

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TANJA TOPLIKAR (SALMIČ)

MAGISTRSKA NALOGA
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO

TANJA TOPLIKAR (SALMIČ)

**EPIGENETSKO DOLOČANJE IN PRIMERJALNO
VREDNOTENJE LIMFOCITOV Treg V VZORCIH
PERIFERNE KRVI BOLNIKOV Z RAKOM PROSTATE**

**EPIGENETIC DETERMINATION AND COMPARATIVE
EVALUATION OF Treg LYMPHOCYTES IN PERIPHERAL
BLOOD SAMPLES OF PROSTATE CANCER PATIENTS**

UNIFORM MASTER'S STUDY PROGRAMME PHARMACY

Ljubljana, 2016

Magistrsko nalogu sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za klinično biokemijo, pod mentorstvom izr. prof. dr. Matjaža Jerasa, mag. farm. in somentorstvom izr. prof. dr. Barbare Ostanek, mag. farm. Meritve Treg s pretočno citometrijo so bile opravljene na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju, izr. prof. dr. Matjažu Jerasu in somentorici, izr. prof. dr. Barbari Ostanek za nasvete in vodenje pri raziskovalnem delu ter dostopnost in vso pomoč pri pisanju magistrske naloge. Zahvala gre tudi asist. dr. Vidu Mlakarju, ki me je seznanil s tematiko naloge.

Srčno se zahvaljujem vsem svojim domačim, ki so me neutrudno podpirali vse do zaključka študija. Ne nazadnje pa se zahvaljujem možu za podporo, skrb in potrpljenje v času nastajanja magistrske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogu izdelala samostojno pod mentorstvom izr. prof. dr. Matjaža Jerasa, mag. farm. in somentorstvom izr. prof. dr. Barbare Ostanek, mag. farm.

Tanja Toplikar

VSEBINA

VSEBINA	I
KAZALO SLIK.....	III
KAZALO PREGLEDNIC.....	V
POVZETEK	VII
ABSTRACT	IX
SEZNAM OKRAJŠAV.....	XI
1 UVOD	1
1.1 DEFINICIJA EPIGENETIKE IN VLOGA METILACIJE DNA	1
1.2 NASTANEK IN VLOGA REGULATORNIH LIMFOCITOV T V IMUNSKEM SISTEMU	3
1.3 VLOGA Treg PRI RAZVOJU TUMORJA.....	5
1.4 KVANTIFIKACIJA LIMFOCITOV nTreg	6
2 NAMEN DELA.....	10
3 MATERIALI IN METODE	11
3.1 MATERIALI	11
3.1.1 Plazmidni standard	11
3.1.2 Oligonukleotidni začetniki (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)	11
3.1.3 Reagenti.....	11
3.1.4 Reagenčni kompleti za pripravo reakcij in čiščenje DNA	12
3.1.5 Aparature in laboratorijska oprema	13
3.1.6 Računalniški programi	14
3.1.7 Biološki material	14
3.2 METODE.....	15
3.2.1 Sterilizacija laboratorijskih pripomočkov in čiščenje delovnih površin	15
3.2.2 Transformacija krožnega plazmidnega standarda	16
3.2.3 Čiščenje krožnega plazmidnega standarda.....	16

3.2.4	Merjenje koncentracije in čistote izoliranega krožnega plazmidnega standarda	17
3.2.5	Linearizacija krožnega plazmidnega standarda.....	18
3.2.6	Čiščenje lineariziranega plazmidnega standarda.....	18
3.2.7	Merjenje koncentracije in čistote lineariziranega plazmidnega standarda	18
3.2.8	Priprava raztopine lineariziranega plazmidnega standarda za umeritveno krivuljo	
		19
3.2.9	Priprava raztopin oligonukleotidov za PCR	20
3.2.10	Bisulfitna pretvorba vzorcev	20
3.2.11	Merjenje koncentracije in čistote bisulfitno pretvorjenih vzorcev	20
3.2.12	Reakcije qPCR plazmidnih standardov in vzorcev	20
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	24
4.1	Koncentracija in čistota lineariziranega plazmidnega standarda različice TpG	25
4.2	Optimizacija in izdelava standardne umeritvene krivulje.....	26
4.3	Optimizacija bisulfitne pretvorbe vzorcev DNA	29
4.4	Koncentracija in čistota bisulfitno pretvorjenih vzorcev DNA	31
4.5	Optimizacija reakcije qPCR za bisulfitno pretvorjene vzorce DNA	33
4.6	Rezultati reakcij qPCR preiskovanih vzorcev DNA.....	37
4.7	Razmerja Treg/oTL in primerjava naših rezultatov z rezultati pretočne citometrije..	39
5	SKLEP.....	46
6	LITERATURA.....	48

KAZALO SLIK

Slika 1: Reakcija metilacije citozina na mestu C-5 in pozicije metiliranih nukleotidov v 3D strukturnem modelu molekule DNA. Pritejeno po (5).	2
Slika 2: Shematski prikaz izvora in nastanka naravnih in induciranih regulatornih limfocitov T. Pritejeno po (13).	5
Slika 3: Shematski prikaz delovanja pretočnega citometra. Pritejeno po (19).	7
Slika 4: Potek bisulfitne pretvorbe DNA in nadaljne reakcije PCR metiliranega in nemetiliranega dinukleotida CpG. Pritejeno po (21).....	8
Slika 5: Primer razporedja reakcijskih mešanic na mikrotitrski ploščici za izvedbo reakcije qPCR različice TpG gena FOXP3 v vzorcih bolnika P6. Rjavi krogci prikazujejo vdolbinice, v katere smo odpipetirali plazmidne standarde, rdeči pa položaje z bisulfitno pretvorjenimi vzorci DNA. Z zeleno barvo so označene vdolbinice s slepimi vzorci. Za vsak plazmidni standard in vsak vzorec smo reakcijo qPCR izvedli v trojniku.....	23
Slika 6: Izmerjene koncentracije izoliranega lineariziranega plazmidnega standarda različice TpG; $C_{\text{povprečna}} = 39,57 \text{ ng}/\mu\text{L}$	25
Slika 7: Meritve čistote izoliranega lineariziranega plazmidnega standarda za različico TpG. 26	26
Slika 8: Krivulje reakcij qPCR redčitev plazmidnega standarda različice TpG za gen CD3 in pripadajoča umeritvena krivulja.	28
Slika 9: Krivulje reakcij qPCR redčitev plazmidnega standarda različice TpG za gen FOXP3 in pripadajoča umeritvena krivulja.....	28
Slika 10: Talilni krivulji produktov reakcije qPCR redčitev plazmidnega standarda različice TpG za gen CD3 (zgoraj) in FOXP3 (spodaj).	29
Slika 11: Koncentracije bisulfitno pretvorjenih vzorcev DNA treh bolnikov (P9, P13 in P14), pripravljenih z in brez dodanega etanola v koraku njihovega čiščenja, po prvi eluciji iz kolone.	31
Slika 12: Koncentracije bisulfitno pretvorjenih vzorcev DNA treh bolnikov (P9, P13 in P14), pripravljenih z in brez dodanega etanola v koraku njihovega čiščenja, po dodatni (drugi) eluciji iz kolone.	31
Slika 13: Grafi, ki prikazujejo absorpcijske spektre bisulfitno pretvorjenih DNA vzorcev, namenjenih nadaljnji analizi s qPCR. Absorpcijski spekter bisulfitno pretvorjene DNA vzorcev zdravih oseb (levo zgoraj), bolnika P6 (desno zgoraj), bolnika P9 (levo spodaj) in bolnika P14 (desno spodaj). Pri nekaterih vzorcih bolnikov P9 in P14 je vidna prisotnost kontaminantov zaradi visoke absorpcije svetlobe pri 230 nm.....	32

Slika 14: Reakcijske krivulje qPCR za varianto TpG gena CD3 nižjih količin bisulfitno pretvorjenih vzorcev DNA, zabeležene med postopkom optimizacije. Levo 60 in desno 80 ng začetne količine vzorčne DNA.....	34
Slika 15: Reakcijske krivulje qPCR za varianto TpG genov CD3 (levo) in FOXP3 (desno), optimalnih količin bisulfitno pretvorjenih vzorcev DNA – 150 ng, zabeležene med postopkom optimizacije.	37
Slika 16: Reakcijske krivulje qPCR vzorcev bolnika P9 za varianti TpG genov CD3 (levo) in FOXP3 (desno).	38
Slika 17: Reakcijske krivulje qPCR vzorcev bolnika P14 za varianti TpG genov CD3 (levo) in FOXP3 (desno).	38
Slika 18: Grafični prikaz deležev nTreg (% CD3 limfocitov T), določenih s pretočno citometrijo ($CD4CD25^{++}CD127^{\text{low}}$) in epigenetsko metodo (FOXP3) za bolnika P6 – levo zgoraj, P9 – desno zgoraj, P13 – levo spodaj in P14 – desno spodaj. Rdeče črte prikazujejo povprečne vrednosti in standardne napake; NS – statistično neznačilno.	42
Slika 19: Grafični prikaz dinamičnih nihanj deležev nTreg, določenih s pretočno citometrijo ($CD4^+CD25^+CD127^{\text{nizko}}$) in epigenetsko metodo (FOXP3), v vzorcih bolnikov po vrsti od zgoraj navzdol – P6, P9, P13 in P14, ki so bili odvzeti v različnih časovnih obdobjih med potekom izvajanja imunske modulacije. Zelena barva – vzorec odvzet pred imunsko modulacijo; rdeča barva – vzorci odvzeti med 1. serijo imunske modulacije; oranžna barva - vzorci odvzeti med 2. serijo imunske modulacije; vijolična barva - vzorci odvzeti ob preverjanju imunskih odzivov <i>in vivo</i>	44
Slika 20: Bland-Altmanovi grafi, ki prikazujejo sipanje vrednosti razlik deležev nTreg, določenih z obema metodama v vzorcih bolnikov: P6 – levo zgoraj, P9 – desno zgoraj, P13 – levo spodaj in P14 – desno spodaj. Prikazane so tudi vrednosti biasov (odstopanj) in 95 % meja ujemanj.....	45

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Razredi molekulskih označevalcev, s katerimi opredeljujemo nTreg (17, 18).....	6
Preglednica II: Nukleotidno zaporedje oligonukleotidnih začetnikov za reakcijo qPCR.	11
Preglednica III: Uporabljeni reagenti, ki so bili komercialno dobavljeni.	11
Preglednica IV: Uporabljeni reagenti in gojišča, ki smo jih pripravili v laboratoriju.	12
Preglednica V: Uporabljeni reagenčni kompleti za izolacijo in čiščenje DNA ter izvajanje reakcij bisulfitne pretvorbe DNA.	12
Preglednica VI: Uporabljene aparature in laboratorijska oprema.	13
Preglednica VII: Računalniški programi, ki smo jih uporabili za izvedbo reakcij PCR, meritve koncentracij in čistote DNA ter statistično obdelavo rezultatov.	14
Preglednica VIII: Podatki o testiranih vzorcih periferne krvi bolnikov in vzorcih levkocitnih koncentratov zdravih oseb.	15
Preglednica IX: Priprava reakcijske zmesi za linearizacijo plazmidnega standarda.....	18
Preglednica X: Redčitve plazmidnih standardov za izdelavo umeritvene krivulje. Natančno število plazmidnih molekul v 1 µL in 4 µL raztopine smo določili na osnovi literarnih podatkov (25).....	19
Preglednica XI: Sestava reakcijske mešanice za reakcijo qPCR s plazmidnimi standardi in preiskovanimi vzorci.	22
Preglednica XII: Količine reagentov v reakcijski mešanici PCR za optimizacijo standardne umeritvene krivulje.....	26
Preglednica XIII: Optimizacija reakcijske mešanice qPCR za nižje količine bisulfitno pretvorjenih vzorcev DNA.	33
Preglednica XIV: Optimizacija reakcijske mešanice qPCR za srednje količine bisulfitno pretvorjenih vzorcev DNA.	34
Preglednica XV: Optimizacija reakcijske mešanice qPCR za visoke količine bisulfitno pretvorjenih vzorcev DNA.	35
Preglednica XVI: Sestava reakcijske mešanice qPCR s potencialno optimalnimi količinami bisulfitno pretvorjenih vzorcev.....	36
Preglednica XVII: Primerjava epigenetsko določenih deležev nTreg v vzorcih zdravih oseb (krvodajalci) (n = 5) in bolnikov s hormonsko odpornim rakom prostet (n = 4).	39

Preglednica XVIII: Izračunani deleži nTreg določenih s pretočno citometrijo (CD4CD25⁺⁺CD127^{low}) in epigenetsko metodo (FOXP3). Zvezdici označujeta neustrezni (izpuščeni) vrednosti.....40

POVZETEK

Regulatorni limfociti T (Treg) v imunskem sistemu uravnavajo obseg in trajanje imunskega odzivov. Njihova zmanjšana aktivnost doprinese k razvoju alergij in avtoimunskih bolezni, medtem ko njihovo povečano število in aktivnost v tumorskih tkivih povezujejo z nastankom in vzdrževanjem mikrookolja, ki lokalno preprečuje protitumorske imunske odzive. Z zanesljivim določanjem povečanja ali zmanjšanja količine celic Treg v vzorcih tumorskih tkiv, bi tako lahko ugotavliali trenutno stanje ter spremljali poslabšanje oz. izboljšanje poteka bolezni glede na izbrani način zdravljenja. S klinično dobro uveljavljeno metodo pretočne citometrije lahko določamo deleže celic Treg, ki jih opredelimo kot $CD4^+CD25^{\text{visoko}}CD127^{\text{nizko}}(\text{FOXP3}^+)$ limfocite T. Vendar za tovrstno analizo potrebujemo suspenzijo preiskovanih celic, katere najlažje dostopni vir je periferna krv. Na področju kvantifikacije celic Treg v trdih tkivih pa nimamo na razpolago zanesljivih metod, ki bi bile, tako kot pretočna citometrija, hkrati dovolj enostavne in hitre. V literaturi smo zasledili podatke o epigenetski metodi za določanje deležev naravnih limfocitov Treg (nTreg) glede na celokupno število celic T, tako v vzorcih trdih tkiv kot tudi v vzorcih periferne krvi. Z namenom, da bi določili deleže celic nTreg v vzorcih periferne krvi bolnikov s hormonsko odpornim rakom prostate in vzorcih krvi zdravih oseb z epigenetsko metodo, smo optimizirali verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (qPCR) za določanje demetiliranega genskega področja gena FOXP3, specifičnega za celice nTreg in demetiliranega genskega področja gena CD3, specifičnega za limfocite T. Izolirane deoksiribonukleinske kisline (DNA) iz vzorcev smo bisulfitno pretvorili in s pomočjo optimizirane reakcije qPCR z metodo eksternega plazmidnega standarda absolutno kvantificirali celice nTreg in celokupne limfocite T ter izračunali delež nTreg v vzorcih. Nato smo primerjali deleže celic nTreg v vzorcih bolnikov in zdravih oseb. Prav tako smo primerjali deleže celic nTreg, določene z epigenetsko metodo, s tistimi, ki smo jih izračunali na osnovi rezultatov pretočne citometrije ($CD4^+CD25^{\text{visoko}}CD127^{\text{nizko}}$ limfociti T), in sicer v istih vzorcih, ter rezultate statistično ovrednotili. Z našo epigenetsko metodo nismo zaznali višjih deležev celic nTreg v vzorcih bolnikov v primerjavi z zdravimi osebami. Ugotovili smo tudi, da epigenetsko določani deleži celic nTreg niso korelirali z rezultati pretočne citometrije. To pa seveda pomeni, da bo

potrebno našo metodo še dodatno optimizirati in primerjalno ovrednotiti na večjem številu vzorcev.

KLJUČNE BESEDE

Epigenetika, metilacija DNA, regulatorni limfociti T, jedrni transkripcijski dejavnik FOXP3, pretočna citometrija

ABSTRACT

Regulatory T cells (Treg) regulate the intensity and duration of cellular immune responses. Their reduced activity contributes to development of allergies and autoimmune diseases, while their enhanced activity in tumor tissues is associated with development and maintenance of microenvironment that prevents local immune responses against tumors. Therefore with reliable determination of increased or decreased quantities of Treg cells in certain tumor tissues we could assess current state of disease and monitor its deterioration or improvement related to current treatment. The proportion of Treg cells can be determined by already well-established method of flow cytometry. These cells are defined and analysed as $CD4^+CD25^{\text{high}}CD127^{\text{low}}(\text{FOXP3}^+)$ lymphocytes T. However, we need cell suspensions for this kind of analysis and the most accessible source is peripheral blood. There is a lack of reliable alternative methods for quantification of Treg cells in solid tissues that would be simple and time saving like flow cytometry. In the literature we found data on epigenetic determination of proportions of natural Treg cells (nTreg) among lymphocytes T ($CD3^+$) in solid tissues and blood samples. In order to determine the proportions of nTreg cells in peripheral blood of patients with hormone resistant prostate cancer and healthy individuals with our in-house epigenetic method, we have optimized quantitative polymerase chain reaction (qPCR) for determination of Treg-specific demethylated regions within the FOXP3 gene and lymphocyte T-specific demethylated regions within the CD3 gene. Deoxyribonucleic acids (DNA) isolated from samples to be tested were first treated with bisulfite and then analysed by the optimized qPCR reaction, using external plasmid standard for determination of absolute quantities of nTreg and total population of lymphocytes T. Then the proportions of nTreg cells in all tested samples were calculated and compared between the group of patients and the group of healthy individuals. We also compared proportions of nTreg cells determined by the epigenetic method with those calculated from the results of flow cytometry analysis ($CD4^+CD25^{\text{high}}CD127^{\text{low}}$ lymphocytes T), using identical samples. The results were statistically evaluated. With our epigenetic method we did not detect higher proportions of nTreg cells in samples of patients, compared to those determined in samples of healthy

individuals. We have also found that epigenetically determined proportions of nTreg cells did not correlate with those calculated from flow cytometry data. This means that our method still needs further optimization and far more extensive comparative evaluation using a large number of samples.

KEY WORDS

Epigenetics, DNA methylation, regulatory T cells, FOXP3 nuclear transcription factor, flow cytometry

SEZNAM OKRAJŠAV

DNA – deoksiribonukleinska kislina (ang. deoxyribonucleic acid)

ncRNA – nekodirajoča ribonukleinska kislina (ang. non-coding ribonucleic acid)

DNMT – metiltransferaza DNA

DNMT3a in DNMT3b – vrsti metiltransferz DNA

APC – antigen-predstavitevne celice

CD – označevalec pripadnosti (ang. Cluster of differentiation)

Th – celice T pomagalke, podvrsta limfocitov T (ang. Helper T cells)

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

nTreg – naravni regulatorni limfociti T

iTreg – inducirani regulatorni limfociti T

oTL – celokupni limfociti T (ang. Overall T-lymphocytes)

Tr1 – podvrsta induciranih regulatornih limfocitov T

NK – naravne celice ubijalke (ang. Natural killer cells)

IL – interlevkin

IFN γ – interferon gama

CTLA-4 – z limfociti T povezan citotoksični protein 4 (ang. Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4)

GITR – z glukokortikoidi inducirani receptor iz družine tumorje nekrotizirajočih dejavnikov (ang. Glucocorticoid-induced TNFR family receptor)

FOXP3 – jedrni transkripcijski dejavnik (ang. Forkhead Box P3)

FALS – prednje sisanje svetlobe (angl. forward angle light scatter)

RALS – stransko sisanje svetlobe (angl. right angle light scatter)

PBMC – mononuklearne celice iz periferne krvi (ang. Peripherel blood mononuclear cells)

PHK – poglavitni kompleks tkivne skladnosti

PCR – verižna reakcija s polimerazo DNA (ang. Polymerase chain reaction)

qPCR – kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času (ang. Quantitative polymerase chain reaction)

rpm – obrati na minute (ang. Rounds per minute)

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

TGF- β – transformirajoči rastni dejavnik beta (ang. Transforming growth factor beta)

TSDR – demetilirano gensko področje, specifično za celice Treg (ang. Treg-specific demethylated region)

dNTP – mononukleotidi, gradniki DNA (adenin, gvanin, citozin, timin)

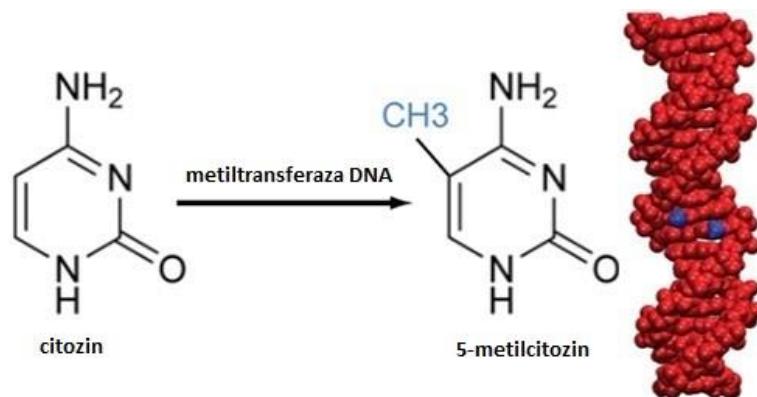
1 UVOD

1.1 DEFINICIJA EPIGENETIKE IN VLOGA METILACIJE DNA

Izraz *epigenetika* je prvi opisal Conrad Waddington leta 1942. Epigenetiko je opredelil kot vejo biologije, ki proučuje medsebojno delovanje genov in njihovih produktov, kar v končni fazi iz fenotipa naredi bitje. S tem je zajel vse molekulske poti, ki vplivajo na izražanje genotipa v določen fenotip (1). Definicija epigenetike se je skozi zgodovino spremnjala sočasno z napredovanjem znanja in razumevanja na področju evolucije. Njeno današnje pojmovanje temelji na dejstvu, da se, kljub temu da je nukleotidno zaporedje DNA v vseh somatskih celicah organizma enako, vzorci izražanja genov bistveno razlikujejo med različnimi vrstami celic, poleg tega pa se prenašajo z dedovanjem na potomce posameznih celičnih klonov (2). Ta dognanja so vodila v delovno definicijo epigenetike, ki se glasi, da je to »veda, ki proučuje dedne spremembe v izražanju genov, ki niso posledica neposrednih sprememb v zaporedju nukleotidov DNA«. Med najpomembnejše epigenetske mehanizme uvrščamo post-translacijske spremembe aminokislin na N-koncih histonov (npr. acetilacija in metilacija), post-transkripcijsko uravnavanje izražanja genov z nekodirajočimi ribonukleinskimi kislinami (ncRNA) in metilacijo DNA (3).

Metilacija DNA je eden najbolj raziskanih epigenetskih mehanizmov. Celice jo uporabljajo za kontrolo izražanja genov, kar sta že pred letom 1980 predvidela McGhee in Ginder, zato sta raziskala metilacijski status genskega lokusa za beta globin v celicah, ki ta gen izražajo in v tistih, ki ga ne. Ugotovila sta, da je omenjeni lokus pretežno nemetiliran v celicah, ki izražajo gen za beta globin in pretežno metiliran v tistih, ki ga ne izražajo. Danes vemo, da je metilacija DNA dedni epigenetski označevalec utišanja genov, ki ima pomembno vlogo v številnih celičnih procesih, vključno z razvojem zarodka, genetskim vtisnjanjem, inaktivacijo kromosoma X in ohranjanjem stabilnosti kromosomov. Ob vsem tem ni presenetljivo, da znanstveniki povezujejo napake v metilaciji DNA s številnimi boleznimi in intenzivno raziskujejo to področje (4).

Raziskave so usmerjene v razumevanje, kako metilacija DNA poteka in na katerih mestih DNA se pojavlja. Pri evkariontih ta reakcija poteče na mestu C-5 citozina. Ta se s pomočjo encima metiltransferaza DNA (DNMT) pretvori v 5-metilcitozin (Slika 1).



Slika 1: Reakcija metilacije citozina na mestu C-5 in pozicije metiliranih nukleotidov v 3D struktturnem modelu molekule DNA. Prijejeno po (5).

Encima DNMT3a in DNMT3b katalizirata prvo oz. osnovno pripenjanje metilne skupine na zaporedje DNA, ki je kot *de novo* metilacija DNA med drugim bistvenega pomena tudi za normalen razvoj zarodka. Encim DNMT1 pa kot vzdrževalna DNMT skrbi, da nastane ustrezni vzorec metiliranih nukleotidov tudi na kopiji obstoječe matrične DNA med replikacijo, kar pomeni, da se metilacija DNA ohranja tekom mitoze (3). Pri sesalcih metilacija DNA večinoma poteče na citozinah dinukleotida CG in sočasno na obeh diagonalno pozicioniranih C v komplementarni verigi DNA (4). Izjema so otočki CpG, ki so z dinukleotidi CG bogate regije DNA dolžine od 200 bp do nekaj kb parov in so pogosto nemetilirani. Ker se običajno nahajajo v promotorskih področjih genov, najverjetneje vplivajo na njihovo transkripcijo. Predvidevajo namreč, da metilacija otočkov CpG v teh področjih blokira prepisovanje genov, saj onemogoča vezavo transkripcijskih dejavnikov in vzpodbuja delovanje zaviralnih molekul na transkripcijo, kot so histonske deacetilaze in proteini, ki vežejo metilne skupine. Prve povzročijo nastanek pozitivnega naboja na repih histonov, s katerimi se tesno vežejo na DNA z negativnim naboljem. Posledično nastane kompaktna struktura imenovana heterokromatin, v kateri je kromatin nedostopen za transkripcijske mehanizme (3, 4, 6).

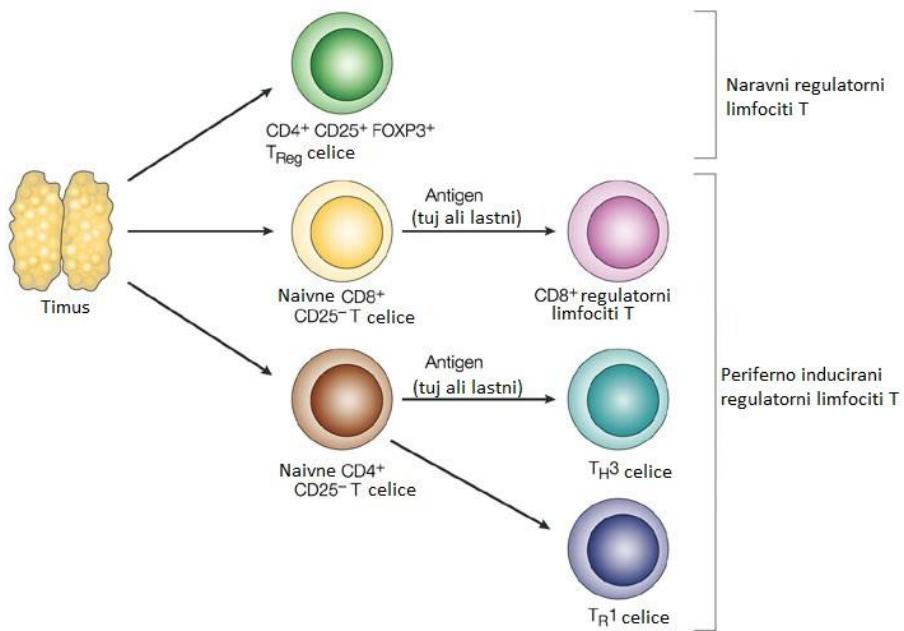
Tako so trenutno pod drobnogledom tiste bolezni, ki naj bi bile posledica nepravilnosti v metilaciji DNA, npr. rak, lupus, mišična distrofija in številne kongenitalne nepravilnosti, ki so posledica defektnih mehanizmov genetskega vtisnjenja. Še posebej veliko raziskav je usmerjenih v proučevanje mehanizmov rakavih obolenj in uravnavanja izražanja tumorsupresorskih genov, ki ga pogosto utiša prav hipermetilacija DNA. Zanimivo je tudi dejstvo, da je genom rakave celice v primerjavi z genomom zdrave celice v splošnem hipometiliran. Obstajajo pa določena hipermetilirana področja genov rakavih celic, ki sodelujejo v regulaciji celičnega cikla, invaziji tumorskih celic, popravljanju DNA in podobno. Njihovo gensko utišanje povzroči metastaziranje tumorjev. Pri nekaterih rakavih boleznih, kot je npr. rak debelega črevesja, lahko tovrstno hipermetilacijo zaznamo že zelo zgodaj, zato nam služi kot dober biološki označevalec prisotnosti obolenja (4).

1.2 NASTANEK IN VLOGA REGULATORNIH LIMFOCITOV T V IMUNSKEM SISTEMU

Homeostaza imunskega sistema je ključnega pomena za uravnovezeno fiziološko stanje in zdravje človeka. Efektorske celice imunskega sistema se ob prepoznavi antiga aktivirajo in sprožijo imunski odziv. Vrsto, obseg in trajanje le-tega pa uravnavajo tako številni topni dejavniki (citokini) kot tudi določene vrste imunskeih celic z imunosupresivnimi lastnostmi. Med efektorske imunske celice uvrščamo naravne celice ubijalke (celice NK), limfocite B, CD4⁺ limfocite T (podvrste Th1, Th2 in Th17) in citotoksične CD8⁺ limfocite T. Njim nasprotno delajoče celice pa so regulatorni CD4⁺ in CD8⁺ limfociti T ter antigenpredstavljive celice (APC) (7). V novejšem času so naravni regulatorni limfociti T (nTreg) deležni velike pozornosti raziskovalcev, saj bi z razumevanjem njihovega delovanja lahko razjasnili vzroke za nastanek različnih avtoimunskeih bolezni, mehanizme njihovega poteka, poleg tega pa tudi razvili nove načine zdravljenja teh kroničnih patoloških stanj. Limfociti nTreg so tudi pomembni pokazatelji rakavih obolenj, saj so v nekaterih študijah ugotovili, da je njihovo zvišano število v nekaterih tumorskih tkivih tesno povezano z napredovanjem bolezni oz. z neučinkovitostjo zdravljenja (8, 9).

Regulatorni limfociti T so ključnega pomena za zaviranje T-celičnih imunskeih odzivov na telesu lastne in tuge antigene. Glede na mesto njihovega nastanka jih delimo na naravne celice

Treg (nTreg) in inducirane celice Treg (iTreg). Naravne celice nTreg nastajajo v timusni sredici med dozorevanjem enojno pozitivnih ($CD4^+$ in $CD8^+$) timocitov, nato pa preko krvi potujejo na periferijo, kjer vzdržujejo specifično toleranco na večino telesu lastnih antigenov (Slika 2). Kadar je to potrebno, aktivno preko tesnih medceličnih stikov z APC in efektorskimi limfociti T, specifično zavirajo aktivacijo in proliferacijo aktiviranih klonov limfocitov T in B, poleg tega pa posredno tudi proizvodnjo imunoglobulinov in menjavo imunoglobulinskih razredov. Značilno za nTreg je, da izražajo molekule CD25 in FOXP3 (7, 9, 10). Inducirane celice iTreg nastanejo na periferiji v specifičnih pogojih mikrookolja. Tako lahko ob stimulaciji z antigenom ter v prisotnosti visokih koncentracij IL-10 v tolerogenem okolju, spominski limfociti T diferencirajo v $CD4^+$ iTreg, vrste Tr1. Njihovo imunosupresivno delovanje poteka preko proizvajanja in izločanja IL-10. Zanje je značilno da ne izražajo molekul CD25 in FOXP3 (Slika 2). Inducirani limfociti iTreg vrste Th3 nastanejo na periferiji iz naivnih $CD4^+CD25^-$ limfocitov T, v prisotnosti TGF- β (Slika 2). Imunosupresivno delujejo tako, da proizvajajo in izločajo TGF- β , IL-4 in IL-10. Za razliko od limfocitov Tr1 izražajo molekule CD25 in FOXP3 (7, 10, 11, 12). Kot inducirane regulatorne celice lahko delujejo tudi podvrste $CD8^+$ imfocitov T, za katere je značilno, da zavirajo sekundarne imunske odzive, nastanejo pa iz izrazito diferenciranih celic $CD8^+$, v prisotnosti ustreznega antiga in IL-10. Imunske odzive zavirajo s proizvajanjem in izločanjem citokinov (IFN γ , IL-6 in IL-10) ter izražajo molekulo FOXP3 (Slika 2) (10).



Slika 2: Shematski prikaz izvora in nastanka naravnih in induciranih regulatornih limfocitov T. Prijejeno po (13).

1.3 VLOGA Treg PRI RAZVOJU TUMORJA

Porušeno ravnovesje homeostaze imunskega sistema na stran povečane količine imunosupresivnih komponent lahko privede do nebrzdanega razraščanja tumorskega tkiva zaradi blokade protitumorskih imunskih odzivov (7). Izsledki številnih študij nakazujejo, da naj bi bilo število limfocitov nTreg v tumorskih tkivih statistično značilno večje kot v zdravih tkivih. Za imunosupresivno delovanje nTreg na efektorske CD4⁺ Th celice in CD8⁺ citotoksične limfocite T so potrebni tesni medcelični stiki in stimulacija z antigenom. Predvsem clice hitro rastočih tumorjev na svojih površinah izražajo za tumor specifične antigene, ki jih prepoznavajo ustrezni kloni efektorskih CD4⁺ in CD8⁺ limfocitov T in nTreg. V tumorskem tkivu se zaradi prisotnosti omenjenih antigenov kot tudi intenzivne kemotakse in izrazito protivnetnega mikrookolja močno poveča količina celic nTreg. Te skupaj z drugimi vrstami celic in številnimi topnimi biogenimi dejavniki omogočajo vzpostavitev in vzdrževanje imunske tolerance na tumor in nakazujejo poslabšanje prognoze (8, 11).

Nasprotno pa prisotnost nTreg v tumorjih, ki se nahajajo v okolju, v katerem je veliko vnetnih dejavnikov, uravnava kronično vnetje ter tako preprečuje poškodbe tkiv, s tem pa omejuje razvoj novotvorb, ki jih povezujejo z vnetjem. Tako je pri bolnikih z rakom debelega črevesja ali dojke in pri tistih z limfomom prisotnost povečanega števila nTreg povezana z izboljšano prognozo poteka bolezni (14). Tudi v tumorskem tkivu glioblastoma so našli povečano število infiltriranih nTreg, vendar pa tega niso uspeli s statistično značilnostjo povezati z zmanjšanjem možnosti za preživetje bolnikov (15).

1.4 KVANTIFIKACIJA LIMFOCITOV nTreg

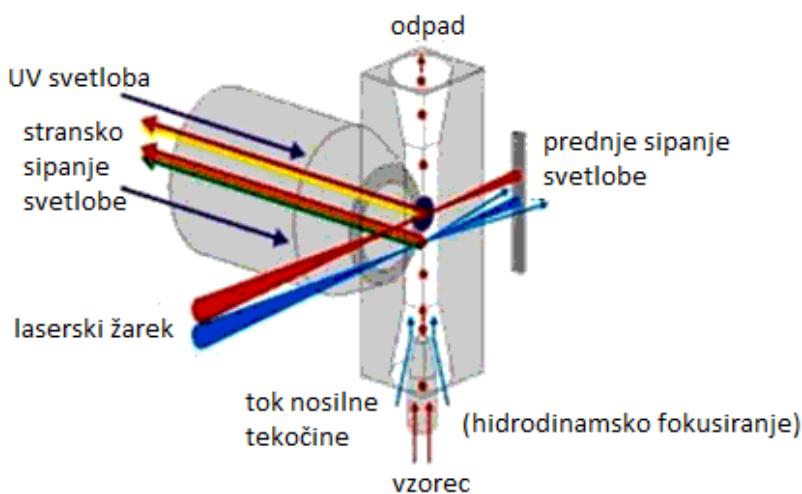
Celice nTreg fenotipsko definiramo kot tiste limfocite T, ki izražajo površinske molekule CD3, CD4, CD25 in znotrajcelični jedrni transkripcijski dejavnik FOXP3. Dodatni molekulski označevalci, ki omogočajo še večjo specifičnost pri izolaciji in vrednotenju nTreg so: CD127, CTLA4, GITR, CD45RA in CD103 (16).

Celice na svoji površini izražajo glikoproteine in glikolipide, ki opredeljujejo njihovo vrsto in stopnjo diferenciacije, poleg tega pa imajo tudi določeno funkcijo. Predstavljajo antigene, ki jih lahko identificiramo z monoklonskimi protitelesi, te pa uvrščamo v sistem »Cluster of Differentiation« (CD) (Preglednica I) (10, 17).

Preglednica I: Razredi molekulskih označevalcev, s katerimi opredeljujemo nTreg (17, 18).

Monoklonsko protitelo	Celice T, ki površinsko izražajo specifične molekule (antigene)	Funkcija izraženih molekul
CD3	Limfociti T	Komponenta TCR
CD4	Th - celice T pomagalke	Receptor PHK razreda II
CD8	Tc - citotoksični limfociti T	Receptor PHK razreda I
CD25	Aktivirani limfociti T in regulatorni limfociti T	Veriga α receptorja za IL-2
CD45RA	Naivni limfociti T	Regulacija prenosa signala preko T celičnega receptorja
CD103	Intraepitelni limfociti T	Vračanje in zadrževanje celic T v mukozi
CD127	Zrele, naivne in spominske celice T (Treg ne izražajo CD127)	Veriga α receptorja za IL-7

Količino limfocitov Treg lahko določimo s pretočno citometrijo neposredno v vzorcu priferne krvi ali pa v suspenziji mononuklearnih celic, izoliranih iz periferne krvi (PBMC), in sicer kot celice $CD4^+CD25^{\text{visoko}}CD127^{\text{nizko}}FOXP3^+$ (11). Pri pretočni citometriji celice v suspenziji posamično potujejo skozi laserski žarek, ki presvetljuje kapilaro. Svetlobo, ki neovirano preide skozi tok celic v kapilari, kot »prednje sipanje« zazna detektor FALS, nekaj pa se je razprši oz. odbije od celic v pravokotni smeri in jo kot »stransko sipanje« zazna detektor RALS (Slika 3).



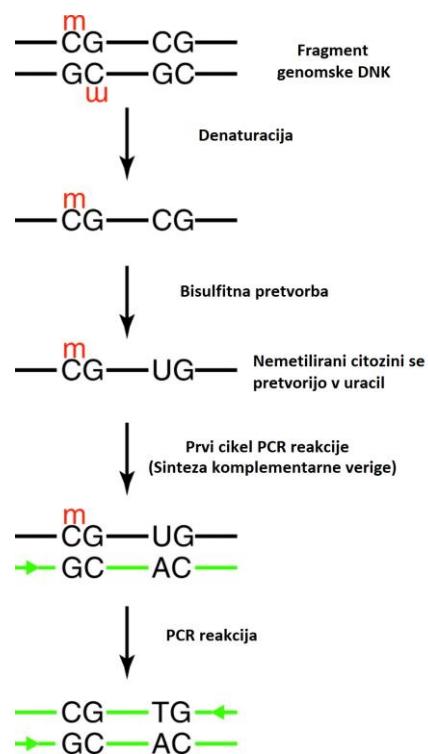
Slika 3: Shematski prikaz delovanja pretočnega citometra. Prikejeno po (19).

Prednje sipanje nam da informacijo o velikosti celic, stransko pa o njeni zgradbi oziroma granuliranosti. Celice imunskega sistema lahko s pretočno citometrijo specifično identificiramo in kvantificiramo z uporabo ustreznih fluorescenčno onačenih monoklonskih protiteles. Fluorokromi ob ekscitaciji s svetlobo določene valovne dolžine emitirajo elektromagnetno valovanje z višjo valovno dolžino, ki ga zaznamo z detektorji. Valovna dolžina emitirane svetlobe nam omogoča identifikacijo celic, njena intenziteta pa njihovo kvantifikacijo (20).

V zadnjih nekaj letih poročajo o uporabnosti specifičnega demetiliranega področja (TSDR) na lokusu za gen FOXP3 kot enega najbolj specifičnih epigenetskih označevalcev Treg (9, 16). Otočki CpG v tem lokusu naj bi bili v DNA naivnih $CD4^+CD25^-$ celic T, aktiviranih $CD4^+$ celic T in induciranih limfocitov iTreg pretežno metilirani, zato lahko te vrste celic le

prehodno izražajo molekule FOXP3, medtem ko so v naravnih nTreg popolnoma demetilirani, posledica česar je konstitutivno izražanje znotrajceličnih molekul FOXP3 (6, 9, 12).

Stopnjo metilacije DNA lahko določimo z metilacijsko specifično reakcijo PCR, pri čemer moramo predhodno izvesti bisulfitno pretvorbo, tako da inkubiramo tarčni odsek DNA ali celotno genomske DNA z natrijevim bisulfitom. S tem namreč povzročimo pretvorbo vseh nemetiliranih citozinov v uracile, medtem ko ostanejo metilirani nespremenjeni. Iz bisulfitno pretvorjenega odseka DNA dobimo po reakciji PCR, ki v pomnoženih produktih uracil nadomesti s timinom, na nemetilirani sekvenci DNA iz dinukleotidov CpG dinukleotide TpG (različica TpG), na metilirani pa ostanejo dinukleotidi CpG nepretvorjeni (različica CpG) (Slika 4) (21).



Slika 4: Potek bisulfitne pretvorbe DNA in nadaljne reakcije PCR metiliranega in nemetiliranega dinukleotida CpG. Pritejeno po (21).

Omenjena epigenetska metoda nam torej lahko služi za identifikacijo celic nTreg, saj bisulfitno pretvorjena področja TSDR gena FOXP3 vsebujejo veliko dinukleotidov TpG, medtem ko ostanejo v ostalih limfocitih T ta področja nespremenjena (različica CpG). Z izbiro

ustreznih oligonukleotidnih začetnikov za specifično pomnoževanje bisulfitno pretvorjenega odseka gena FOXP3 (različica TpG) z reakcijo PCR, lahko določimo delež celic nTreg v preiskovanem vzorcu glede na celotno količino limfocitov T ($CD3^+$). Specifični epigenetski označevalec za določanje celokupnega števila limfocitov T (oTL) v vzorcu je izražanje gena za CD3, saj naj bi se po bisulfitni pretvorbi vsi dinukleotidi CpG intergenskega področja CD3D/CD3G popolnoma pretvorili v varianto TpG, tako v $CD4^+$ (vključno z nTreg) kot $CD8^+$ limfocitih T. Nasprotno pa te regije v granulocitih, monocitih, limfocitih B in celicah NK ostanejo kot CpG različica. S pomočjo tega sistema so Olek in sod. določili deleže nTreg in oTL v vzorcih tumorskih tkiv bronhijev, debelega črevesja in jajčnikov in ugotovili, da je infiltracija oTL v tumorska tkiva povezana z boljšo prognozo bolezni, ter da je razmerje nTreg/oTL v tumorskih tkivih statistično značilno spremenjeno v primerjavi z zdravimi tkivi. Skupno so analizirali 616 vzorcev tkiv zdravih oseb in tumorskih tkiv bolnikov z rakom jajčnikov, debelega črevesja ali bronhijev in zaznali porast mediane razmerij nTreg/oTL s 3-8% v zdravih, na 18-25% v tumorskih tkivih. Z vzpostavljenou epigenetsko metodo so nato analizirali še 17 vzorcev periferne krvi in rezultate primerjali s tistimi, ki so jih v istih vzorcih določili s pretočno citometrijo. Naravne limfocite nTreg so s pretočno citometrijo določali kot celice $CD4^+CD25^+CD127^-$, oTL pa kot $CD3^+$. Deleži nTreg in oTL, ter razmerja nTreg/oTL, ki so jih določili z epigenetsko metodo so močno korelirali tistimi, ki so jih pridobili s pretočno citometrijo (16).

2 NAMEN DELA

Regulatorni limfociti T (Treg) so vpleteni v nastanek tolerogenega okolja v tumorskih tkivih, s čimer preprečujejo protitumorske imunske odzive in olajšajo razrast tumorjev. Danes še vedno iščemo posamezen specifičen biološki označevalec, s pomočjo katerega bi lahko natančno določali deleže Treg, prisotnih tako v bioptičnih vzorcih tumorjev kot tudi periferni krvi bolnikov. Zato nameravamo v okviru magistrskega dela optimizirati metodo PCR v realnem času (qPCR) za epigenetsko določanje deležev nTreg v vzorcih periferne krvi in trdnih tkiv, ki so jo že predhodno vzpostavili na Katedri za klinično biokemijo (22). Da bi lahko primerjali deleže Treg dobljene z epigenetsko metodo s tistimi, ki so bili določeni z metodo pretočne citometrije, bomo meritve izvedli na večjem številu vzorcev periferne krvi. S pomočjo vnaprej načrtovanega plazmidnega standarda za različico TpG v genu za FOXP3 in CD3 bomo s postopkom verižne reakcije s polimerazo DNA v realnem času (qPCR) izdelali 2 umeritveni krivulji, in sicer po eno za vsako od omenjenih genskih področij. Uporabili ju bomo za določitev količine limfocitov T (oTL) v preiskovanih vzorcih in deležev celic Treg znotraj teh.

Preiskave bomo izvedli na 5 vzorcih periferne krvi zdravih oseb in več vzorcih periferne krvi 4 bolnikov s hormonsko odpornim rakom prostate, odvzetih pred, med in po imunski modulaciji, v časovnem razponu do enega leta. Pričakujemo, da se bodo vplivi imunske modulacije odražali v dinamičnih spremembah deležev nTreg, ki jih bomo podali v obliki razmerij nTreg/oTL. Deleže nTreg v vzorcih bolnikov s hormonsko odpornim rakom prostate bomo primerjali tudi z deleži teh celic v vzorcih zdravih oseb in ugotavljalci ali so ti pri bolnikih višji kot pri zdravih osebah. Deleže nTreg, ki jih bomo določili v posameznih vzorcih bolnikov, bomo primerjali s tistimi, ki so jih predhodno, v istih vzorcih, določili s pretočno citometrijo na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo (IMI) Medicinske fakultete, Univerze v Ljubljani. Rezultate bomo statistično ovrednotili in ugotavljalci ali je naša epigenetska metoda za določanje deležev limfocitov T primerljiva z metodo pretočne citometrije.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Plazmidni standard

Standard: Plazmid pGOv4, 100 ng/µL, različica TpG

Molekulska masa: 2.085.820,4 g/mol

Številno baznih parov: 3.376

Proizvajalec: Gene Oracle Inc., Santa Clara, Kalifornija, ZDA

Nukleotidno zaporedje genskih regij CD3 in FOXP3 (5'→ 3'):

gccccgc **CCTAAACACTACCACATCTCAAAACCCCTTAAAAAAAACCATCAACC**
CCATAACACAAACCATAACAACCAAATTCT gatc **GTTTTGATTGTTAGATT**
TTTTGTTATTGATGTTATGGTGGTTGGATGTGTTGGTTTATTGATATTAT
GGAGGAAGAGAAGAGG ctcgac

3.1.2 Oligonukleotidni začetniki (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)

Preglednica II: Nukleotidno zaporedje oligonukleotidnih začetnikov za reakcijo qPCR.

Smerni (F) in protismerni (R) oligonukleotid	Nukleotidno zaporedje (5'→ 3')	Dolžina (število nukleotidov)
FOXP3_TpG_F_RT	GTTTTGATTGTTAGATTTTTTGTT	28
FOXP3_TpG_R_RT	CCTCTTCTCTCCTCCATAATATCA	25
CD3_TpG_F_RT	CCTAAACACTACCACATCTCAA	22
CD3_TpG_R_RT	AGAAATTAGTTGTTATGGTTGT	24

3.1.3 Reagenti

Preglednica III: Uporabljeni reagenti, ki so bili komercialno dobavljeni.

REAGENT	PROIZVAJALEC
Restriktijski encim AhDI, 10.000 U/mL	BioLabs Inc., Ipswich, Anglija
CutSmart™ Buffer, 10x concentrated	BioLabs Inc., Ipswich, Anglija

Water, Molecular Biology Reagent	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
Sybr® Select Master Mix	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ZDA
Absolutni etanol za analizo, ISO, Ph.Eur.	Merck, Darmstadt, Nemčija
Kompetentne celice One shot® TOP10 Chemically Competent <i>E. Coli</i>	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ZDA

Preglednica IV: Uporabljeni reagenti in gojišča, ki smo jih pripravili v laboratoriju.

V LABORATORIJU PRIPRAVLJENI REAGENTI OZ. GOJIŠČA	KONCENTRACIJA / SESTAVA
Redčitve plazmidnih standardov	12.500, 2.500, 500, 100, 20, 4 molekul plazmida / μL
Redčitve oligonukleotidnih začetnikov	5 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$, 30 $\mu\text{mol/L}$
Tekoče gojišča LB (Luria-Bertani)	25 g gojišča LB (10 g tripton, 10 g NaCL, 5 g kvasni ekstrakt), 1 L prečiščene vode
Agar ploščice LB (Luria-Bertani) z antibiotikom	za 15-16 ploščic: 400 mL prečiščene vode, 8 g gojišča LB, 6 g agarja, 400 μL ampicilina
3 % hipoklorit za čiščenje površin	30 ml hipoklorita za čiščenje površin, 970 ml prečiščene vode
10 % etanol za čiščenje površin	100 ml 96 % etanola za čiščenje površin, 900 ml prečiščene vode
70 % etanol za čiščenje površin	700 ml 96 % etanola za čiščenje površin, 300 ml prečiščene vode

3.1.4 Reagenčni kompleti za pripravo reakcij in čiščenje DNA

Preglednica V: Uporabljeni reagenčni kompleti za izolacijo in čiščenje DNA ter izvajanje reakcij bisulfitne pretvorbe DNA.

REAGENČNI KOMPLET	PROIZVAJALEC
QIAprep® Spin Miniprep Kit, Cat. No. 27104/27106	QIAGEN GmbH, Hilden, Nemčija

QIAquick® PCR Purification Kit (50), Cat. No. 28104	QIAGEN GmbH, Hilden, Nemčija
Sestav za bisulfitno pretvorbo - EpiTect® Fast Bisulfite Kit (50), Cat. No. 59824	QIAGEN GmbH, Hilden, Nemčija

3.1.5 Aparature in laboratorijska oprema

Preglednica VI: Uporabljene aparature in laboratorijska oprema.

APARATURA OZ. LABORATORIJSKA OPREMA	PROIZVAJALEC
Namizna centrifuga Mini Centrifuge NG002G	Nippon Genetics Europe GmbH, Dueren, Nemčija
Namizna centrifuga za bisulfitno pretvorbo vzorcev Mini Spin	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Centrifuga za peletiranje celic Centrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Kapljični spektrofotometer Nanodrop® ND 1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ZDA
Termostatiran stresalnik Environmental Shaker-Incubator ES-20	Biosan, Riga, Latvija
Ciklični termostat C1000™ Thermal Cycler	BIO-RAD Laboratories Inc., Kalifornija, ZDA
Delovna komora za PCR DNA/RNA UV-CLEANER UVT-S-AR	Biosan, Riga, Latvija
Ciklični termostat Real-Time PCR LightCycler® 480	Roche Diagnostic Deutchland GmbH, Mannheim, Nemčija
Mikrotitrskie ploščice s pokrivno folijo LightCycler® Multiwell Plate 384, clear, with sealing foils	Roche Diagnostic Deutchland GmbH, Mannheim, Nemčija
Centrifuga za mikrotitrskie ploščice CENTRIC 322A	Domel-Tehnica, Železniki, Slovenija
Avtoklav Laboklav 25	Steriltechnik AG, Magdeburg, Nemčija

3.1.6 Računalniški programi

Preglednica VII: Računalniški programi, ki smo jih uporabili za izvedbo reakcij PCR, meritve koncentracij in čistote DNA ter statistično obdelavo rezultatov.

RAČUNALNIŠKI PROGRAM	PODROČJE UPORABE IN PROIZVAJALEC
Light Cycler 480 Software, Version 1.4	Izvajanje reakcij PCR; Roche Diagnostic Deutschland GmbH, Mannheim, Nemčija
NanoDrop1000 Version 3.8.1	Meritve koncentracij s kapljičnim spektrofotometrom; Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ZDA
GraphPad Prism Version 6.05	Statistični izračuni, grafi; GraphPad Software, Kalifornija, ZDA

3.1.7 Biološki material

Testirani vzorci: DNA izolirana iz vzorcev periferne krvi bolnikov s hormonsko odpornim rakom prostate in vzorcev levkocitnih koncentratov (BC – ang. buffy coat) zdravih oseb (krvodajalcev). Krvne vzorce bolnikov so skladno s protokolom klinične študije odvzeli na Kliničnem oddelku za urologijo Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani, vzorce BC krvodajalcev pa na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino (ZTM) v Ljubljani. Izolacije DNA so bile izvedene na Katedri za klinično biokemijo, Fakultete za farmacijo. Klinično študijo je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko (št. 91/03/10, z dne 06.04.2010).

Vzorce periferne krvi so posameznemu bolniku (P6, P9, P13, P14), ki je bil vključen v klinično študijo odvzeli pred začetkom imunske modulacije (Levkafereza), nato pa pred vsakim imunomodulatornim tretmajem 1. (V1 - V4) in 2. faze (V1a – V4a) ter ob preverjanjih imunske odzivnosti *in vivo* (DTH) (Preglednica VIII).

Preglednica VIII: Podatki o testiranih vzorcih periferne krvi bolnikov in vzorcih levkocitnih koncentratov zdravih oseb.

Bolnik P6	Bolnik P9	Bolnik P13	Bolnik P14	Zdrave osebe
P6 Levkafereza 02/10/14	P9 Levkafereza 15/10/14	P13 Levkafereza 11/03/15	P14 Levkafereza 18/03/15	BC P1 2. 29/4/14
P6 V1 24/10/14	P9 V1 19/11/14	P13 V1 14/04/15	P14 V1 24/04/15	BC P3 2. 9/5/14
P6 V2 18/11/14	P9 V2 10/12/14	P13 V2 05/05/15	P14 V2 15/05/15	BC P3 4. 24/6/14
P6 V3 09/12/14	P9 V3 30/12/14	P13 V3 26/05/15	P14 V3 09/06/15	BC P5 1. 13/5/14
P6 V4 30/12/14	P9 V4 21/01/15	P13 V4 16/06/15	P14 V4 23/06/15	
P6 V1a 24/02/15	P9 DTH 05/02/15	P13 DTH 30/06/15	P14 V1a 18/8/15	
P6 V2a 17/03/15	P9 V1a 19/03/15	P13 DTH 25/11/15	P14 DTH 04/11/15	
P6 V3a 08/04/15	P9 V2a 10/04/15	P13 DTH 22/12/15	P14 DTH 02/12/15	
P6 V4a 24/04/15	P9 V3a 29/04/15		P14 DTH 29/12/15	
P6 DTH 12/05/15	P9 V4a 21/05/15L			
P6 DTH 11/06/15				

3.2 METODE

3.2.1 Sterilizacija laboratorijskih pripomočkov in čiščenje delovnih površin

Pri delu smo se morali izogniti vsaki kontaminaciji z drugimi plazmidnimi fragmenti, celičnimi komponentami in bakterijami, zato smo pipetne nastavke in plastične mikropruvete sterilizirali z avtoklavom na temperaturi 121°C in pri tlaku 1,2 bara. Tako pripravljene smo

uporabljali največ 3 tedne. Pred vsakim delom smo laboratorijske površine dobro očistili s 70 % etanolom za čiščenje površin. Delovno komoro za pripravo reakcijskih zmesi PCR smo pred vsako uporabo prav tako očistili s 70 % etanolom za čiščenje površin. Ves laboratorijski pribor (pipete, škatlice s pipetnimi nastavki, steklene kozarce s plastičnimi mikropruvetami, centrifugo v komori, ravnilo, posodo za odpad) smo najprej očistili s 3 % hipokloritom in nato še s 70 % etanolom, predno smo ga prenesli v komoro. Vanjo smo postavili tudi mikrotitrsko ploščico, komoro zaprli in jo 30 min obsevali z UV svetlogo.

3.2.2 Transformacija krožnega plazmidnega standarda

Predhodno načrtovan in komercialno dobavljen plazmidni standard pGOv4 različice TpG smo namnožili s postopkom njegove transformacije v kompetentne bakterije *E. Coli*. Postopek smo izvedli skladno z navodili v priročniku One Shot® TOP10 Competent Cells Guide, Invitrogen (23).

Prilagoditve:

- v vialo kompetentnih celic smo pipetirali 3 µL načrtovanega in komercialno dobavljenega plazmidnega standarda pGOv4 različice TpG koncentracije 100 ng/µL;
- namesto 250 µL ogretega medija S.O.C smo v vialo dodali 250 µL na 37 °C ogretega tekočega medija LB;
- na LB-agar ploščico z antibiotikom smo tik ob plamenu sterilno nanesli 100 µL pripravljene zmesi transformiranega plazmida.

Naslednji dan smo v dve 20 mL centrifugirki odmerili po 5 mL tekočega gojišča LB in po 5 µL antibiotika ampicilina. S trdnega gojišča (agar LB) smo v vsako od centrifugirk ob plamenu sterilno prenesli po eno od obeh izbranih kolonij in ju čez noč stresali v termostatiranem stresalniku na 37 °C in 150 rpm.

3.2.3 Čiščenje krožnega plazmidnega standarda

Sledila je izolacija plazmida iz bakterijskih kultur, ki sta se čez noč razvili v obeh centrifugirkah z medijem LB. Plazmid smo iz obeh bakterijskih kolonij izolirali z reagenčnim kompletom Spin Miniprep Kit (Qiagen), v skladu s priloženimi navodili.

Prilagoditve:

- centrifugirki z bakterijskima kulturama smo centrifugirali 3 min na 9.000 rpm;
- plazmid smo iz kolon reagenčnega kompleta Spin Miniprep Kit eluirali v mikrocentrifugirki s po 30 µL prečiščene vode za molekularno biologijo.

3.2.4 Merjenje koncentracije in čistote izoliranega krožnega plazmidnega standarda

Koncentracijo in čistoto izoliranega krožnega plazmidnega standarda v obeh eluatih smo izmerili s kapljičnim spektrofotometrom Nanodrop®. Pred meritvijo smo raztopini izoliranega plazmida premešali na mešalu, da smo zagotovili homogenost raztopin in ju nato kratkotrajno centrifugirali v namizni centrifugi, da smo odstranili raztopino z notranje strani pokrovčka. Obe ročici merilnika smo očistili s papiranto brisačko. Na spodnjo ročico smo nanesli 1,5 µL prečiščene vode, jo poklopili z zgornjo ročico in zagnali inicializacijo aparata. Nato smo obe ročici osušili in na spodnjo ročico ponovno nanesli 1,5 µL prečiščene vode ter izvedli meritev slepega vzorca – elucijski medij. Ponovno smo osušili obe ročici in na spodnjo nanesli 1,5 µL raztopine plazmidnega standarda različice TpG iz kulture prve kolonije bakterij ter izvedli meritev. Postopek smo na enak način ponovili še za plazmidni standard različice TpG iz kulture druge kolonije bakterij.

Tako smo spektrofotometrično določili absorbance raztopin pri valovnih dolžinah 230, 260 in 280 nm. Aparat je povezan z računalnikom, ki izmerjene rezultate uredi in predstavi tabelično in grafično. Koncentracijo raztopine DNA izračuna na osnovi izmerjene absorbance pri 260 nm, čistost raztopine pa v obliki razmerja absorbanc 260 nm/280 nm in 260 nm/230 nm. Ustrezno čisto raztopino DNA imamo takrat, ko ima prvo razmerje vrednost okoli 1,8, drugo pa med 2,0 in 2,2. Nizka vrednost razmerja absorbanc 260 nm/280 nm kaže na prisotnost kontaminantov, ki absorbirajo pri valovni dolžini 280 nm (običajno proteini in fenoli), nizka vrednost razmerja absorbanc 260 nm/230 nm pa na prisotnost snovi, ki absorbirajo pri 230 nm (ostanki topil, npr. gvanidina, ki smo ga tudi mi uporabljali za izolacijo DNA) (24). Meritve smo izvajali na nastaviti za nukleinske kisline dsDNA-50, kar pomeni, da je izmerjena vrednost $A_{260} = 1$ kadar je v vzorcu 50 µg/mL dvoverižne DNA.

3.2.5 Linearizacija krožnega plazmidnega standarda

V dve 200 µL plastični mikropruveti smo odpipetirali reagente v vrstnem redu, ki je naveden v Preglednici IX. V vsako od reakcijskih zmesi smo nato dodali po 1.500 ng izoliranega krožnega plazmidnega standarda iz kulture prve oziroma druge kolonije bakterij.

Preglednica IX: Priprava reakcijske zmesi za linearizacijo plazmidnega standarda

REAGENT	Plazmid TpG, prva izbrana kolonija	Plazmid TpG, druga izbrana kolonija
Prečiščena voda (µL)	8,44	7,84
Pufer Cut Smart™ Buffer (µL)	3,00	3,00
Restriktijski encim AhdI (µL)	1,00	1,00
Izolirani plazmid (µL)	17,56	18,16
Skupni volumen reakcijske zmesi (µL)	30,0	30,0

Vsebini plastičnih mikropruvet smo na kratko premešali s pipeto in ju namestili v ciklični termostat. Reakcija linearizacije plazmidov je potekala 1 uro na 37 °C.

3.2.6 Čiščenje lineariziranega plazmidnega standarda

Plazmid smo iz restriktijske zmesi izolirali z reagenčnim kompletom QIAquick® PCR Purification Kit, skladno s priloženimi navodili. V tem koraku smo ob nanosu restriktijske zmesi na kolono združili produkta obej kultur izbranih bakterijskih kolonij, saj smo želeli pridobiti čim več plazmidnega standarda homogene kakovosti. Plazmidni standard smo eluirali v 30 µL prečiščene vode za molekularno biologijo.

3.2.7 Merjenje koncentracije in čistote lineariziranega plazmidnega standarda

Postopali smo tako, kot je opisano v podpoglavlju 3.2.4: »Merjenje koncentracije in čistote izoliranega krožnega plazmidnega standarda«. Izvedli smo 3 meritve in izračunali povprečno koncentracijo lineariziranega plazmidnega standarda.

3.2.8 Priprava raztopine lineariziranega plazmidnega standarda za umeritveno krivuljo

Pripravili smo osnovno raztopino plazmidnega standarda različice TpG, ki je imela začetno koncentracijo približno 125.000.000 molekul plazmida/ μL . Izhajali smo iz masne koncentracije plazmida, ki smo jo predhodno določili spektrofotometrično. Osnovno raztopino smo nato desetkratno razredčili 4x zapored, na koncu te serije redčitev pa smo dobljeno raztopino z oznako 2.500 razredčili še petkratno 5x zapored (Preglednica X). Za redčenje smo uporabili prečiščeno vodo. Vsako novo redčitev smo dobro premešali na mešalu, jo kratkotrajno centrifugirali in nato uporabili za nadaljne redčenje. Za pipetiranje smo uporabljali pipetne nastavke s filtri, da smo se izognili kontaminaciji delovnega prostora in delovnih površin s plazmidnimi fragmenti. Za izdelavo umeritvene krivulje smo uporabili raztopine z oznakami od 12.500 do 4, zato smo vsako od njih shranili v obliki treh 100 μL zalogovnih vzorcev (Preglednica X). Vse raztopine standardnih redčitev plazmidov smo do uporabe hranili v zamrzovalniku na -20 °C.

Preglednica X: Redčitve plazmidnih standardov za izdelavo umeritvene krivulje. Natančno število plazmidnih molekul v 1 μL in 4 μL raztopine smo določili na osnovi literarnih podatkov (25).

Oznaka raztopine plazmidnega standarda	Plazmid (μL)	Prečiščena voda (μL)	Število molekul plazmida v 1 μL raztopine	Število molekul plazmida v 4 μL raztopine
125.000.000	3,00	271,3	$1,17 \times 10^8$	$4,68 \times 10^8$
12.500.000	100	900	$1,17 \times 10^7$	$4,68 \times 10^7$
1.250.000	100	900	$1,17 \times 10^6$	$4,68 \times 10^6$
125.000	100	900	$1,17 \times 10^5$	$4,68 \times 10^5$
12.500	100	900	$1,17 \times 10^4$	$4,68 \times 10^4$
2.500	200	800	$2,34 \times 10^3$	$9,36 \times 10^3$

500	200	800	$4,68 \times 10^2$	$1,87 \times 10^3$
100	200	800	$9,38 \times 10^1$	$3,75 \times 10^2$
20	200	800	$1,87 \times 10^1$	$7,49 \times 10^1$
4	200	800	3,75	$1,50 \times 10^1$

3.2.9 Priprava raztopin oligonukleotidov za PCR

Raztopine načrtovanih in komercialno dobavljenih oligonukleotidov s koncentracijami 100 $\mu\text{mol/L}$ smo redčili na 10 $\mu\text{mol/L}$ in 30 $\mu\text{mol/L}$ tako, da smo 10 μL osnovne raztopine oligonukleotida dodali 90 μL prečiščene vode oz. 30 μL osnovne raztopine oligonukleotida dodali 70 μL prečiščene vode, dobro premešali na mešalu in nato še kratkotrajno centrifugirali. Delovne raztopine tako pripravljenih oligonukleotidov smo do uporabe hranili v zamrzovalniku na -20 °C.

3.2.10 Bisulfitna pretvorba vzorcev

Bisulfitno pretvorbo izbranih vzorcev DNA smo izvedli z reagenčnim kompletom EpiTect® Fast Bisulfite Kit, v skladu s priloženimi navodili. Pretvorili smo po 2 μg DNA v vzorcih, inkubacijo vzorcev v cikličnem termostatu pri 60 °C pa smo podaljšali na 20 min, saj proizvajalec navaja, da s tem lahko povečamo izkoristek reakcije. Bisulfitno pretvorjeno DNA smo iz kolon eluirali v enem koraku v 20 μL pufera EB.

3.2.11 Merjenje koncentracije in čistote bisulfitno pretvorjenih vzorcev

Uporabili smo postopek, ki smo ga opisali v podoglavlju 3.2.4: »Merjenje koncentracije in čistote izoliranega krožnega plazmidnega standarda«. Vse meritve na aparatu Nanodrop smo izvajali pri nastavljivosti ssDNA-33 za nukleinske kisline, kar pomeni, da je bila vrednost $A_{260} = 1$, ko je vzorec vseboval 33 $\mu\text{g/mL}$ enoverižne DNA.

3.2.12 Reakcije qPCR plazmidnih standardov in vzorcev

S postopkom PCR lahko kopiramo tako izbrane odseke DNA kot tudi plazmidnih standardov. Za reakcijo potrebujemo matrično DNA (v našem primeru plazmidni standard oziroma bisulfitno pretvorjena DNA posameznega vzorca), smerni oligonukleotid, protismerni oligonukleotid, mononukleotide (dNTP), pufer, ione Mg^{2+} in encim polimerazo DNA. Zadnji

štirje navedene reagenti ter interkalirajoče fluorescenčno barvilo, ki ga prav tako potrebujemo za izvedbo qPCR, so bili v ustreznem razmerju že združeni v komercialno dobavljeni reagenčni raztopini Sybr® Select Master Mix. Reakcija PCR poteka verižno in teoretično se po vsaki ponovitvi število kopij pomnoženega odseka podvoji. Izbrani temperaturni program zajema tri poglavitev korake: denaturacijo DNA, prileganje oligonukleotidov in podaljševanje izbranega odseka DNA z encimom DNA-polimeraza (26). Metoda PCR v realnem času nam omogoča spremjanje pomnoževanja DNA, kar pomeni, da lahko razberemo količino DNA nastale v vsakem ciklu. Začetno količino DNA smo določili z uporabo interkalirajočega fluorescenčnega barvila Sybr Green, ki se sproti vgrajuje v novo nastajajoče kopije dvostranske DNA in fluorescira močneje ob nastanku večjih količin produkta (27).

Parametri, ki so pomembni za interpretacijo rezultatov reakcije qPCR so naslednji:

- Cikel kvantifikacije (Cq) je številka cikla prehoda preko pražne vrednosti (ang. quantification cycle): to je tisti zaporedni cikel reakcije, pri katerem nastane tako velika količina produkta (pomnožene DNA), da jo lahko zaznamo v obliki fluorescence. Vrednost Cq je obratno sorazmerna začetni količini DNA. Nižja kot je vrednost Cq, več je nukleinske kisline v vzorcu.
- Učinkovitost pomnoževanja E: je pokazatelj robustnosti in ponovljivosti določanja količine produkta PCR. Ustrezna učinkovitost je 90 – 105%.
- Naklon standardne umeritvene krivulje: pri 100% učinkovitosti je naklon premice - 3,32.

$$E = 10^{-1/\text{naklon krivulje}}$$

- Talilna krivulja produktov PCR: omogoča identifikacijo nastalih produktov, tako želenih, specifičnih kot tudi nespecifičnih.
- Fluorescensa: je sorazmerna količini nastalega specifičnega produkta v reakciji qPCR (27).

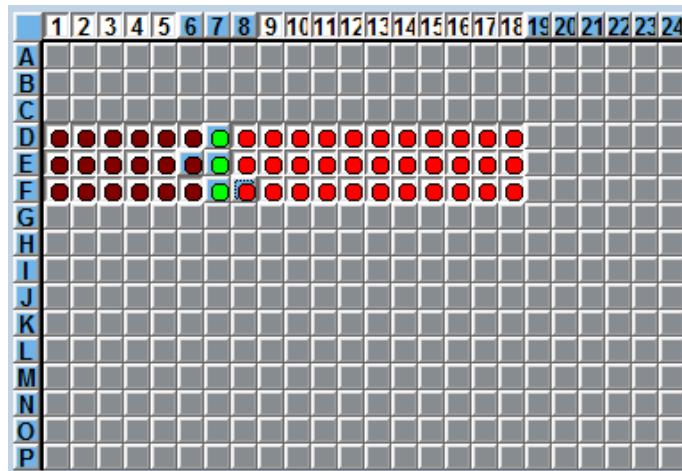
Reakcije qPCR za izdelavo standardne umeritvene krivulje in za analizo preiskovanih vzorcev smo izvedli v sledečem zaporedju: Vse reakcijske mešanice qPCR smo pripravili v delovni

komori, opremljeni z UV lučjo. Reagente smo odtalili na sobni temperaturi in jih, če je bilo to potrebno, premešali na mešalu ter kratkotrajno centrifugirali. Mešanico z barvilm Syber Select pa smo premešali ročno, s krožnimi gibi. V 1,5 mL plastične mikropruvete smo v vrstnem redu, ki je naveden v Preglednici XI odpipetirali potrebne količine prečiščene vode, reakcijske mešanice PCR z barvilm Sybr Select ter smernega in protismernega oligonukleotida, da smo dobili ustrezen volumen končne reakcijske mešanice za želeno število reakcij.

Preglednica XI: Sestava reakcijske mešanice za reakcijo qPCR s plazmidnimi standardi in preiskovanimi vzorci.

REAGENT	1 reakcija
Prečiščena voda	0,5 µL
SYBR Select	5 µL
Smerni oligonukleotid (10 µM):	0,25 µL
Protismerni oligonukleotid (10 µM):	0,25 µL
Plazmidni standard ali vzorec	4 µL
Volumen reakcijske mešanice	10 µL

Nato smo po 6 µL te končne reakcijske mešanice (master mix) razporedili v ustreznouznačene vdolbinice mikrotitrskih ploščic, nato pa jim dodali še po 4 µL ustreznega plazmidnega standarda oz. preiskovanega vzorca (Slika 5).



Slika 5: Primer razporedja reakcijskih mešanic na mikrotitrski ploščici za izvedbo reakcije qPCR različice TpG gena FOXP3 v vzorcih bolnika P6. Rjavi krogci prikazujejo vdolbinice, v katere smo odpipetirali plazmidne standarde, rdeči pa položaje z bisulfitno pretvorjenimi vzorci DNA. Z zeleno barvo so označene vdolbinice s slepimi vzoreci. Za vsak plazmidni standard in vsak vzorec smo reakcijo qPCR izvedli v trojniku.

Mikrotitrsko ploščico smo namestili v ciklični termostat Real-Time PCR LightCycler® 480 in reakcijske mešanice vzorcev in standardov izpostavili sledečemu temperaturnemu programu:

- Začetna denaturacija: 95 °C, 5 min
 - Denaturacija: 95 °C, 15 s
 - Prileganje oligonukleotidnih začetnikov: 58 °C, 30 s
 - Podaljševanje verige: 72 °C, 30 s
- } Število ciklov: 52

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Plazmidni standard pGOv4 različice TpG je bil načrtovan in izdelan s pomočjo tehnologije rekombinantne DNA (22). Plazmidi so dvoverižne in v krog slenjene zunajkromosomske molekule DNA določenih bakterijskih celic. Ker imajo sposobnost samostojnega pomnoževanja, jih uporabljamo kot prenosnike (vektorje) za fragmente tuge DNA pri molekulskega kloniranju (28). Uporabljeni plazmidni standard različice TpG v svojem nukleotidnem zaporedju tako nosi še vključeni zaporedji za človeška gena CD3 in FOXP3, ki so jima med njunim načrtovanjem vse C (citozin) na mestih dinukleotida CG zamenjali s T (timin). Primarno je bil izdelan tudi plazmidni standard različice CpG, ki je imel na vključenih zaporedjih genov CD3 in FOXP3 vse C na dinukleotidih CG ohranjene. Oba plazmidna standarda sta imela vključeno še zaporedje kontrolnega gena GAPDH različice TpG. S takšnim kompleksnim sistemom lahko s pomočjo izdelanih umeritvenih krivulj z metilacijsko specifično reakcijo qPCR določamo:

- celice, ki izražajo gen CD3 (limfociti T), umeritveno krivuljo izdelamo s PCR-pomnoževanjem gena CD3 na plazmidnem standardu različice TpG;
- celice, ki izražajo gen FOXP3 (Treg), umeritveno krivuljo izdelamo s PCR-pomnoževanjem gena FOXP3 na plazmidnem standardu različice TpG;
- celice, ki ne izražajo gena CD3 (vse celice, razen limfociti T), umeritveno krivuljo izdelamo s PCR-pomnoževanjem gena CD3 na plazmidnem standardu različice CpG;
- celice, ki ne izražajo gena FOXP3 (vse celice, razen Treg), umeritveno krivuljo izdelamo s PCR-pomnoževanjem gena FOXP3 na plazmidnem standardu različice CpG;
- vse preiskovane celice v periferni krvi, umeritveno krivuljo izdelamo s PCR-pomnoževanjem gena GAPDH na plazmidnem standardu različice CpG ali TpG, saj se na obeh nahaja v različici TpG (22).

Ker smo v naši nalogi določali deleže Treg znotraj celotne količine limfocitov T, smo potrebovali le 2 izmed zgoraj naštetih umeritvenih krivulj: umeritvena krivulja izdelana s PCR-pomnoževanjem gena CD3 na plazmidnem standardu različice TpG in umeritvena

krivulja izdelana s PCR-pomnoževanjem gena FOXP3 na plazmidnem standardu različice TpG. Za obe izdelani krivulji smo uporabili redčitve istega plazmidnega standarda iz istih zalogovnih raztopin, s čimer smo se izognili napaki neskladnosti med pripravljenimi redčitvami plazmidnih standardov različice TpG in CpG, ki bi se sicer lahko preverila z reakcijo qPCR kontrolnega gena GAPDH na obeh različicah plazmidov.

Lineariziranje krožnega plazmidnega standarda pGOv4 različice TpG smo izvedli, ker se je praktično izkazalo, da je reakcija qPCR tako bolj učinkovita. To bi lahko bila posledica lažjega prileganja oligonukleotidov na linearno matrično DNA, kot na krožno. Z načrtovanjem demetiliranega zaporedja genov CD3 in FOXP3 na plazmidnem standardu različice TpG smo v zaporedju namreč povzročili zmanjšanje heterogenosti nukleotidov C, G, T, A in s tem tudi manj optimalen sistem za reakcijo qPCR (različica TpG gena CD3 ne vsebuje nukleotida G, gena FOXP3 pa nukleotida C).

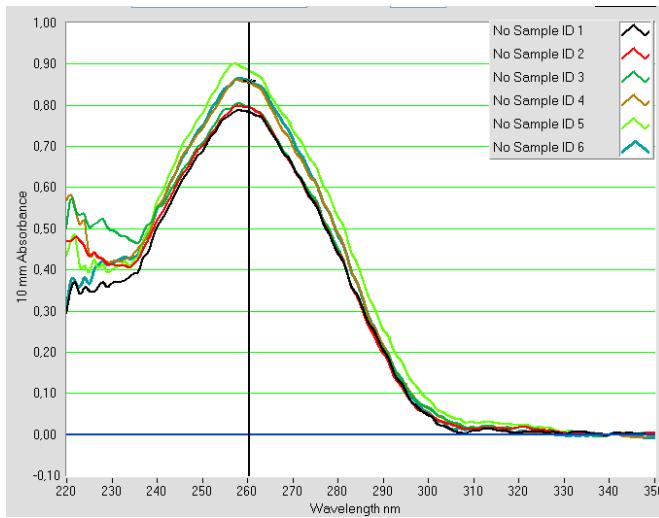
4.1 Koncentracija in čistota lineariziranega plazmidnega standarda različice TpG

Po treh zaporednih ločenih meritvah koncentracije lineariziranega plazmidnega standarda različice TpG s kapljičnim spektrofotometrom, smo izračunali njeno povprečno vrednost, iz katere smo izhajali pri nadaljnih pripravah standardnih raztopin plazmida (Slika 6).

Sample ID	User ID	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230	Constant
	Default	23.3.2016	16:30	39,20	0,784	0,440	1,78	2,14	50,00
	Default	23.3.2016	16:31	39,74	0,795	0,443	1,79	1,93	50,00
	Default	23.3.2016	16:32	39,78	0,796	0,452	1,76	1,61	50,00

Slika 6: Izmerjene koncentracije izoliranega lineariziranega plazmidnega standarda različice TpG; $C_{\text{povprečna}} = 39,57 \text{ ng}/\mu\text{L}$

Koncentracija izoliranega plazmida je bila sicer nekoliko nizka, vendar še zadostna za pripravo standardnih redčitev. Tudi njegova čistota je bila sprejemljiva, kar lahko razberemo iz podanih razmerij absorbanc 260nm/280nm in 260nm/230nm na Sliki 6, ter iz grafa, ki prikazuje, da je maksimum absorbance pri 260 nm, kar je značilno za nukleinske kisline oz. DNA (Slika 7).



Slika 7: Meritve čistote izoliranega lineariziranega plazmidnega standarda za različico TpG.

4.2 Optimizacija in izdelava standardne umeritvene krivulje

Temperaturni program za izvedbo reakcije PCR redčitev plazmidnega standarda je bil določen že predhodno, zato ga v sklopu optimizacije postopka nismo spremajali (22). Optimizirali pa smo količine redčitev plazmidnega standarda, ki smo jih dodajali v reakcijo PCR, kar prikazuje Preglednica XII.

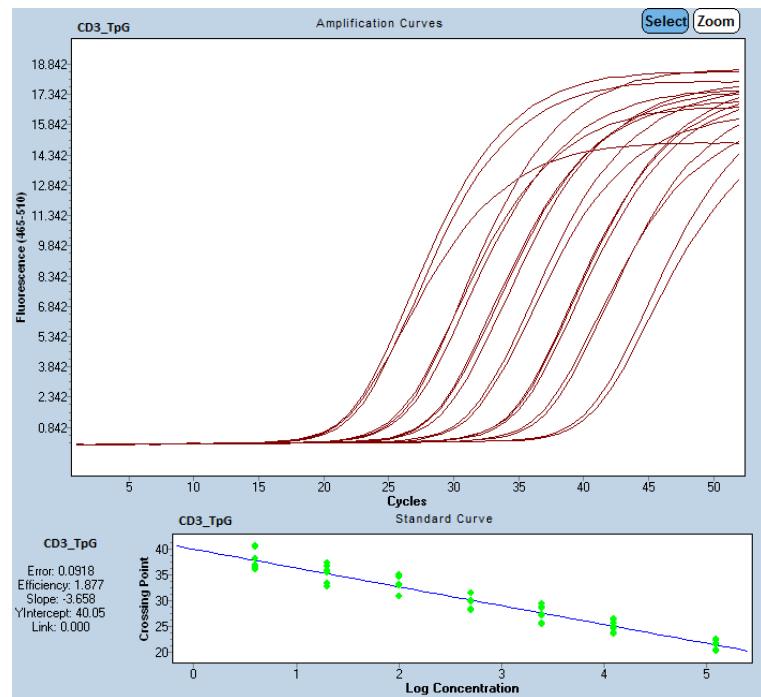
Preglednica XII: Količine reagentov v reakcijski mešanici PCR za optimizacijo standardne umeritvene krivulje.

REAGENT	Količina za 1 reakcijo	Količina za 1 reakcijo
Prečiščena voda	3,5 µL	0,5 µL
SYBR Select	5 µL	5 µL
Smerni oligonukleotidni začetnik (10 µM):	0,25 µL	0,25 µL
Protismerni oligonukleotidni začetnik (10 µM):	0,25 µL	0,25 µL
Ustrezna redčitev plazmidnega standarda (12.500, 2.500, 500, 100, 20 ali 4 molekul/µL)	1 µL	4 µL
Volumen reakcijske zmesi	10 µL	10 µL

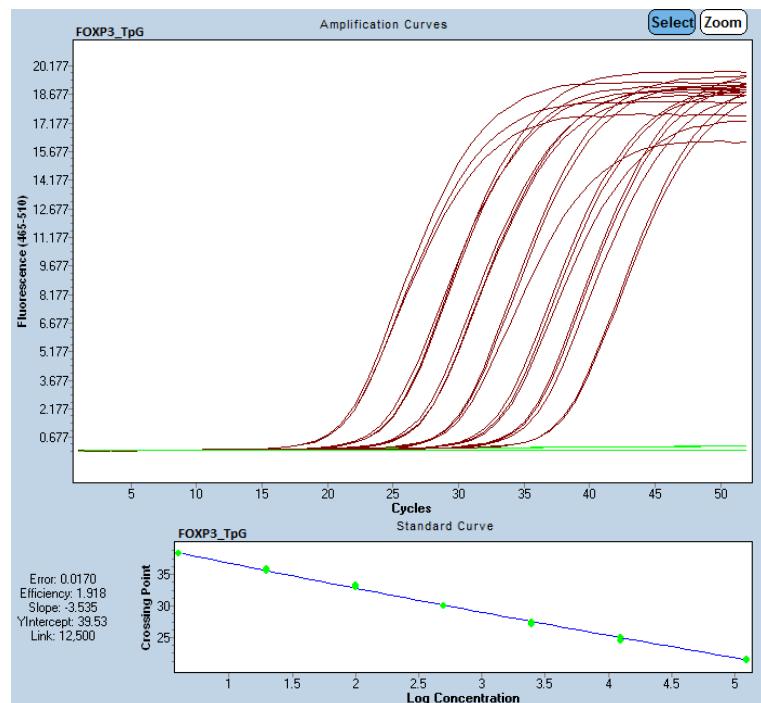
Ker smo pri pipetiranju 1 µL standardnih redčitev plazmida v reakcijsko mešanico qPCR opazili večja odstopanja v vrednostih Cq med triplikati meritev pri najnižjih dveh redčitvah (20 in 4 molekul plazmida/µL), v primerjavi s 4 µL, smo se za nadaljnje reakcije odločili za slednjo količino. Napaka pri pipetiranju se namreč manjša z večanjem pipetiranega volumna raztopine.

S povečanjem volumna pripravljenih redčitev plazmidnega standarda smo povečali tudi njegovo absolutno količino, ki smo jo vnesli v reakcije qPCR in s tem pomaknili standardne krivulje v levo proti nižjim vrednostim Cq. V vzorcih smo sicer zaznali zelo nizke količine Treg (visoke vrednosti Cq pri reakciji qPCR za gen FOXP3), vendar smo bili s tem ukrepom še vedno znotraj meje detekcije kopij DNA izbranih genov CD3 in FOXP3 v vzorcih. Ker smo rezultate podajali v obliki razmerij nTreg/oTL in smo deleže nTreg ter oTL kvantificirali s pomočjo istih redčitev plazmidnega standarda različice TpG, povečanje volumna dodanih plazmidnih standardov v reakcij oqPCR z 1 na 4 µL ni vplivalo na rezultate.

Za gena CD3 in FOXP3 na nemetaliranem plazmidnem standardu (različica TpG) smo s postavljeno reakcijsko shemo in predstavljenim temperaturnim programom izdelali ustrezní umeritveni krivulji redčitev 12.500, 2.500, 500, 100, 20 in 4 molekul/µL, kar prikazujejo spodnji grafi (Slika 8 in Slika 9). Pri tem smo dosegli ustrezeno učinkovitost reakcij qPCR, in sicer 87,7 % za gen CD3 in 91,8 % za gen FOXP3.

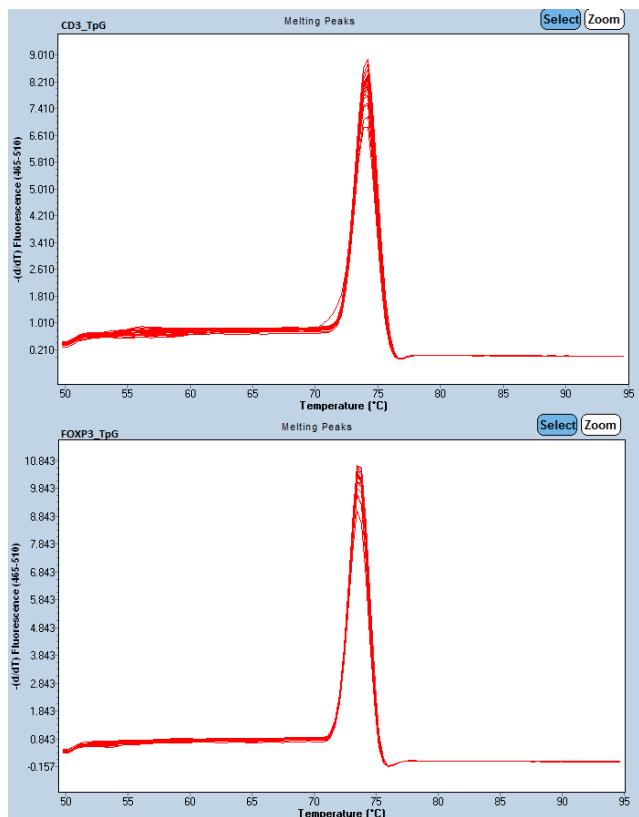


Slika 8: Krivulje reakcij qPCR redčitev plazmidnega standarda različice TpG za gen CD3 in pripadajoča umeritvena krivulja.



Slika 9: Krivulje reakcij qPCR redčitev plazmidnega standarda različice TpG za gen FOXP3 in pripadajoča umeritvena krivulja.

Poleg tega smo s talilnima krivuljama plazmidnega standarda različice TpG za gena CD3 in FOXP3 potrdili tudi specifičnost reakcij qPCR, saj en sam talilni vrh pri vseh izvedenih reakcijah pomeni nastanek enega samega pomnoženega produkta (Slika 10).



Slika 10: Talilni krivulji produktov reakcije qPCR redčitev plazmidnega standarda različice TpG za gen CD3 (zgoraj) in FOXP3 (spodaj).

4.3 Optimizacija bisulfitne pretvorbe vzorcev DNA

Izkoristek reakcije bisulfitne pretvorbe DNA je odvisen od njene vstopne količine in izvora (trdno tkivo, kri, celice). Optimalna vstopna količina DNA je pri uporabljenem reagenčnem kompletu med 1 ng in 2 µg, pričakovan izkoristek pretvorbe pa je med 50 in 70 %. Ker je DNA med pretvorbo izpostavljena visokim koncentracijam natrijevega bisulfita pri visokih temperaturah in nizkem pH, pogosto pride do njene fragmentacije in denaturacije v enojno verigo. Pogosta težava reakcije bisulfitne pretvorbe DNA je tudi nepopolna pretvorba

nemetiliranih citozinov v uracil. Vse to lahko vpliva na izkoristek bisulfitne pretvorbe in učinkovitost reakcije PCR, kjer pretvorjeno DNA uporabimo kot matrico (29, 30).

Da bi pridobili čim večje količine kvalitetnih bisulfitno pretvorjenih DNA izbranih vzorcev za izvedbo reakcij qPCR, smo optimizirali naslednja parametra pri uporabi reagenčnega kompleta EpiTect® Fast Bisulfite Kit:

- dodatek absolutnega etanola k pufru BL in inkubacija vzorca: bisulfitno smo pretvorili po dve paralelki treh izbranih vzorcev bolnikov P9, P13 in P14 (P9 Levkaferesa, P13 Levkaferesa in P14 V3), nato pa v koraku čiščenja bisulfitno pretvorjene DNA v eno paralelko dodali samo 310 µL pufra BL, v drugo pa 310 µL pufra BL in 310 µL absolutnega etanola, ter vsebino plastičnih mikropruvet inkubirali 10 min;
- elucijo bisulfitno pretvorjene DNA iz kolone: po prvi eluciji smo v eluatu izmerili koncentracijo bisulfitno pretvorjene DNA, nato pa ga ponovno nanesli na kolono, ga eluirali in v drugem eluatu zopet izmerili njeno koncentracijo.

Izkoristek bisulfitne pretvorbe vzorcev DNA se je gibal med 40 in 75 %. Kljub dodatkom 310 µL absolutnega etanola k pufru BL med postopkom čiščenja izkoristka nismo povečali. V vzorcih bolnikov P9 in P13 se je zaradi te modifikacije koncentracija bisulfitno pretvorjene DNA celo znižala, medtem ko se je zvišala le pri vzorcu bolnika P14 (Slika 11). Nizka vrednost razmerja 260 nm/230 nm v vzorcu bolnika P9 bi lahko bila posledica prisotnosti nečistot, najverjetneje zaostalih reagentov ali topil iz reagenčnega kompleta za bisulfitno pretvorbo, ki močno absorbirajo svetlobo pri 230 nm (Slika 11). Kakovost takega vzorca je seveda vprašljiva, saj lahko kontaminanti vplivajo na rezultate njegovih nadaljnjih testiranj, npr. tudi na rezultate reakcije qPCR.

Sample ID	User ID	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230	Constant
P9-elucija1	Default	14.4.2016	18:15	83,16	2,520	1,083	2,33	0,78	33,00
P9-elucija1	●	14.4.2016	18:16	86,44	2,619	1,121	2,34	0,75	33,00
P13-elucija1	●	14.4.2016	18:17	83,00	2,515	1,079	2,33	3,07	33,00
P14-elucija1	●	14.4.2016	18:18	80,71	2,446	1,046	2,34	2,97	33,00
P9-EtOH-elucija1	●	14.4.2016	18:20	77,66	2,353	1,051	2,24	2,93	33,00
P13-EtOH-elucija1	●	14.4.2016	18:21	77,20	2,339	1,031	2,27	3,08	33,00
P14-EtOH-elucija1	●	14.4.2016	18:22	87,89	2,663	1,170	2,28	2,47	33,00

Slika 11: Koncentracije bisulfitno pretvorjenih vzorcev DNA treh bolnikov (P9, P13 in P14), pripravljenih z in brez dodanega etanola v koraku njihovega čiščenja, po prvi eluciji iz kolone.

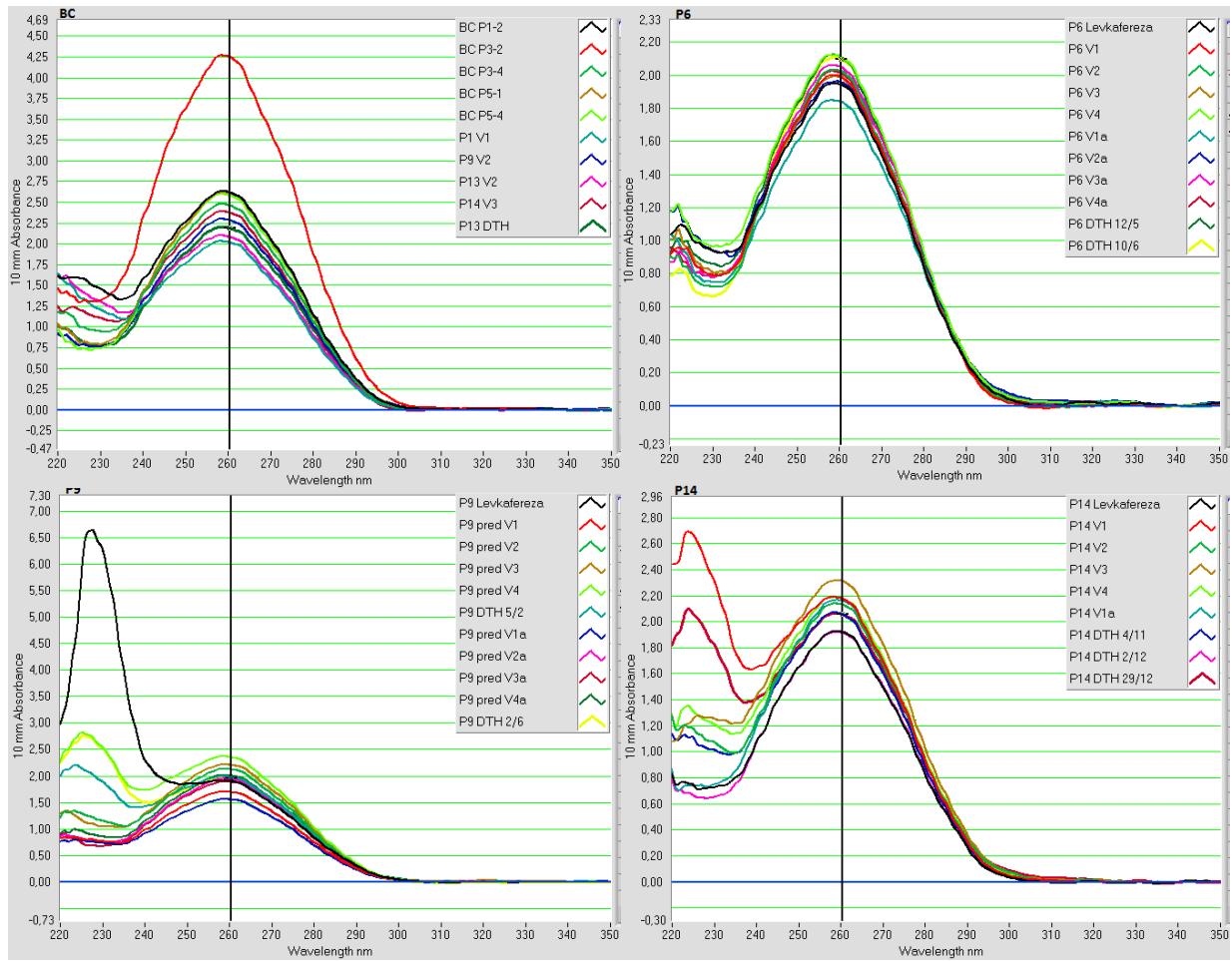
Z dodatno elucijo bisulfitno pretvorjenih vzorcev DNA iz kolon nismo uspeli bistveno povečati njihove čistote in njihovih koncentracij (Slika 12), zato smo se odločili, da je v nadaljevanju ne bomo izvajali.

Sample ID	User ID	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230	Constant	
P9-elucija2	●	Default	14.4.2016	18:45	85,06	2,578	1,156	2,23	0,74	33,00
P13-elucija2	●	Default	14.4.2016	18:46	85,95	2,604	1,161	2,24	2,70	33,00
P14-elucija2	●	Default	14.4.2016	18:47	86,80	2,630	1,166	2,26	1,57	33,00
P9-EtOH-elucija2	●	Default	14.4.2016	18:48	81,31	2,464	1,104	2,23	2,69	33,00
P13-EtOH-elucija2	●	Default	14.4.2016	18:49	84,22	2,552	1,104	2,31	2,61	33,00
P14-EtOH-elucija2	●	Default	14.4.2016	18:51	89,72	2,719	1,198	2,27	1,60	33,00

Slika 12: Koncentracije bisulfitno pretvorjenih vzorcev DNA treh bolnikov (P9, P13 in P14), pripravljenih z in brez dodanega etanola v koraku njihovega čiščenja, po dodatni (drugi) eluciji iz kolone.

4.4 Koncentracija in čistota bisulfitno pretvorjenih vzorcev DNA

Koncentracija bisulfitno pretvorjenih vzorcev DNA se je gibala med 65 in 80 ng/ μ L, njihova čistota pa je bila ustrezna za izvedbo reakcij qPCR pri vzorcih bolnika P6, P13 in vseh petih zdravih oseb. Več kontaminantov, ki absorbirajo pri 230 nm pa smo zaznali v posamičnih vzorcih bolnikov P9 in P14 (Slika 13).



Slika 13: Grafi, ki prikazujejo absorpcijske spektre bisulfitno pretvorjenih DNA vzorcev, namenjenih nadaljnji analizi s qPCR. Absorpcijski spekter bisulfitno pretvorjene DNA vzorcev zdravih oseb (levo zgoraj), bolnika P6 (desno zgoraj), bolnika P9 (levo spodaj) in bolnika P14 (desno spodaj). Pri nekaterih vzorcih bolnikov P9 in P14 je vidna prisotnost kontaminantov zaradi visoke absorpcije svetlobe pri 230 nm.

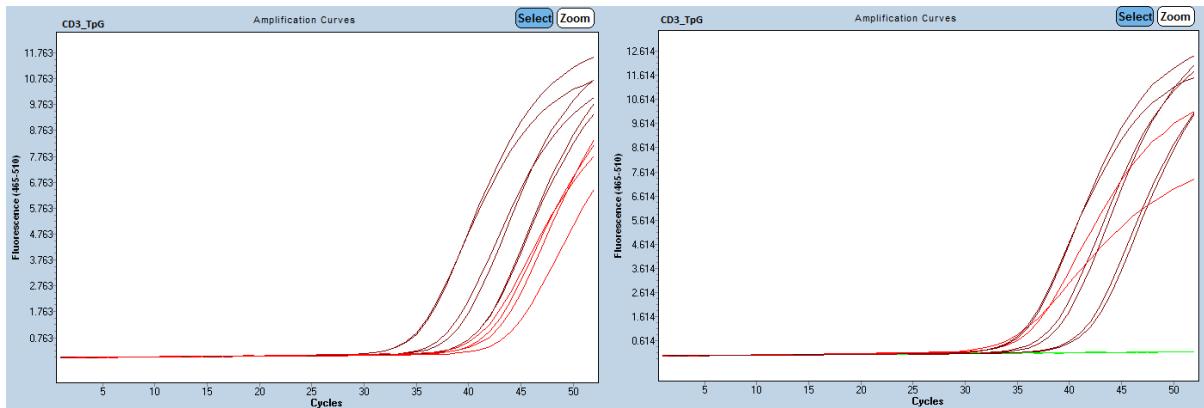
4.5 Optimizacija reakcije qPCR za bisulfitno pretvorjene vzorce DNA

Za določitev optimalne količine bisulfitno pretvorjene DNA vzorcev v reakciji qPCR smo bisulfitno pretvorili DNA treh izbranih vzorcev (P9 Levkafereza, P13 Levkafereza, P14 V3) in jim s kapljičnim spektrofotometrom izmerili koncentracijo. S prečiščeno vodo smo pripravili raztopine bisulfitno pretvorjenih vzorcev DNA s koncentracijo 20 ng/ μ L. Potek reakcije qPCR smo testirali z začetnimi količinami 40, 60 in 80 ng vzorca v reakcijski zmesi (Preglednica XIII).

Preglednica XIII: Optimizacija reakcijske mešanice qPCR za nižje količine bisulfitno pretvorjenih vzorcev DNA.

REAGENT	1 reakcija	1 reakcija	1 reakcija
Prečiščena voda	2,5 μ L	1,5 μ L	0,5 μ L
SYBR Select	5 μ L	5 μ L	5 μ L
Smerni oligonukleotid (10 μM):	0,25 μ L	0,25 μ L	0,25 μ L
Protismerni oligonukleotid (10 μM):	0,25 μ L	0,25 μ L	0,25 μ L
Bisulfitno pretvorjeni vzorec	2 μ L (40 ng)	3 μ L (60 ng)	4 μ L (80 ng)
Volumen reakcijske zmesi	10 μ L	10 μ L	10 μ L

Pri vnosu 40 ng vzorčne DNA v reakcijo mešanico qPCR za gena CD3 in FOXP3 reakcije niso potekle. Ko smo količino vzorca povečali na 60 oz. 80 ng pa smo sicer dobili posamezne pozitivne rezultate za CD3, a še vedno negativne za FOXP3. Pri pozitivnih reakcijah pa smo zabeležili tudi premik krivulj vzorcev v desno glede na položaj krivulje najnižje redčitve plazmidnega standarda z oznako 4, kar pomeni višje vrednosti Cq in s tem prestop pod mejo detekcije (Slika 14).



Slika 14: Reakcijske krivulje qPCR za varianto TpG gena CD3 nižjih količin bisulfitno pretvorjenih vzorcev DNA, zabeležene med postopkom optimizacije. Levo 60 in desno 80 ng začetne količine vzorčne DNA.

Ugotovili smo, da smo po bisulfitni pretvorbi vzorcev DNA koncentracijo produktov merili s kapljičnim spektrofotometrom na nastaviti dsDNA-50, kar pa ni bilo ustrezeno, saj se DNA med bisulfitno pretvorbo denaturira v enoverižno vijačnico in fragmentira. S tako določitvijo smo v vzorcih izmerili lažno višje koncentracije bisulfitno pretvorjene DNA kot bile v primeru, da bi meritve izvedli na priporočeni nastaviti ssDNA-33. Ker bi lahko bil tudi to razlog za neuspele reakcije, smo želeli ponovno preveriti uspešnost qPCR reakcij za nizke količine vnešenih vzorcev DNA. Ravno tako smo želeli preveriti potek reakcij za višje količine vnešenih vzorcev DNA kot 80 ng, v primeru da je bil razlog za predhodne neuspele reakcije prenizka količina vnešene DNA v qPCR reakcijo. Preostanke raztopin posameznih bisulfitno pretvorjenih vzorcev DNA smo združili in izmerili koncentracijo dobljene mešanice na nastaviti ssDNA-33. To smo nato s prečiščeno vodo redčili do naslednjih koncentracij: 2,5, 10, 25 in 50 ng/ μ L. S 4 μ L posamezne redčitve v reakcijsko mešanico qPCR smo tako dodali po 10, 40, 100 in 200 ng bisulfitno pretvorjene DNA (Preglednica XIV).

Preglednica XIV: Optimizacija reakcijske mešanice qPCR za srednje količine bisulfitno pretvorjenih vzorcev DNA.

REAGENT	1 reakcija
Prečiščena voda:	0,5 μ L

SYBR Select:	5 µL
Smerni oligonukleotid (10 µM):	0,25 µL
Protismerni oligonukleotid (10 µM):	0,25 µL
Bisulfitno pretvorjeni vzorec izbrane koncentracije	4 µL (10 ng, 40 ng, 100 ng ali 200 ng)
Volumen reakcijske zmesi	10 µL

Kot smo pričakovali, smo s prvima dvema količinama dobili negativne, z drugima dvema pa pozitivne rezultate. Z uporabo 100 in 200 ng vzorcev bisulfitno pretvorjenih molekul DNA smo seveda znižali vrednosti Cq, zato so bile reakcijske krivulje znotraj standardne umeritvene krivulje, kar smo tudi želeli doseči.

Da bi določili zgornjo količino vzorca DNA, s katero bi reakcija qPCR še uspešno potekla, ne da bi povzročili njeni inhibicijo, smo v reakcijsko zmes dodali po 200 in 400 ng bisulfitno pretvorjenega vzorca DNA. Ker se z večanjem volumna vzorca v reakcijski mešanici zmanjšuje prosti volumen za ostale reagente, smo se v tem primeru odločili uporabiti bolj koncentrirane oligonukleotide (30 µM) (Preglednica XV).

Preglednica XV: Optimizacija reakcijske mešanice qPCR za visoke količine bisulfitno pretvorjenih vzorcev DNA.

REAGENT	1 reakcija
Prečiščena voda:	var*
SYBR Select:	5 µL
Smerni oligonukleotid (30 µM):	0,0833 µL
Protismerni oligonukleotid (30 µM):	0,0833 µL
Bisulfitno pretvorjen vzorec	var* (200 ng ali 400 ng)

Volumen reakcijske zmesi	10 µL
---------------------------------	-------

* Zaradi vnosa visokih količin bisulfitno pretvorjenega vzorca DNA v reakcijsko mešanico qPCR, smo na osnovi izmerjenih koncentracij posameznih vzorcev izračunali volumen, ki smo ga dodali in je vseboval 200 oz. 400 ng DNA ter dodali prečiščeno vodo do končnega volumna 10 µL.

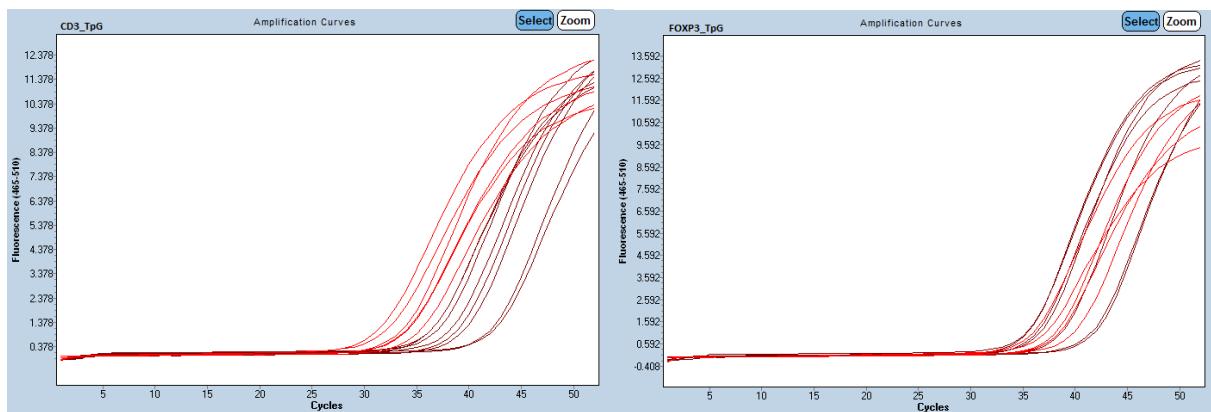
Vrednosti Cq so bile znotraj umeritvene krivulje, vendar nižje pri 200 ng kot pri 400 ng v reakcijsko mešanico dodanega vzorca. Z večanjem količine dodanega vzorca v reakcijo qPCR verjetno vnašamo tudi več inhibitorjev reakcije PCR, ki izhajajo iz različnih stopenj priprave DNA, zlasti njene bisulfitne pretvorbe in čiščenja.

Na osnovi dobljenih rezultatov smo se odločili testirati še dodatek 75 in 150 ng bisulfitno pretvorjenega vzorca DNA v reakcijsko zmes qPCR in s tem določiti njegovo optimalno količino. Ustrezne redčitve bisulfitno pretvorjenih vzorcev DNA smo pripravili tako, da smo s 4 µL vzorca v reakcijsko mešanico dodali 75 oz. 150 ng bisulfitno pretvorjene DNA (Preglednica XVI).

Preglednica XVI: Sestava reakcijske mešanice qPCR s potencialno optimalnimi količinami bisulfitno pretvorjenih vzorcev.

REAGENT	1 reakcija
Prečiščena voda	0,5
SYBR Select	5 µL
Forward oligonukleotid (30 µM):	0,0833 µL
Reverse oligonukleotid (30 µM):	0,0833 µL
Bisulfitno pretvorjen vzorec	var* (75 ng ali 150 ng)
Volumen reakcijske mešanice	10 µL

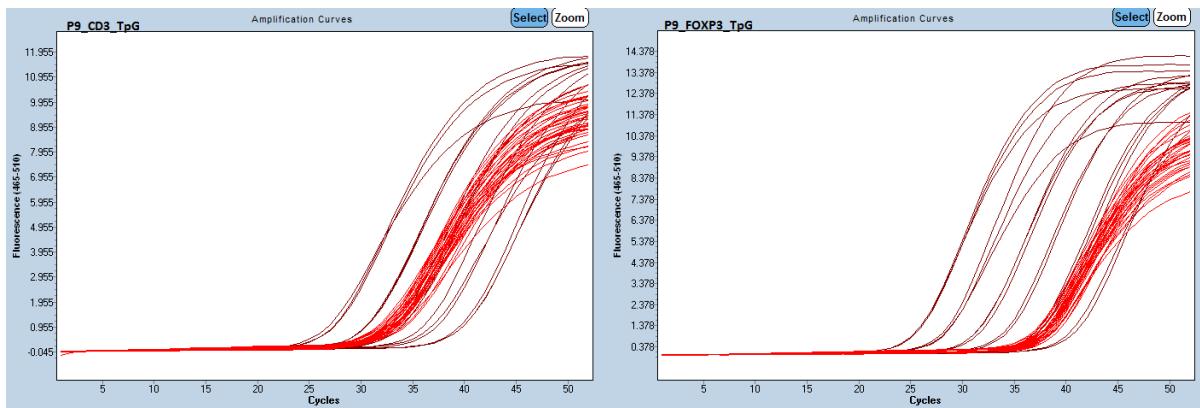
Za obe vnešeni količini DNA smo v vseh triplikatih dobili pozitivne reakcije za oba preiskovana gena. Reakcijske krivulje vseh uporabljenih vzorcev so bile znotraj standardne umeritvene krivulje, torej nad mejo detekcije. Vrednosti Cq so bile nižje pri dodatku 150 ng vzorca, zato smo se odločili, da bomo to količino uporabili v vseh nadaljnjih reakcijah qPCR (slika 15).



Slika 15: Reakcijske krivulje qPCR za varianto TpG genov CD3 (levo) in FOXP3 (desno), optimalnih količin bisulfitno pretvorjenih vzorcev DNA – 150 ng, zabeležene med postopkom optimizacije.

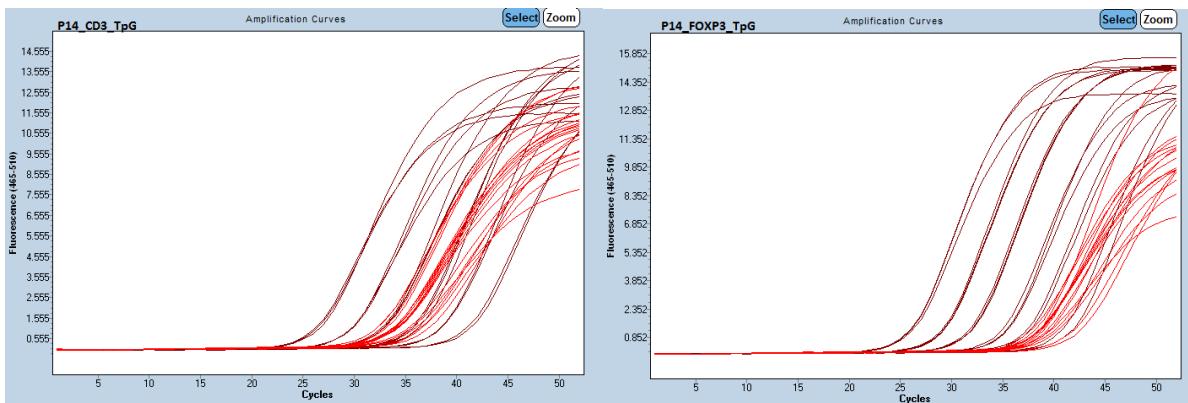
4.6 Rezultati reakcij qPCR preiskovanih vzorcev DNA

Krivulje reakcij qPCR bisulfitno pretvorjenih vzorcev DNA vseh bolnikov za gen CD3 so bile pričakovano pomaknjene v levo, proti nižjim vrednostim Cq, v primerjavi s tistimi za gen FOXP3, saj je v krvnih vzorcih bistveno več CD3⁺ limfocitov T kot FOXP3⁺ celic nTreg. Z vzorci bolnika P9 so, kljub ugotovljeni večji prisotnosti nečistot, reakcije PCR potekle normalno. Opazili pa smo, da so imeli vsi izmerjeni vzorci bolnika P9 zelo podobne vrednosti Cq za posamezen gen CD3 oz. FOXP3, kar bi lahko bilo vrok prisotnosti nečistot (Slika 16).



Slika 16: Reakcijske krivulje qPCR vzorcev bolnika P9 za variante TpG genov CD3 (levo) in FOXP3 (desno).

Posamezni vzorci bolnikov P6, P13 in P14 so imeli višje vrednosti Cq za gen FOXP3 od tiste, ki smo jo dobili za plazmidni standard najnižje koncentracije (Slika 17). Razultate posameznih ponovitev reakcij qPCR, ki so močno odstopali, pri nadaljni analizi nismo upoštevali. V kolikor pa se je izkazalo, da smo pri vseh treh ponovitvah meritev določenega vzorca dobili primerljive rezultate, pa smo upoštevali ekstrapolirane vrednosti, ki jih je izpisal uporabljeni računalniški program za qPCR.



Slika 17: Reakcijske krivulje qPCR vzorcev bolnika P14 za variante TpG genov CD3 (levo) in FOXP3 (desno).

Pri meritvah vzorcev nismo dobili ustrezne učinkovitosti sistema qPCR, kar smo ugotovili iz naklona standardne umeritvene krivulje. Učinkovitost se je namreč gibala okoli 65% za gen CD3 in okoli 73% za gen FOXP3. Ker smo reakcije qPCR vzorcev izvajali z metodo eksternih

standardov, bi seveda pričakovali podobno učinkovitost sistema kot pri izdelavi standardne umeritvene krivulje, saj smo reakcije s standardnimi plazmidi v obeh primerih izvedli na enak način. Na osnovi naših rezultatov lahko zaključimo, da postavljena epigenetska metoda zaenkrat še ni dovolj ponovljiva.

4.7 Razmerja Treg/oTL in primerjava naših rezultatov z rezultati pretočne citometrije

Deleže nTreg v preiskovanih vzorcih smo izračunali s pomočjo naslednje enačbe:

$$nTreg (\%) = [C_{povprečna} (FOXP3) / C_{povprečna} (CD3)] \times 100\%$$

Prvo serijo reakcij qPCR smo izvedli, da bi orientacijsko primerjali deleže nTreg, določene v krvnih vzorcih bolnikov in zdravih oseb. V ta namen smo testirali 5 vzorcev DNA krvodajalcev in 4 vzorce bolnikov s hormonsko odpornim rakom prostate in ugotovili nižje povprečne deleže nTreg pri bolnikih v primerjavi z zdravimi osebami (Preglednica XVII).

Preglednica XVII: Primerjava epigenetsko določenih deležev nTreg v vzorcih zdravih oseb (krvodajalci) ($n = 5$) in bolnikov s hormonsko odpornim rakom prostet ($n = 4$).

Vzorci zdravi	Treg/oTL (iz %)	Vzorci bolni	Treg/oTL (iz %)
BC P1 2 29/4/14	1,21	P9 V1 19/11/14	2,11
BC P3 2 9/5/14	1,80	P9 V2 10/12/14	0,89
BC P3 4 24/6/14	2,36	P13 V2 5/5/15	1,30
BC P5 1 13/5/14	0,89	P14 V3 9/6/15	0,77
BC P5 4 9/7/14	1,26	P13 DTH 30/6/15	1,90
Deležpovprečno ± SD	1,50 ± 0,58		1,39 ± 0,60

Ta rezultat pa ni nenavaden, saj so bili krvni vzorci bolnikov odvzeti v različnih fazah modulacije njihovih imunskeh sistemov, kar pomeni, da so bile lahko zaradi tega količine nTreg nižje od pričakovanih. Tudi v študiji, opisani v literaturi, v vzorcih periferne krvi bolnikov z lokaliziranim progresivnim in metastatskim rakom prostate niso ugotovili statistično značilno večjih deležev limfocitov nTreg v primerjavi z zdravimi osebami, so pa

celice nTreg bolnikov izkazovali bistveno večjo supresivno funkcijo kot tiste, izolirane iz vzorcev zdravih oseb (31).

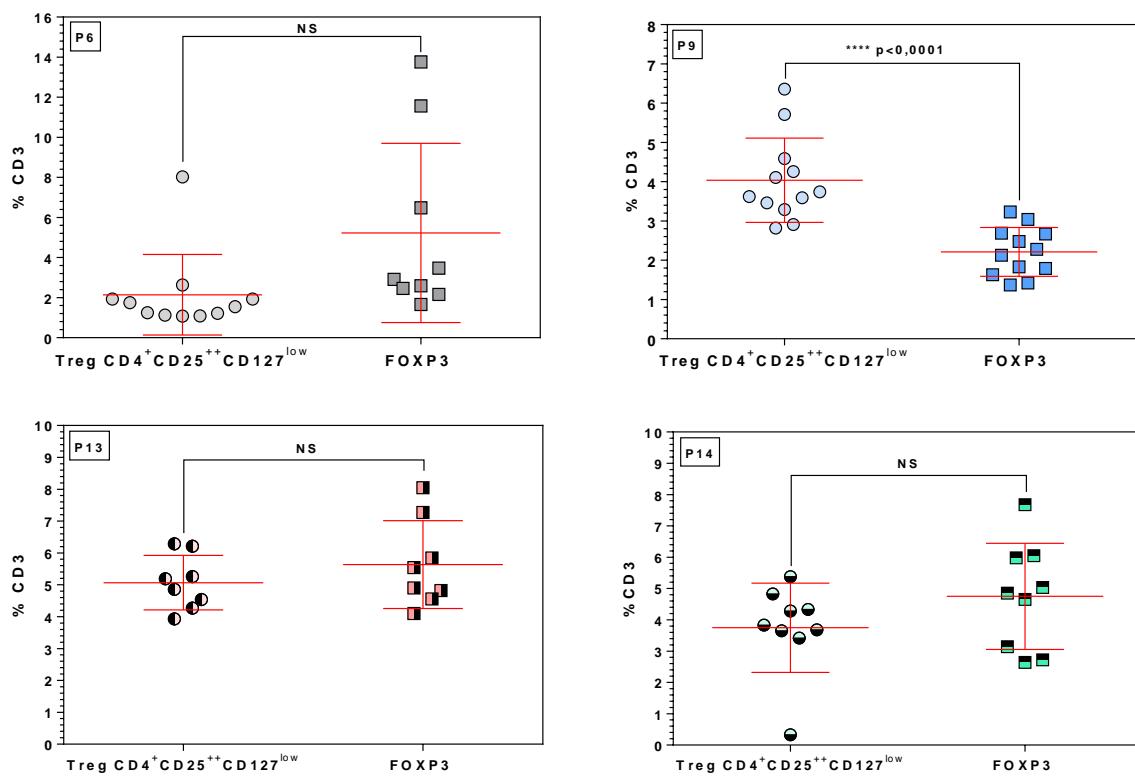
Nato smo rezultate epigenetskega določanja deležev nTreg v vzorcih bolnikov P6, P9, P13 in P14 primerjali s tistimi, ki so jih na IMI pridobili s pretočno citometrijo in podatke statistično ovrednotili (Preglednica XVIII).

Preglednica XVIII: Izračunani deleži nTreg določenih s pretočno citometrijo ($CD4CD25^{++}CD127^{\text{low}}$) in epigenetsko metodo (FOXP3). Zvezdici označujeta neustrezni (izpuščeni) vrednosti.

	VZOREC	Dnevi	Delež nTreg CD25++CD127 ^{low}	Delež nTreg FOXP3
P6	P6 Levkafer. 02/10/14	0	1,09	13,76
	P6 V1 24/10/14	22	1,22	6,48
	P6 V2 18/11/14	47	1,75	*
	P6 V3 09/12/14	68	1,13	*
	P6 V4 30/12/14	89	1,55	2,16
	P6 V1a 24/02/15	145	1,25	2,91
	P6 V2a 17/03/15	166	1,93	11,56
	P6 V3a 08/04/15	188	8,03	3,47
	P6 V4a 24/04/15	204	1,08	1,66
	P6 DTH 12/05/15	238	1,93	2,59
	P6 DTH 11/06/15	252	2,63	2,46
	Delež povprečno ± SD		2,145 ± 2,010	5,228 ± 4,468
P9	P9 Levkafer. 15/10/14	0	2,82	2,48
	P9 V1 19/11/14	44	2,91	2,13
	P9 V2 10/12/14	64	3,74	1,63
	P9 V3 30/12/14	85	3,29	2,69
	P9 V4 21/01/15	107	4,11	1,83
	P9 DTH 05/02/15	122	3,59	3,23
	P9 V1a 19/03/15	164	3,62	1,42
	P9 V2a 10/04/15	185	6,36	3,04
	P9 V3a 29/04/15	204	3,46	2,67
	P9 V4a 21/05/15L	226	4,59	1,37
	P9 DTH 02/06/15	238	4,26	2,28
	P9 DTH 30/06/15	266	5,71	1,79
	Delež povprečno ± SD		4,038 ± 1,073	2,213 ± 0,6210
P13	P13 Levkafer. 11/03/15	0	4,27	4,82
	P13 V1 14/04/15	33	3,93	4,91
	P13 V2 05/05/15	54	5,19	4,56
	P13 V3 26/05/15	77	4,54	5,84
	P13 V4 16/06/15	96	4,86	4,10
	P13 DTH 30/06/15	112	5,26	5,54
	P13 DTH 25/11/15	258	6,29	8,05
	P13 DTH 22/12/15	285	6,21	7,27
Delež povprečno ± SD			5,07 ± 0,85	5,64 ± 1,38

P14	P14 Levkafer. 18/03/15	0	4,33	7,68
	P14 V1 24/04/15	37	0,33	5,03
	P14 V2 15/05/15	58	3,83	4,85
	P14 V3 09/06/15	83	4,83	4,66
	P14 V4 23/06/15	97	4,28	5,98
	P14 V1a 18/8/15	153	3,68	2,72
	P14 DTH 04/11/15	231	3,42	2,64
	P14 DTH 02/12/15	259	3,65	3,14
	P14 DTH 29/12/15	286	5,38	6,05
	Deležpovprečno ± SD		3,75 ± 1,43	4,75 ± 1,70

Z epigenetsko metodo ugotavljanja deležev nTreg smo v povprečju določili višje vrednosti kot s pretočno citometrijo, ob tem pa so bili rezultati tudi bolj razpršeni. Samo v vzorcih bolnika P9 smo z epigenetsko metodo določili nižje deleže nTreg in manjše sipanje rezultatov. Z neparnim dvostranskim t-testom smo pokazali, da se povprečne vrednosti deležev nTreg določenih z epigenetsko metodo in pretočno citometrijo v vzorcih bolnikov P6 ($p = 0,054$), P13 ($p = 0,339$) in P14 ($p = 0,194$) med seboj niso statistično značilno razlikovale (NS, $p > 0,05$), tiste, ki smo jih določili v vzorcih bolnika P9 pa so bile statistično značilno različne ($p < 0,0001$) (Slika 18).

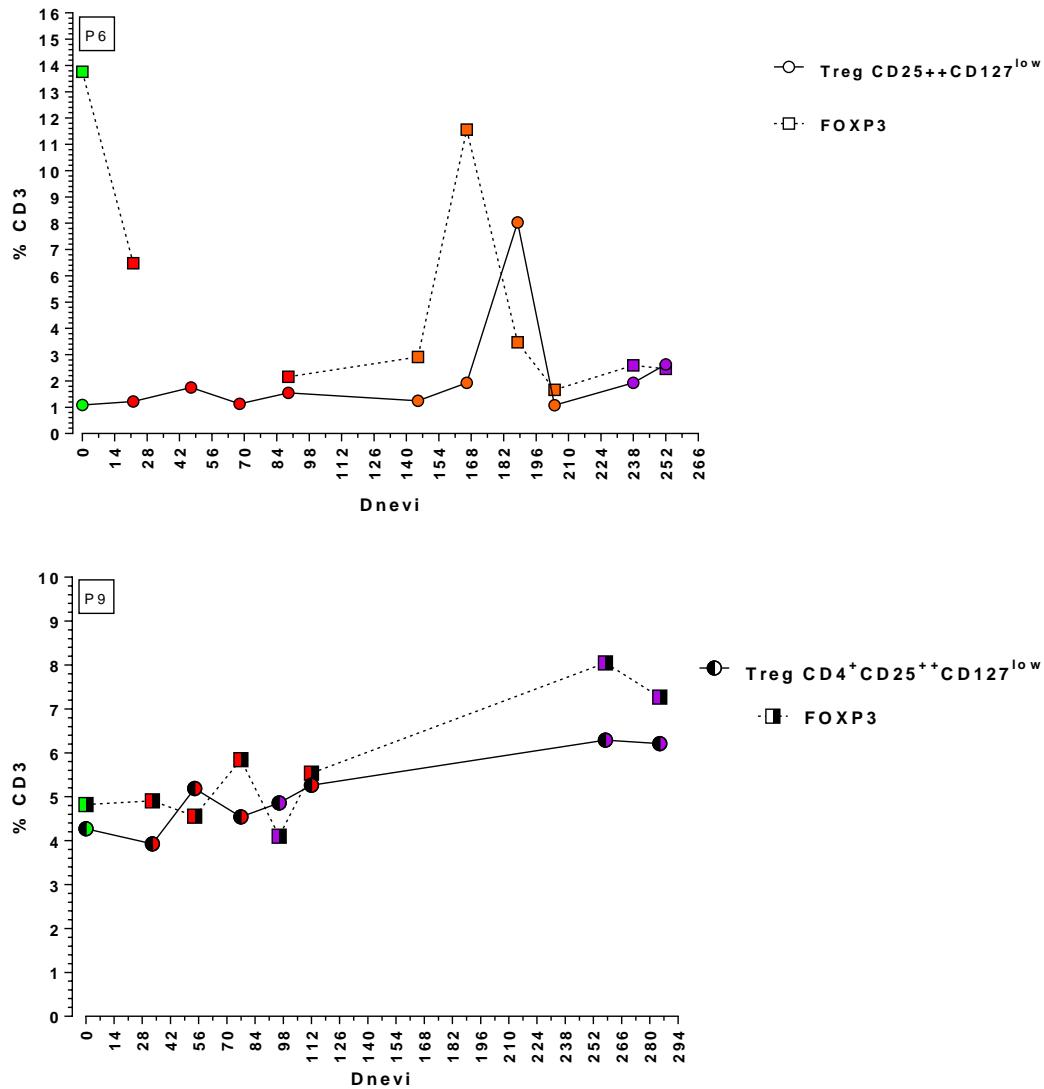


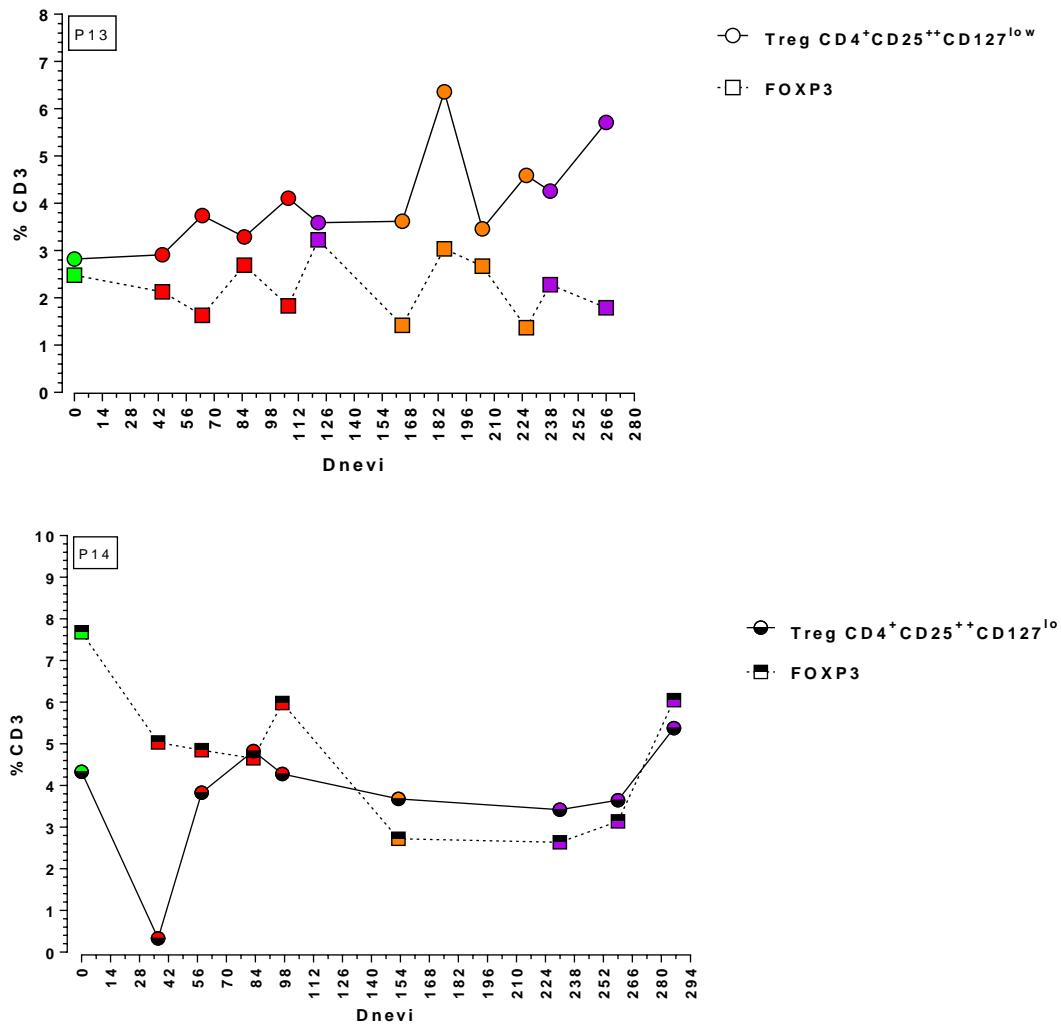
Slika 18: Grafični prikaz deležev nTreg (% CD3 limfocitov T), določenih s pretočno citometrijo ($CD4CD25^{++}CD127^{low}$) in epigenetsko metodo (FOXP3) za bolnika P6 – levo zgoraj, P9 – desno zgoraj, P13 – levo spodaj in P14 – desno spodaj. Rdeče črte prikazujejo povprečne vrednosti in standardne napake; NS – statistično neznačilno.

Izračunani deleži nTreg v posameznih vzorcih krvi bolnikov, odvzetih v določeni časovni točki med imunsko modulacijo ne kažejo korelacije med metodama (P6: $R^2 = 0,036$; P9: $R^2 = 0,0000086$; P14: $R^2 = 0,228$), edino izjemo z boljšo povezanostjo rezultatov, predstavlja vzorci P13 ($R^2 = 0,597$). Tudi nekateri podatki iz literature navajajo slabo korelacijo med rezultati teh dveh metod. Tako so statistično neznačilno korelacijo med določanjem deležev nTreg z epigenetsko metodo in pretočno citometrijo dokazali tudi v študiji, v okviru katere so z obema metodama ugotavljali deleže limfocitov nTreg pri bolnikih s kronično vnetno črevesno boleznijo (11). Obstaja tudi velika dilema glede odgovora na vprašanje ali je FOXP3 dovolj specifičen označevalec za določanje nTreg, saj se pri človeku prehodno izraža tudi pri aktiviranih efektorskih $CD4^+$ limfocitih T (7). Prav tako v literaturi navajajo, da so v tumorskih tkivih prisotni predvsem limfociti nTreg, FOXP3 pa izražajo tudi določene celice

iTreg (8). Stopnja metilacije področja TSDR na genu FOXP3 je najverjetneje pri celicah nTreg nižja kot pri iTreg, zato z epigenetsko metodo določamo primarno le nTreg, medtem ko s pretočno citometrijo določujemo obe podvrsti, kar bi lahko bil vzrok za razlike v rezultatih obeh metod (6, 7, 9, 11).

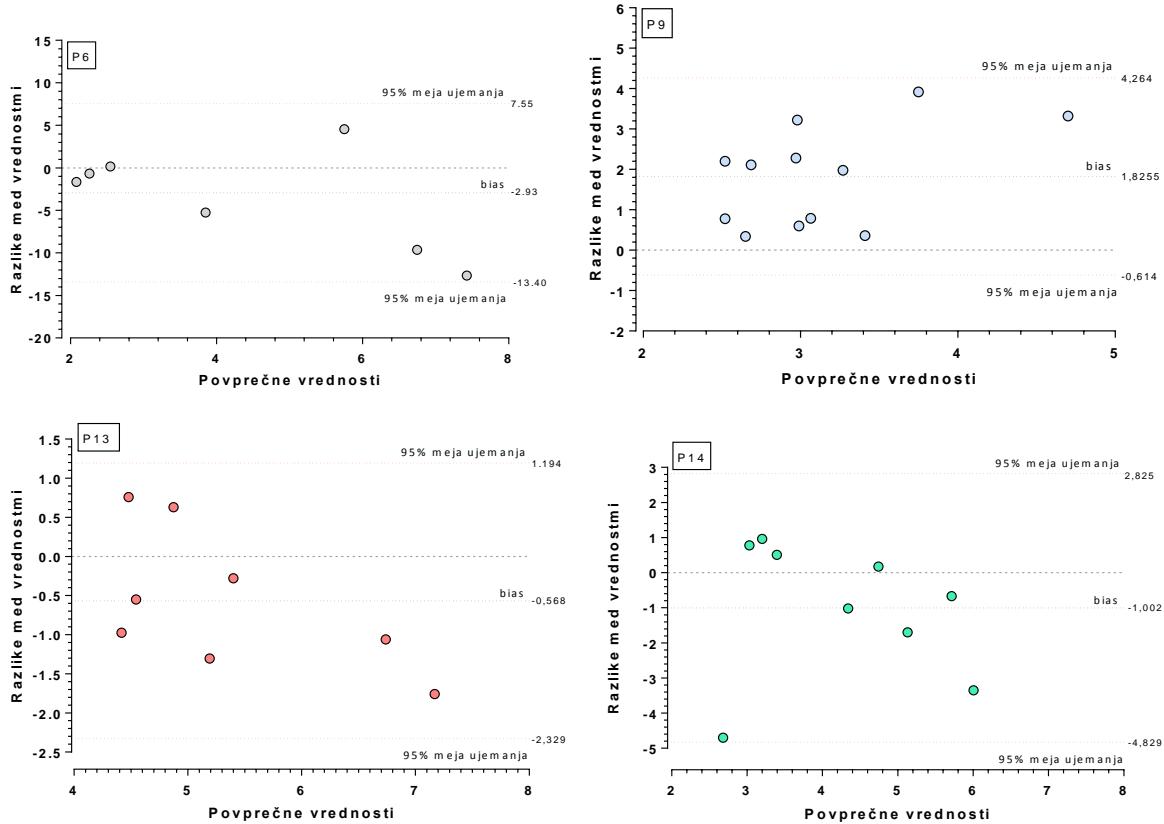
Kljub temu pa smo z obema načinoma detekcije zaznali dinamično spremenjanje deležev nTreg med celotnim potekom imunske modulacije, kar prikazuje Slika 19.





Slika 19: Grafični prikaz dinamičnih nihanj deležev nTreg, določenih s pretočno citometrijo ($CD4^+CD25^+CD127^{nizko}$) in epigenetsko metodo (FOXP3), v vzorcih bolnikov po vrsti od zgoraj navzdol – P6, P9, P13 in P14, ki so bili odvzeti v različnih časovnih obdobjih med potekom izvajanja imunske modulacije. Zelena barva – vzorec odvzet pred imunsko modulacijo; rdeča barva – vzorec odvzet med 1. serijo imunske modulacije; oranžna barva - vzorec odvzet med 2. serijo imunske modulacije; vijolična barva - vzorec odvzet ob preverjanju imunskih odzivov *in vivo*.

Rezultate obeh metod smo medsebojno primerjali z Bland-Altmanovim testom in izsledke statistične analize prikazali v obliki grafov za vsak preiskovani vzorec posebej (Slika 20).



Slika 20: Bland-Altmanovi grafi, ki prikazujejo sisanje vrednosti razlik deležev nTreg, določenih z obema metodama v vzorcih bolnikov: P6 – levo zgoraj, P9 – desno zgoraj, P13 – levo spodaj in P14 – desno spodaj. Prikazane so tudi vrednosti biasov (odstopanj) in 95 % meja ujemanj.

Metodi sta ekvivalentni, če je povprečno odstopanje (bias) blizu vrednosti 0, kar pomeni, da je raspršenost razlik med rezultati določenimi z vsako od uporabljenih metod enakomerno porazdeljena, pri čemer daje enkrat više rezultate prva metoda, drugič pa druga (32). Ugotovili smo, da so bila povprečna odstopanja rezultatov (bias) primerjanih metod različna od vrednosti 0 pri vseh skupinah preiskovanih vzorcev. Najnižjo vrednost biasa, ki je bila najbližje vrednosti 0 (-0,5675), smo zabeležili pri primerjavi rezultatov v skupini P13, kjer smo ugotovili tudi najožje 95% meje ujemanja. Te je statistični program izračunal na podlagi standardnih odklonov (SD) povprečnih vrednosti. Vrednost SD je bila najnižja v skupini rezultatov P13 ($SD = 0,8987$), najvišja pa v skupini rezultatov P6 ($SD = 5,345$), medtem ko sta bili v ostalih dveh skupinah, to je P9 in P14 vrednosti SD 1,245 (P9) in 1,953 (P14). Vrednost

biasa je bila pozitivna le pri rezultatih meritev vzorcev P9, kar je skladno s predhodno predstavljenimi izsledki, saj smo nasprotno kot pri vzorcih ostalih bolnikov le v tem primeru z epigenetsko metodo določili nižje povprečne deleže nTreg kot s pretočno citometrijo.

Na podlagi rezultatov statističnih analiz smo zaključili, da primerjani metodi določanja deležev nTreg dajeta sistematično različne rezultate in da so zaradi tega le-ti med seboj slabo primerljivi.

Limfociti nTreg, ki infiltrirajo tumorje izražajo veliko fenotipsko in funkcionalno raznovrstnost, kar je vzrok za njihovo izjemno plastičnost, ki lahko vpliva na izid bolezni. Videti je, da genetski in okoljski dejavniki spodbujajo razlike v izražanju genov, ki določajo funkcijalne značilnosti celic nTreg. Če to drži, bi bilo seveda pri preučevanju njihovih vplivov na različne bolezni smiselno uporabiti personaliziran pristop za njihovo določanje, pri čemer bi imele analize, ki temeljijo na epigenetskih mehanizmih še posebej pomembno vlogo (14).

5 SKLEP

V laboratoriju nam je uspelo vzpostaviti epigenetsko metodo za določanje deležev nTreg v vzorcih DNA izolirane iz periferne krvi bolnikov s hormonsko odpornim rakiom prostate. Metoda temelji na reakciji qPCR, ki omogoča absolutno kvantifikacijo celic nTreg in CD3⁺ limfocitov T. To smo dosegli z uporabo redčitev eksternega plazmidnega standarda, s pomočjo katerih smo v preiskovanih vzorcih določili koncentracije molekul DNA, ki imajo na genu za FOXP3 demetilirana specifična področja in zato izražajo jedrni transkripcijski dejanik FOXP3 ter koncentracijo tistih molekul DNA, ki izražajo gen CD3 za splošni površinski označevalec limfocitov T. Z analizo smo prišli do naslednjih izsledkov:

- S primerjavo deležev nTreg v vzorcih bolnikov in zdravih oseb, ki smo jih določili z epigenetsko metodo, nismo ugotovili višjih deležev nTreg v vzorcih bolnikov, v primerjavi z zdravimi osebami.
- S statistično primerjavo deležev nTreg, določenih z epigenetsko metodo in s pretočno citometrijo smo ugotovili, da korelacije med njimi praktično ni, ali pa je zelo slaba.

Ker bisulfitna pretvorba, ki je del epigenetske metode, močno spremeni molekule DNA, saj jih denaturira in fragmentira, bi to lahko vplivalo na določitev deležev celic, ki izražajo FOXP3 in

CD3, v posameznih vzorcih. Na rezultate bi lahko vplivala tudi slabša učinkovitost reakcij qPCR pri meritvah preiskovanih vzorcev bolnikov, ki smo jo ugotovili z nakloni standardnih umeritvenih krivulj, izdelanih s pomočjo eksternih plazmidnih standardov. Slaba učinkovitost reakcije PCR kaže na neoptimalne pogoje reakcije. Zaznali smo tudi neustrezno ponovljivost med paralelnimi določitvami nekaterih vzorcev, kar bi lahko bila posledica visokih vrednosti Cq oz. določanja koncentracij na spodnji meji detekcije metode, zaradi česar smo morali nekatere rezultate ekstrapolirati.

Ob vsem tem se moramo zavedati tudi pomanjkljivosti predpostavk, da je področje TSDR gena FOXP3 specifičen označevalec celic nTreg in da je delež teh celic povečan v tumorskih tkivih. Slednje je namreč odvisno predvsem od vrste tumorja in stopnje bolezni, kar so jasno pokazale nekatere študije.

Epigenetska metoda določanja deležev nTreg je sicer bolj specifična kot pretočna citometrija, ki določa tako nTreg kot iTreg, vendar pa je časovno potratna, kompleksnejša in težja za izvajanje, predvsem pa dražja od pretočne citometrije, zato v obliki, ki smo jo razvili še ni primerna za rutinsko uporabo. Ker limfociti nTreg predstavljajo le okoli 5 % vseh CD4⁺ limfocitov T, ni bilo presenetljivo, da smo izraženost gena FOXP3 določali na spodnji meji detekcije, zaradi česar smo pri visokih vrednostih Cq imeli slabšo ponovljivost meritev.

Zaključimo lahko, da naša epigenetska metoda še ni zrela za uporabo v klinične namene in da bi jo bilo potrebno ustrezno modificirati ter raziskati in optimizirati številne parametre, ki vplivajo na njene rezultate ter ob tem pomisliti tudi na vključitev personaliziranega pristopa za določanje deležev nTreg.

6 LITERATURA

1. Dupont C, Randall Armant D, Brenner C: Epigenetics: Definition, Mechanisms and Clinical Perspective. *Semin Reprod Med.* 2009; 27(5): 351-357.
2. Felsenfeld G: A Brief History of Epigenetics. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014;6:a018200.
3. Inbar-Feigenberg M, Choufani S, Butcher D, Roifman M, Weksberg R: Basic concepts of epigenetics. *Fertility and Sterility* 2013; 99(3): 607-15.
4. Phillips T: The role of methylation in gene expression. *Nature Education* 2008; 1(1):116.
5. <https://www.cincinnatichildrens.org/research/cores/pyrosequencing/services/methylation> (Dostop 13.9.2016)
6. Lal G, Bromberg J S: Epigenetic mechanisms of regulation of Foxp3 expression. *Blood* 2009; 114: 3727-3735.
7. Jeras M, Švajger U: Imunska toleranca. *Zdrav Vestn* 2011; 80: 944-56.
8. Kosmaczewska A, Ciszak L, Potoczek S, Frydecka I: The significance of Treg cells in defective tumor immunity. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 2008; 56, 181-191.
9. Liu J, Lluis A, Illi S, Layland L, Olek S, von Mutius E, Schaub B: T Regulatory Cells in Cord Blood – FOXP3 Demethylation as Reliable Quantitative Marker. *Plos One* 2010; 5(10):e13267.
10. Male D, Brostoff J, Roth D B, Roitt I: *Immunology*, 7th Edition, Elsevier Ltd 2006: 222-4.
11. Brandhorst G, Todorova P. D, Weigand S, Eberle C, von Ahsen N, Schmitz J, Schultze F, Raddatz D, Karaus M, Oellerich M, Walson P: Lack of correlation between Treg quantification assays in inflammatory bowel disease patients. *World J Gastroenterol* 2015; 21(11): 3325-3329.

12. Lal G, Zhang N, Touw W, Ding Y, Ju W, Bottinger E, Reid, P, Levy D, Bromberg J: Epigenetic Regulation of Foxp3 Expression in Regulatory T Cells by DNA Methylation. *The Journal of Immunology* 2009; 182: 259-273.
13. http://www.devbio.biology.gatech.edu/?page_id=3412 (Dostop 13.9.2016)
14. Whiteside TL: The role of regulatory T cells in cancer immunology. Dove Medical Press Limited 2015; Volume 2015:4: 159-171.
15. Thomas A, Fisher J, Rahme G, Hampton T, Baron U, Olek S, Schwachula T, Rhodes H, Gui J, Tafe L, Tsongalis G, Lefferts J, Wishart H, Kleen J, Miller M, Whipple C, Abreu F, Ernstoff M, Fadul C: Regulatory T cells are not a strong predictor of survival for patients with glioblastoma. *Neuro-Oncology* 2015; 17(6): 801-809.
16. Sehouli J, Ioddenkemper C, Cornu T, Schwachula T, Hoffmüller U, Grützkau A, Lohneis P, Dickhaus T, Grüne J, Kruschewski M, Mustea A, Turbachova I, Baron U, Olek S: Epigenetic quantification of tumor-infiltrating T-lymphocytes. *Epigenetics* 2011; 6(2):236-246.
17. Vozelj M: Temelji imunologije, 1.izdaja, DZS, Ljubljana, 2000: 233-51.
18. Abbas A, Lichtman A, Pillai S: Cellular and molecular immunology, 8th Edition, Elsevier, Philadelphia, 2014: 519-23.
19. <http://www.ucl.ac.uk/eastman/research/departments/biomaterials-and-tissue-engineering/facilities/flow-cytometry> (Dostop 15.9.2016)
20. http://studentski.net/gradivo/ulj_ffa_lb1_bma_vaj_pretocna_citometrija_01__gradivo?r=1 (Dostop 10.10.2016)
21. Zilberman D, Henikoff S: Genome-wide analysis of DNA methylation patterns. *Development* 2007; 134: 3959-3965.
22. Furman M: Epigenetsko določanje deleža naravnih FOXP3⁺ regulatornih limfocitov T v vzorcih človeške periferne krvi. Magistrska naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2016: 1-42.

23. http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/oneshottop10_man.pdf
24. <http://www.nanodrop.com/Library/T009-NanoDrop%201000-&-NanoDrop%208000-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf> (Dostop 10.10.2016)
25. http://www6.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/quant_pcr.pdf (Dostop 10.10.2016)
26. Repnik K, Potočnik U: Genomika v biomedicinski tehnologiji, Navodila za laboratorijske vaje, Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Maribor 2013/2014: 18-21.
27. <http://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-guide-bio-rad.pdf> (Dostop 10.10.2016)
28. Boyer R: Temelji biokemije, Študentska založba, Ljubljana, 2005: 338-41.
29. <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=9dabebff-fd12-4183-a428-6984c8569fb9&lang=en> (Dostop 14.10.2016)
30. Holmes E, Jung M, Meller S, Leisse A, Sailer V, Zech J, Mengdehl M, Garbe LA, Uhl B, Kristiansen G, Dietrich D: Performance Evaluation of Kits for Bisulfite-Conversion of DNA from Tissues, Cell Lines, FFPE Tissues, Aspirates, Lavages, Effusions, Plasma, Serum, and Urine. PLoS ONE 2014; 9(4): e93933.
31. Yokokawa J, Cereda V, Remondo C, Gulley J, Arlen P, Schlom J, Tsang K: Enhanced Functionality of CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ Regulatory T Cells in the Peripheral Blood of Patients with Prostate Cancer. Clin Cancer Res 2008; 14(4): 1032-40.
32. <http://www.graphpad.com/guides/prism/6/user-guide/index.htm> (Dostop 17.10.2016)