *Tumour Biology* 1998; 19: 205-212.
34. Diederichsen AC, Hjelmborg JV, Christensen PB, Zeuthen J, Fenger C: Prognostic value of the CD4⁺/CD8⁺ ratio of tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer and HLA-DR expression on tumour cells. *Cancer Immunology Immunotherapy* 2003; 52: 423-428.
35. Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, Jungbluth AA, Frosina D, Gnjatic S, Ambrosone C, Kepner J, Odunsi T, Ritter G, Lele S, Chen YT, Ohtani H, Old LJ, Odunsi K: Intraepithelial CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8⁺/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA (PNAS)* 2005; 102: 18538- 18543.
36. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoué F, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Pagès F: Type, density and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006; 313: 1960-1964.
37. <http://www.tutorsglobe.com/homework-help/zooiology/innate-immunity-72261.aspx> (1.10.2015).
38. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S: *Cellular and Molecular Immunology* Seventh Edition, Elsevier Saunders, 2012.

39. Marvel D, Gabrilovich DI: Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microuenvironment: expect the unexpected. *J Clin Invest.* 2015; 125(9): 3356-64.
40. Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM: Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annual review of Immunology* 2007; 25: 267-296.
41. Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH: Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 1995; 7: 541-547.
42. Tai-You H: The role of regulatory T cells in cancer. *Immune Network* 2009; 6: 209-235.
43. Sasada T, Kimura M, Yoshida Y, Kanai M, Tabakayashi A: CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression. *Cancer* 2003; 98 (5): 1089-99.
44. <http://olomouc.ueb.cas.cz/book/export/html/45> (1.10.2015)
45. <http://www.semrock.com/flow-cytometry.aspx> (1.10.2015).
46. Noble D: Conrad Waddington and the origin of epigenetics. *The Journal of experimental Biology* 2015; 218: 816-818.
47. Weinhold B: Epigenetics The science of change. *Environmental health perspectives* 2006; 114 (3): 160-167.
48. Ratel D, Ravanat JL, Berger F, Wion D: N6-methyladenine – the other methylated base of DNA. *Bioessays* 2006; 28 (3): 309-315.
49. Ehrlich M, Wang RYH: 5-Methylcytosine in eukaryotic DNA. *Science* 1981; 212 (4501): 1350-1357.
50. Jin B, Li Y, Robertson KD: DNA methylations – Superior or subordinate in the epigenetic hierarchy? *Genes & Cancer* 2011; 2 (6): 607-617.
51. Li E, Beard C, Jaenisch R: Role of DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* 1993; 366 (6453): 362-365.
52. Krueger F, Kreck B, Franke A, Andrews SR: DNA methylome analysis using short bisulfite sequencing data. *Nature Methods* 2012; 9: 145-151.
53. Šavli J: Priprava referenčnega materiala za genotipizacijo polimorfizma (TA)_n ponovitev v genu UGT1A1 z uporabo molekularnega kloniranja. Diplomska naloga, Ljubljana 2012, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo.