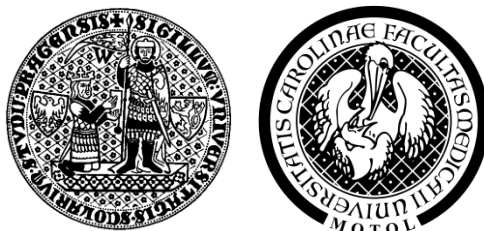


Univerzita Karlova

2. lékařská fakulta

Studijní program: Imunologie



Mgr. Simona Partlová

**Nádorové mikroprostředí a význam protinádorové imunity
pro klinický průběh lidských nádorových onemocnění**

**Tumor microenvironment and the importance of anti-tumor
immunity for clinical course of human cancers**

Dizertační práce

Vedoucí závěrečné práce: prof. MUDr. Radek Špišek, PhD.

Praha, 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 20.10.2016

SIMONA PARTLOVÁ

Identifikační záznam:

PARTLOVÁ, Simona. *Nádorové mikroprostředí a význam protinádorové imunity pro klinický průběh lidských nádorových onemocnění. [Tumor microenvironment and the importance of anti-tumor immunity for clinical course of human cancers]*. Praha, 2016., 119s, 4 příl., Dizertační práce (PhD.). Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Ústav imunologie. Vedoucí závěrečné práce: Radek Špíšek

ABSTRAKT

Vznik a progresse nádoru se velmi liší v závislosti na typu nádoru, jeho lokalizaci, invazivitě, imunogenicitě a z velké části také na schopnosti aktivace imunitního systému. Dochází k četným interakcím mezi nádorovými buňkami a buňkami imunitního systému, ať již lokálně v místě vzniku primárního nádoru, nebo cestou působení různých mediátorů a cytokinů. Hlavním předmětem této práce bylo studium klíčových složek a aspektů imunitní odpovědi u pacientů s nádorovým onemocněním.

V rámci našeho výzkumu jsme analyzovali zastoupení buněk imunitního systému v jednotlivých stádiích onemocnění pacientek s karcinomem ovaria. V této práci jsme si kladli za cíl sledovat dynamiku imunitní odpovědi, a to převážně v kontextu zastoupení jednotlivých populací T lymfocytů v periferní krvi a T lymfocytů infiltrujících do nádoru v časných a pokročilých stádiích onemocnění. Zjistili jsme, že v průběhu progresse karcinomu ovaria dochází k postupnému snížení prozánětlivé Th17 a Th1 imunitní odpovědi a dochází ke specifické migraci regulačních T lymfocytů do nádorové tkáně, jejímž důsledkem je silná imunosuprese v nádorovém mikroprostředí.

Dále jsme prokázali, že se povaha imunitní odpovědi u pacientů s HPV-asociovanými nádory hlavy a krku výrazně liší od pacientů, jejichž nádory nejsou indukovány virovou infekcí. U HPV-pozitivních pacientů jsme zjistili významně vyšší zastoupení buněk imunitního systému v nádorové tkáni, a to převážně CD8+ T lymfocytů. Tyto buňky vykazují vyšší potenciál k aktivaci, což jsme prokázali produkcí cytokinů IFN γ a IL-17. U HPV-pozitivních pacientů jsme navíc detekovali nižší mRNA expresi genu Cox-2 a vyšší expresi genu PD-1.

Klíčová slova: nádorové mikroprostředí, imunitní systém, nádorová buňka, imunitní infiltrát, T lymfocyty

ABSTRACT

Cancer development and progression vary depending on tumor type, localization, invasion, immunogenicity and the ability of immune system to become activated. There are frequent interactions between tumor cells and immune cells, occurring locally at the site of primary tumor or distally through paracrine signalling of various mediators and cytokines.

The main subject of this PhD thesis is to study key factors and aspects of immune response in cancer patients.

In the first part, we analyzed immune cells infiltrating tumor tissues of ovarian cancer patients at different stages of disease. We focused on the dynamics of immune response, primarily on frequency of individual T lymphocyte populations in peripheral blood and tumor infiltrating T lymphocytes in tumors of early and advanced stages of ovarian cancer. We found that during disease progression there is a gradual decrease of proinflammatory Th17 and Th1 immune responses and a specific recruitment of regulatory T cells to the tumor site, which results in a significant immune suppression in the tumor microenvironment.

In the second part, we demonstrated that the character of immune response in HPV-positive head and neck cancer patients is very different from the patients with tumors not associated with HPV infection. In HPV-positive patients, significantly higher frequency of immune cells, predominantly CD8⁺ T cells, is observed in the tumor tissue. These cells seem to have a higher potential for activation as confirmed by IFN γ and IL-17 production. Furthermore, patients with HPV-positive tumors had significantly lower expression of Cox-2 mRNA and higher expression of PD1 mRNA compared to HPV-negative tumors.

Key words: tumor microenvironment, immune system, tumor cell, immune infiltrate, T lymphocytes

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Prof. MUDr. Radku Špiškoví, PhD. za cenné připomínky a odborné vedení, kterým přispěl k vypracování této dizertační práce. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Anně Fialové, PhD. za vstřícnost, pomoc při psaní manuskriptů, cenné rady a zasvěcení do laboratorních metod a vědecké práce. Děkuji celému kolektivu pracovníků Ústavu imunologie 2. LF UK a FN Motol a společnosti Sotio za přátelské prostředí, pomoc při provádění experimentů a diskuse při řešení projektů.

Speciální poděkování za podporu, důvěru a trpělivost náleží celé mé rodině a přátelům, zvláště Kamile.

OBSAH

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 1 | Úvod | 12 |
| 2 | Klíčové kroky v evoluci nádorů..... | 13 |
| 2.1 | Procesy zahrnuté v přeměně z normálního na invazivní fenotyp | 14 |
| 2.1.1 | Transformace a iniciace | 14 |
| 2.1.2 | Angiogeneze | 15 |
| 2.1.3 | Invaze..... | 15 |
| 3 | Nádorové mikroprostředí | 17 |
| 3.1 | Složky nádorového mikroprostředí..... | 17 |
| 3.1.1 | Nádorové buňky a jejich metabolismus..... | 17 |
| 3.1.2 | Stroma..... | 19 |
| 3.1.2.1 | Nádorové fibroblasty..... | 19 |
| 3.1.2.2 | Extracelulární matrix..... | 21 |
| 4 | Role imunitního systému v obraně proti nádorům | 24 |
| 4.1 | Imunitní buňky infiltrující do nádoru a jejich prognostický význam | 25 |
| 4.1.1 | Pomocné T lymfocyty..... | 26 |
| 4.1.2 | Cytotoxické CD8+ T lymfocyty | 29 |
| 4.1.2.1 | Nádorově/virově-specifické CTLs | 30 |
| 4.1.2.2 | Dysfunkční fenotyp cytotoxických T lymfocytů | 32 |
| 4.1.3 | Buňky prezentující antigen | 33 |
| 4.1.3.1 | Dendritické buňky | 34 |
| 4.1.3.1.1 | Myeloidní dendritické buňky infiltrující do nádoru | 35 |
| 4.1.4 | Populace supresorových buněk..... | 36 |
| 4.1.4.1 | Regulační T lymfocyty..... | 36 |
| 4.1.4.2 | Myeloidní supresorové buňky..... | 38 |
| 4.2 | Chemokiny a jejich úloha v nádorovém mikroprostředí | 40 |
| 5 | Dynamický vztah nádoru a imunitního systému, Imunogenicita nádorů | 43 |
| 6 | Možnosti imunoterapie nádorů | 46 |
| 6.1 | Imunoterapie založené na protilátkách | 46 |
| 6.2 | Imunoterapie založené na buňkami zprostředkovaných mechanismech .. | 47 |
| 7 | Cíle práce..... | 49 |
| 8 | Seznam použitých metod | 50 |
| 9 | Výsledky a diskuse..... | 51 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 9.1 | Příloha 1: Dynamika T buněk infiltrujících do nádoru během progresse onemocnění pacientek s ovariálním karcinomem | 51 |
| 9.2 | Příloha 2: Rozdílný vzorec imunitních buněk infiltrujících do nádoru u pacientů s HPV-asociovanými a HPV-negativními nádory hlavy a krku..... | 63 |
| 9.3 | Příloha 3: Využití vysokého hydrostatického tlaku k navození imunogenní buněčné smrti u lidských nádorových buněk | 77 |
| 9.4 | Příloha 4: Exprese antigenů na primárních nádorových buňkách karcinomu ovaria v porovnání s lidskými ovariálními nádorovými liniemi..... | 91 |
| 10 | Souhrn | 99 |
| 11 | Summary | 101 |
| 12 | Závěr | 103 |
| 13 | Seznam citované literatury | 104 |

SEZNAM ZKRATEK

| | |
|--------|---|
| ACT | adoptivní buněčný transfer |
| ADC | protilátka konjugovaná s toxinem |
| ADCC | buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách |
| APC | buňka prezentující antigen |
| ARG1 | argináza 1 |
| ATP | adenosintrisfosfát |
| BDCA | „blood dendritic cell antigen“ |
| CAF | fibroblast asociovaný s nádory |
| CAR | chimérický receptor |
| Cox-2 | cyklooxygenáza 2 |
| CRT | kalretikulin |
| CSF-1 | faktor stimulující kolonie |
| CT | „cancer testis“ antigen |
| CTAG | „cancer testis antigen“ |
| CTL | cytotoxický lymfocyt |
| CTLA-4 | cytotoxický lymfocytární antigen |
| DAMPs | „damage-associated molecular patterns“ (signály nebezpečí) |
| DC | dendritická buňka |
| ECM | extracelulární matrix |
| EGF | epidermální růstový faktor |
| EMT | epiteliálně-mezenchymální přeměna |
| FasL | Fas ligand |
| FDA | „Food and Drug Administration“ (úřad pro kontrolu potravin a léčiv) |
| FDC | folikulární dendritická buňka |
| GAGE | G antigen |
| GM-CSF | faktor stimulující růst granulocytů a makrofágů |
| GMP | správná výrobní praxe |
| HHP | vysoký hydrostatický tlak |
| HIF1 | hypoxií indukovaný faktor 1 |
| HLA | lidský leukocytární antigen |
| HMGB1 | „high-mobility group box 1“ |
| HNSCC | skvamózní nádory hlavy a krku |

| | |
|-------------------|---|
| HPV | lidský papillomavirus |
| HSP | protein tepelného šoku |
| ICD | imunogenní buněčná smrt |
| iDC | nezralá dendritická buňka |
| IDO | indoleamin 2,3-dioxygenáza |
| IFN | interferon |
| IL | interleukin |
| iNOS | indukovatelná syntáza oxidu dusnatého |
| LAG-3 | lymfocytární aktivační gen 3 |
| LAK | lymfokiny aktivovaní zabíječi |
| LOX | lyzyl oxidáza |
| LCMV | chronická lymfocytická choriomeningitidová virová infekce |
| MAGE | melanomový antigen E |
| mDC | myeloidní dendritická buňka |
| M-CSF | faktor stimulující makrofágy |
| MCT | protein transportující monokarboxylové kyseliny |
| MDSC | myeloidní supresorová buňka |
| MHC | hlavní histokompatibilní komplex |
| MMP | matrix metaloproteináza |
| NO | oxid dusnatý |
| NK | „natural-killers“ (přirození zabíječi) |
| Nrp-1 | neuropilin 1 |
| ONOO ⁻ | peroxynitrit |
| PD-1 | molekula programované smrti 1 |
| pDC | plasmacytoidní dendritická buňka |
| PDGF | destičkový růstový faktor |
| PD-L1 | ligand molekuly programované smrti 1 |
| PGE2 | prostaglandin E2 |
| pHi | intracelulární pH |
| pHe | extracelulární pH |
| ROS | kyslíkový radikál |
| SDF1 | stromální faktor 1 |
| SSX | „synovial sarcoma X breakpoint protein“ |
| TCR | T buněčný receptor |

| | |
|---------------|--|
| TFH | folikulární pomocná T buňka |
| Th | pomocný T lymfocyt |
| TIDC | dendritická buňka infiltrující do nádoru |
| TIL | lymfocyt infiltrující do nádoru |
| Tim-3 | „T cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3“ |
| TLR | toll like receptor |
| TME | nádorové mikroprostředí |
| TNF | faktor způsobující nekrózu nádorů |
| Treg | regulační T lymfocyt |
| VEGF | vaskulární endoteliální růstový faktor |
| VEGFR | receptor vaskulárního endoteliálního růstového faktoru |
| α -SMA | aktin hladkého svalstva |

1 ÚVOD

Nádorová onemocnění vznikají postupnými genetickými změnami, které umožňují autonomní růst buněk a jejich nezávislost na regulačních mechanismech hostitele. Tyto vlastnosti získávají buňky zejména mutacemi genů, které jsou klíčové pro buněčnou proliferaci. Primární genetické změny jsou zásadní pro vznik maligního klonu, ale pro růst a další progresi nádoru musí dojít k adaptaci buněk na nádorové mikroprostředí.

Při kontrole růstu nádorových buněk, a to zejména v raných stádiích nádorového bujení, hraje významnou roli imunitní systém. Imunitní reakce na nově vznikající nádor má komplexní charakter a jsou do ní zapojeny mechanismy nespecifické i specifické imunity. Vznik nádorového onemocnění je komplexní několika stupňový proces, v němž nádorové buňky představují heterogenní populaci zasazenou do kontextu mikroprostředí nenádorových buněk a tkání a dohromady tvoří složitý nádorový „ekosystém“. Experimentální data jednoznačně prokazují, že imunitní systém je schopen kontrolovat růst nádorových buněk v raných stádiích nádorového růstu, i ve stádiu tzv. preneoplázie. S progresí nádoru jsou však imunitní mechanismy postupně potlačovány, tak jak nádorová tkáň postupně vyvíjí mechanismy, kterými se aktivní protinádorové odpovědi brání. V některých případech dochází k situaci, kdy jsou efektorové mechanismy imunitního systému nejen potlačeny, ale dokonce dojde k využití některých jeho složek ve prospěch nádorových buněk.

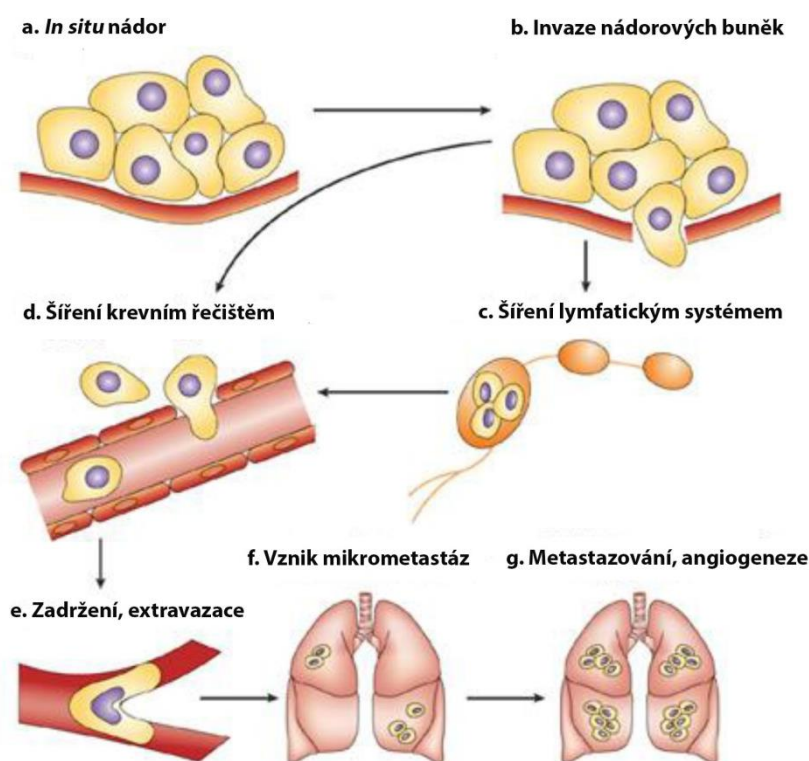
V této dizertační práci je v první části podán přehled o současném pohledu na nádorové mikroprostředí, s detailnějším zaměřením na význam imunitního systému. Správně fungující imunita je udržována především rovnováhou všech jejích složek. Imunitní systém je velmi složitý a jeho ovlivňování nemusí znamenat vždy stejný výsledek. Proto neexistuje univerzální léčebný přípravek pro podporu imunity a je potřeba studovat povahu imunitní odpovědi za účelem vývoje nových imunoterapeutických protokolů zacílených na konkrétní typy nádorových onemocnění. Druhou část tvoří soubor původních prací, které přímo souvisí s tématem dizertační práce, prošly recenzním řízením a byly publikovány v mezinárodních vědeckých časopisech se známým impakt faktorem.

2 KLÍČOVÉ KROKY V EVOLUCI NÁDORŮ

Buňky v tkáních nepřetržitě vnímají biochemický a mechanický stav jejich prostředí, převádí extracelulární signály na intracelulární, propojují tyto signály a odpovídají na ně. Tyto odpovědi zahrnují metabolické změny, změny genové exprese, růstu, diferenciaci, buněčného dělení, pohybu či apoptózy. K udržení tkáňové homeostázy je v mnohobuněčných organismech nezbytná přesná kontrola aktivity somatických kmenových buněk. K zajištění efektivní výměny poškozených buněk musí být proliferační aktivita kmenových a progenitorových buněk v souladu s požadavky tkání v daném okamžiku. Z doposud publikovaných výsledků je patrné, že jsme teprve na počátku porozumění složitě provázaným regulačním mechanismům. Objasnění těchto mechanismů neposkytuje pouze pohled na základní mechanismy regulace kmenových buněk, ale také vysvětlení molekulární podstaty tkáňové dysfunkce, zahrnující například degeneraci způsobenou věkem či nádorovým bujením.

Nádorové bujení je proces, při kterém v organismu vznikne tkáň, která není součástí jeho běžné anatomie. Vzniká při něm patologický klon buněk odvozených od jedné buňky, ve které vznikla genetická porucha. To vede ke změně chování buněk patřících do nádorového klonu, což posléze zvýhodňuje nádorovou buňku oproti buňkám normálním. Nádory se dělí na benigní, pre-maligní a maligní. Za maligní nádor je považován stav, při kterém dochází k abnormálnímu růstu buněk, jejich nekontrolovanému množení, jejich schopnosti invadovat do přilehlých tkání a šířit se do vzdálenějších míst v těle pomocí krevního a lymfatického systému (Biteau et al., 2011; Kim et al., 2011). Hanahan a Weinberg v roce 2000 popsali šest základních vlastností charakterizujících proces nádorového bujení (Hanahan and Weinberg, 2000):

- soběstačnost v produkci růstových faktorů – normální buňky vyžadují signál, který vede ke spuštění proliferační aktivity, nicméně mnoho nádorových buněk tyto růstové signály dokáže produkovat také;
- snížená vnímavost k inhibitorům buněčného růstu – buňky ignorují vnitřní i vnější signály, které regulují buněčnou proliferaci;
- schopnost unikat apoptóze;
- schopnost neomezeně se množit;
- angiogeneze;
- invazivita a metastazování.



Obr. 1: Schéma procesu vzniku metastáz

Upraveno dle (Steeg, 2003)

První čtyři zmíněné body jsou charakteristické také pro benigní nádory, zatímco pátý je nezbytně nutný pro nekontrolovaný růst v místě vznikajícího primárního nádoru. To znamená, že hlavní charakteristikou maligních nádorových buněk je jejich schopnost invaze a metastazování, jež je odlišuje od nádorů benigních (obr.1).

2.1 Procesy zahrnuté v přeměně z normálního na invazivní fenotyp

2.1.1 Transformace a iniciace

V počátečních fázích vzniku nádoru dochází nejprve k četným genetickým změnám, které se v buňce hromadí. To je způsobeno imortalizací neboli nekontrolovaným růstem buněk, a to například prostřednictvím aktivace telomerázy, enzymu, jenž brání zkracování chromozomů během buněčného dělení. Tímto dochází ke vzniku klonů, které jsou schopné dalšího růstu a v nichž se s každým novým buněčným dělením genetické mutace nadále akumulují. Dále se jedná o aktivaci

onkogenů, které podporují růst nádoru, inaktivaci tumor-supresorových genů či změny v expresi genů, jež mají za úkol regulovat apoptózu.

2.1.2 Angiogeneze

Nedílnou součástí růstu nádoru je novotvorba cév, kterou je zajištěno dostatečné zásobení rostoucího nádoru živinami. Zpočátku jsou solidní nádory bez vlastního cévního zásobení a jsou tudíž závislé na okolních cévách, ze kterých jsou zásobeny kyslíkem a živinami potřebnými pro svůj růst. S růstem nádoru se však zvyšují i požadavky na množství živin, dokud není zásobení příliš malé na to, aby dokázalo pokrýt výživu celé nádorové masy. Nedostatečný přísun těchto látek pak způsobí, že nádor podlehne nekróze nebo apoptóze (Holmgren et al., 1995; Parangi et al., 1996). Z tohoto důvodu je jasné, že angiogeneze hraje nepostradatelnou roli při nádorové progresi. Cévní novotvorba, včetně nádorové angiogeneze, je několika krokový proces. Na počátku stojí vazodilatace a zvýšení cévní permeability, přičemž hlavním mediátorem vazodilatace je oxid dusnatý (NO) produkovaný NO syntázou v endoteliích. Dalším krokem je migrace endotelií, které však předchází poškození bazální membrány mateřské cévy, což je bezprostředně doprovázeno hypoxií. Endotelie pak v důsledku působení angiogenních faktorů migrují do místa novotvorby, kde proliferují a vytváří novou cévní síť. Posledním krokem v procesu je stabilizace endoteliálních buněk za účasti tzv. murálních buněk (Distler et al., 2003).

2.1.3 Invaze

V době diagnózy je u značné části pacientů s nádorovým onemocněním zjištěna přítomnost metastáz. Proces jednotlivých kroků nutných k úspěšné invazi nádorových buněk do okolních tkání a následnému vytvoření metastázy je nazýván metastatická kaskáda. Prvním krokem při invazi nádorové buňky do okolní tkáně je oddělení této buňky z primárního nádoru. To je způsobeno ztrátou exprese či funkce adhezí molekuly E-kadherinu, čímž dochází ke ztrátě propojení s okolními buňkami a reorganizaci aktinového cytoskeletu.

Nádorové buňky invadují do okolních tkání buď jednotlivě, nebo v malých skupinách buněk a mohou produkovat enzymy, které jim průchod ulehčují. Jejich migraci do okolních cév může napomáhat chemotaxe zprostředkovaná látkami,

jež produkují okolní stromální buňky v reakci na nádor. Bylo například dokázáno, že během invaze dochází k parakrinní signální smyčce mezi nádorovými buňkami produkujícími kolonie-stimulující faktor (CSF-1; colony-stimulating factor) a makrofágy, které produkují epidermální růstový faktor (EGF; epidermal growth factor). Makrofágy přítomné ve stroma obklopujícím nádor jsou atrahovány cytokinem CSF-1, jež produkují nádorové buňky a ty naopak uvolňují chemokiny stimulující další produkci CSF-1, což má za následek migraci nádorových buněk (Green et al., 2009a). Dalším chemkinem napomáhajícím procesu metastazování je chemokin CXCL12. Bylo prokázáno, že CXCL12 a jeho receptor CXCR4 mají klíčovou úlohu v regulaci migrační aktivity nádorových buněk do míst metastáz (Cojoc et al., 2013; Muller et al., 2001).

3 NÁDOROVÉ MIKROPROSTŘEDÍ

3.1 Složky nádorového mikroprostředí

Původní pohled na biologii solidních nádorů předpokládal, že vznik a progresse nádorových onemocnění jsou dány pouze mutacemi a na základě této teorie se mylně věřilo, že nádorová masa existuje víceméně izolovaně a s okolním prostředím ve tkáni komunikuje jen velmi omezeně. V současnosti se však již ví, že nádorové mikroprostředí (TME; tumor microenvironment) představuje jakousi dynamickou síť, která je tvořena nejen samotnými nádorovými buňkami, ale i buňkami nenádorovými – fibroblasty, endoteliálními buňkami a infiltrujícími leukocyty. Důležitou složkou nádorového mikroprostředí jsou také produkty těchto buněk, které se uvolňují do extracelulární matrix, která vše obklopuje. Mezi látky produkované jak nádorovými, tak nenádorovými buňkami, patří především růstové faktory, cytokiny, chemokiny, různé enzymy a metabolity (Witz and Levy-Nissenbaum, 2006). Všechny tyto výše zmiňované komponenty společně se specifickými podmínkami, jako je hypoxie, nízké pH nebo nízká koncentrace glukózy, vytvářejí a charakterizují nádorové mikroprostředí jako celek.

3.1.1 Nádorové buňky a jejich metabolismus

Přirozeně by se mohlo zdát, že rychle se množícím nádorovým buňkám budou nepříznivé podmínky v TME bránit v prospívání a přežívání, nicméně při bližším zkoumání se ukázalo, že se nádorové buňky byly schopny přizpůsobit a přežít i v těchto nevýhodných podmínkách a v mnohých případech je dokonce dokázaly využít ve svůj prospěch (Brahimi-Horn and Pouyssegur, 2007; Liu et al., 2007). Tato schopnost přizpůsobení se může být částečně dána genetickou a epigenetickou nestabilitou a mutacemi (Bindra and Glazer, 2005).

Mezi nejtypičtější jevy charakterizující nádorovou tkáň patří hypoxie. Bylo dokázáno, že buňky rostoucí přímo v nádorové tkáni podléhaly mutacím mnohem častěji oproti stejným buňkám pěstovaným v buněčné kultuře. Kromě toho vystavení buněčné kultury hypoxickým podmínkám zvýšilo frekvenci vzniku mutací nádorových buněk na podobnou úroveň, jaká byla pozorována v nádorové tkáni (Reynolds et al., 1996). V solidních tumorech vznikají v důsledku proliferace nádorových buněk

hypoxické oblasti a během růstu nádoru se neustále zvyšuje nerovnováha mezi přísunem a spotřebou kyslíku (Annibaldi and Widmann, 2010; Gatenby and Gillies, 2004; Wykoff et al., 2001). Tyto periody hypoxie a následné reoxygenace vedou ke vzniku kyslíkových radikálů (ROS; reactive oxygen species), které poškozují membrány buněk a mohou způsobovat jedno i dvouřetězcové zlomy v molekule DNA, abnormální DNA syntézu, bodové mutace a jiná poškození (Bindra and Glazer, 2005; Chang et al., 2002a; Reynolds et al., 1996). Je také známo, že hypoxie indukují nebo naopak potlačují expresi genů, jež hrají významnou roli v procesech angiogeneze, progresi nádoru nebo při produkci růstových faktorů. Vlivem hypoxie dochází například k expresi nejznámějšího a nejlépe prostudovaného transkripčního faktoru HIF1 (hypoxia induced factor 1 α). Po aktivaci se HIF1 translokují do buněčného jádra, kde se váže na tzv. hypoxii-odpovědné úseky a vyvolává transkripci genů spjatých s nádorovou angiogenezí, invazivitou, buněčným přežíváním a glukózovým metabolismem (Goonewardene et al., 2002; Kunz and Ibrahim, 2003; Wang et al., 1995).

Další vlastností typickou pro nádory je alkalické intracelulární pH (pHi) a kyselé extracelulární pH (pHe), zatímco u nenádorových tkání je tomu přesně naopak (Mahoney et al., 2003). Okyselení TME je mimo jiné dáno akumulací kyseliny mléčné, produktu anaerobní glykolýzy (Cukierman and Khan, 2010). Nízké pH a nahromaděná kyselina mléčná tlumí také imunologickou odpověď. Bylo prokázáno, že kyselina mléčná inhibuje proliferaci a cytokinovou produkci cytotoxických T lymfocytů a snižuje jejich cytolytickou funkci. Aby se T lymfocyty zbavily přebytečné kyseliny mléčné, využívají tzv. proteiny transportující monokarboxylové kyseliny (MCTs; monocarboxylate transport proteins) a koncentračního gradientu. Ten je ovšem v nádorovém prostředí blokován a kyselina mléčná nahromaděná uvnitř T lymfocytů tak narušuje jejich metabolismus a inhibuje jejich správnou funkci (Fischer et al., 2007). Kyselé pH v nádorovém prostředí je asociováno s progresí nádoru, které je dáno především zvýšenou produkcí angiogenních faktorů a proteáz, pozměněnou transkripcí genů a vyšší invazivitou nádoru (Gillies et al., 2002).

Neméně důležitým rysem nádorového mikroprostředí je také zvýšený glukózový metabolismus vedoucí až k několikanásobně nižšímu obsahu glukózy v nádorových buňkách. Oproti normálním buňkám, které pro získání energie upřednostňují oxidativní fosforylaci, nádorové buňky i navzdory přítomnosti kyslíku většinou využívají glykolýzu. Tento jev byl poprvé popsán v roce 1924 a je nazýván Warburgův efekt

(Dang, 2012). Warburgova původní zjištění ho vedla k hypotéze, že nádor vzniká na základě poškození mitochondrií, doprovázené zvýšenou glykolýzou, jež má za následek přeměnu diferencujících se buněk na proliferující nádorové buňky (Hamanaka and Chandel, 2012). Nicméně primární poruchy mitochondriálních enzymů či komplexů v elektronovém transportním řetězci nejsou jevy, které by se u nádorů vyskytovaly příliš často (Frezza and Gottlieb, 2009). Současné studie ukazují, že je za Warburgův efekt zodpovědná především aktivace protoonkogenů (např. Myc), signálních drah (PI3K) a transkripčních faktorů, jako je například HIF1, ale také například inaktivace tumor-supresorových genů (např. p53) (Vander Heiden et al., 2009).

3.1.2 Stroma

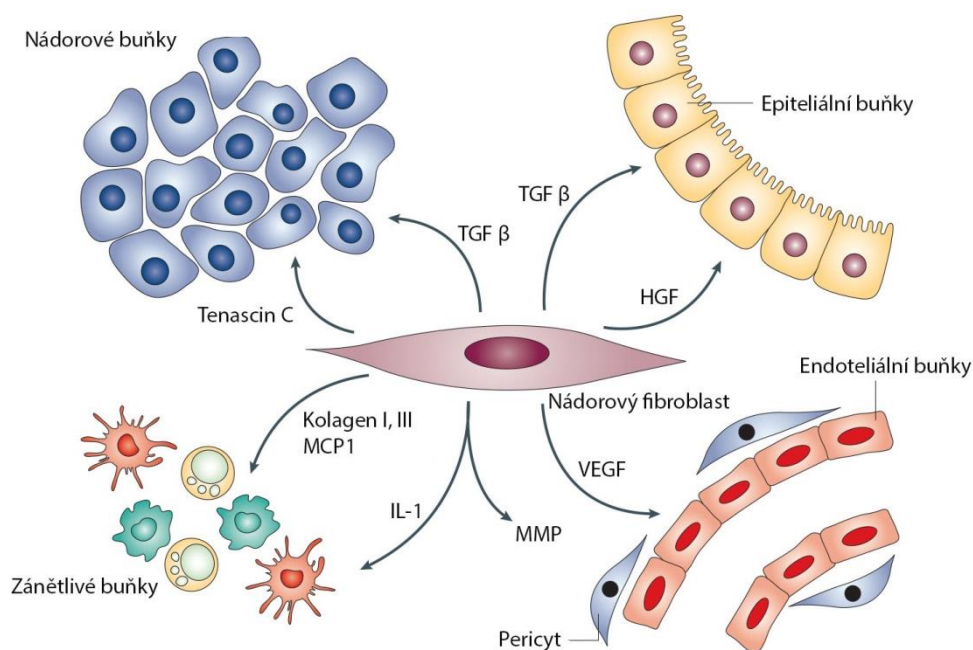
Za vznik a růst nádoru nejsou zodpovědné pouze samotné maligní transformované buňky, ale také nádorové stroma. Stroma je podpůrná pojivová tkáň, která je tvořena extracelulární matrix a různými buněčnými typy, jako jsou fibroblasty, myofibroblasty, vaskulární endoteliální buňky nebo infiltrující buňky imunitního systému. Současné studie dokazují, že stroma hraje zásadní roli jak při vzniku nádoru, tak při jeho progresi.

3.1.2.1 Nádorové fibroblasty

Fibroblasty jsou velké mezenchymální buňky vřetenovitého tvaru, které sdílí charakteristické znaky s buňkami hladkého svalstva (Mueller and Fusenig, 2004). Nádorové fibroblasty tvoří významnou součást stromatu a jsou buňkami zodpovědnými za skladbu extracelulární matrix (ECM; extracellular matrix), neboť produkují mnoho složek podílejících se na její stavbě, jako jsou kolagen typu I, III a V nebo fibronectin (Rodemann and Muller, 1991; Tomasek et al., 2002). Jejich úloha je však také při regulaci zánětu či v procesu hojení (Parsonage et al., 2005; Tomasek et al., 2002) a v neposlední řadě jsou také důležitým zdrojem proteáz degradujících ECM, jako jsou matrix metaloproteinázy (MMPs; matrix metalloproteinases), což potvrzuje jejich významnou roli v udržování homeostázy extracelulární matrix (Chang et al., 2002b). V jednotlivých nádorových tkáních jsou fibroblasty zastoupeny v různých poměrech k ostatním buněčným složkám, ale u mnoha typů nádorů představují významnou a leckdy převažující buněčnou komponentu. Současné znalosti týkající se fibroblastů

asociovaných s nádory (CAFs; cancer-associated fibroblasts) se stále vyvíjejí, nicméně je dnes již jasné, že se podílí jak na vzniku, tak i na progresi nádoru. Nádorové fibroblasty mají tendenci shlukovat se kolem nádoru a obklopotvat nádorové buňky invadující do přilehlých tkání (Kalluri and Zeisberg, 2006). Od běžných fibroblastů se liší jak fenotypicky, tak funkčně a v současné době neexistuje jednoznačná definice, která by CAFs charakterizovala vzhledem k jejich různému buněčnému původu či exprimovaným znakům. Faktory, které vyvolávají přeměnu normálních fibroblastů směrem k CAFs, nejsou zcela známy. Některé studie ukazují, že jsou nádorové fibroblasty do místa nádoru atrahovány v odpovědi na různé faktory produkované nádorovými buňkami, jako je například TGF-beta nebo destičkový růstový faktor (PDGF; platelet-derived growth factor) (Bierie and Moses, 2006; Kalluri and Zeisberg, 2006). Během procesu hojení dochází ke shlukování krevních destiček v místě poškozeného epitelu a sekreci PDGF. Následně do místa poranění migrují fibroblasty, kde procházejí procesem, při kterém se z nich pod vlivem dalších faktorů (např. TGF-beta) stávají aktivované fibroblasty neboli myofibroblasty (Grose and Werner, 2004; Karagiannis et al., 2012; Lawrence, 1996), které jsou typické expresí α -SMA (α -SMA; α -smooth muscle actin). V současnosti však stále není jasné, zda mají fibroblasty asociované s nádory unikátní fenotyp, nebo sdílí charakteristické rysy spolu s fibroblasty aktivovanými během poranění. Ačkoliv benefiční úloha myofibroblastů spočívá v hojení ran, jejich přetrvávající přítomnost během chronických zánětů či u nádorových onemocnění vede ke vzniku fibrózy, respektive dezmozplázie. Jaká je tedy jejich úloha při nádorové progresi? Experimenty s transformovanými nádorovými buňkami injikovanými spolu s CAFs či normálními fibroblasty do nude myši ukázaly, že xenograft s CAFs rostl rychleji oproti tomu, který obsahoval fibroblasty normální. Rychlejší růst byl navíc spjat se zvýšenou schopností nádorových buněk proliferovat. Autoři prokázali, že jedním z faktorů zodpovědných za zvýšenou schopnost proliferace buněk byl stromální faktor SDF1 (SDF1; stromal cell-derived factor 1) produkovaný právě nádorovými fibroblasty (Orimo et al., 2005). Kromě toho aktivované fibroblasty produkují již výše zmíněné matrix metaloproteinázy. Ty mají přímý vliv na degradaci ECM a následnou tkáňovou remodelaci, která usnadňuje vycestování nádorových buněk z místa vzniku primárního nádoru (Lochter et al., 1997) (obr. 2). MMPs jsou však také využívány ke štěpení růstových faktorů, prozánětlivých cytokinů a jejich receptorů nebo adhezivních molekul, čímž vzniká proces, kterému se říká epiteliálně-mezenchymální přeměna (EMT; epithelial-mesenchymal transition).

EMT je biologický proces, který umožňuje polarizovaným epiteliálními buňkám projít četnými biochemickými změnami, které vedou k jejich přeměně na mezenchymální buňky (nebo buňky s mezenchymálním fenotypem), které jsou charakteristické zvýšenou schopností migrace, invazivitou, rezistencí k apoptóze či zvýšenou produkcí ECM komponent. EMT se dělí do tří typů. Typ 1 můžeme pozorovat ve fázi organogeneze, typ 2 při hojení a tkáňové regeneraci a typ 3 je spjat s progresí nádoru a metastazováním (Kalluri and Weinberg, 2009).



Obr. 2: Úloha aktivovaných fibroblastů v nádorovém stromatu

Upraveno dle (Kalluri and Zeisberg, 2006)

3.1.2.2 Extracelulární matrix

Při vzniku a progresi nádorů hrají důležitou roli nejen buňky, ale i nebuněčné komponenty, především extracelulární matrix (Levental et al., 2009; Paszek et al., 2005). Pomocí přímých i nepřímých prostředků reguluje ECM chování buněk a je nezbytnou součástí pro hlavní vývojové procesy (Rebustini et al., 2009). ECM není statickou strukturou, ale neustále prochází procesem remodelace – novotvorbou a degradací – a to zejména během vývoje orgánů a při vykonávání jejich funkcí. Pokud však dojde k narušení regulačních mechanismů, které slouží k zajištění dynamiky ECM, dochází k abnormálnímu chování buněk, což nakonec vede až k selhání orgánové homeostáze (Page-McCaw et al., 2007). Je známo, že abnormality v dynamice ECM

mají významný vliv na klinické aspekty u různých onemocnění včetně onemocnění nádorových (Cox and Erler, 2011). Porozumění procesům, jakým způsobem může narušení dynamiky ECM přispět ke vzniku nádoru, je proto v popředí zájmu mnoha vědeckých skupin po celém světě.

Extracelulární matrix představuje nebuněčnou komponentu přítomnou ve všech tkáních a orgánech poskytující oporu pro buněčné složky. Zahajuje také důležité biochemické a biomechanické podněty, které jsou vyžadovány pro tkáňovou morfogenezi, diferenciaci a homeostázi. Ačkoli je tvořena v zásadě vodou, polysacharidy a proteiny, a to především kolagenem, elastinem, proteoglykany a dalšími specializovanými proteinovými strukturami, ECM každé tkáně má svou vlastní kompozici, která vzniká během vývoje tkáně na základě dynamických interakcí různých buněčných komponent, a tvoří tak buněčné a proteinové mikroprostředí (Frantz et al., 2010). Tyto složky tvoří jak bazální membránu, tak intersticiální matrix. Jedním z prvních kroků při vzniku nádorového mikroprostředí je přestavba ECM. Struktura ECM je remodelována například matrix metaloproteinázami se schopností hydrolyzovat makromolekuly proteinů. Bylo prokázáno, že MMPs jsou ve zvýšené míře exprimovány u pacientů s nádorovým onemocněním. Navíc během procesu degradace metaloproteinázy způsobují uvolnění růstových faktorů, které následně napomáhají proliferaci a invazivitě nádorových buněk (Klein et al., 2004; Kohrmann et al., 2009). Kromě MMPs jsou často u nádorů exprimovány také heparanázy, 6-O-sulfatázy či urokinázy (Ilan et al., 2006; Kessenbrock et al., 2010). I navzdory kontrolním mechanismům může být aktivita enzymů remodelujících ECM pozměněna například stárnutím či vlivem patologických podmínek. ECM se může měnit kvantitativně i kvalitativně, což vede k významným změnám biochemických vlastností ECM, majících za následek zesílení onkogenního účinku signálních drah různých růstových faktorů a změnu chování buněk během maligní transformace.

Biochemické vlastnosti ECM se mění pod vlivem patologických podmínek. Nádorové stroma je například pevnější než stroma normální (Lopez et al., 2011). Tato vlastnost může být částečně přisuzována přemíře lyzyl oxidázové (LOX) aktivity, což způsobuje tzv. „cross-link“ kolagenových vláken a jiných složek ECM. LOX je enzym, jehož primární funkcí je post-translačně modifikovat kolagen a elastin v ECM, a tím katalyzovat kovalentní propojení vláken (cross-linking) (Csiszar, 2001; Kagan and Li, 2003). Studie ukázaly, že zvýšená exprese LOX byla pozorována u různých typů nádorů, například nádoru prsu či hlavy a krku, a je považována

za negativní prognostický marker (Barker et al., 2011; Le et al., 2009). Pokusy na myších modelech navíc prokázaly, že vyšší exprese LOX zvyšuje pevnost ECM a podporuje invazivitu nádorových buněk a progresi nádoru (Levental et al., 2009).

Abnormální tuhost ECM, jakou pozorujeme u fibrózy, hraje důležitou roli v progresi nádoru. Důležitou otázkou však zůstává, zda může být pružnost ECM obnovena a jaký léčebný přínos bude tento návrat do normálního stavu mít. Ukázalo se, že odchylky ECM, jako je například právě její pevnost, ovlivňují také doručování a rezistenci některých léků (Egeblad et al., 2010). Pokusy na myších Loefflera a kol. ukázaly, že lepší odpověď na léky může být docílena například snížením obsahu kolagenu v nádorové tkáni způsobeným zabitím CAFs CD8⁺ T buňkami (Loeffler et al., 2006).

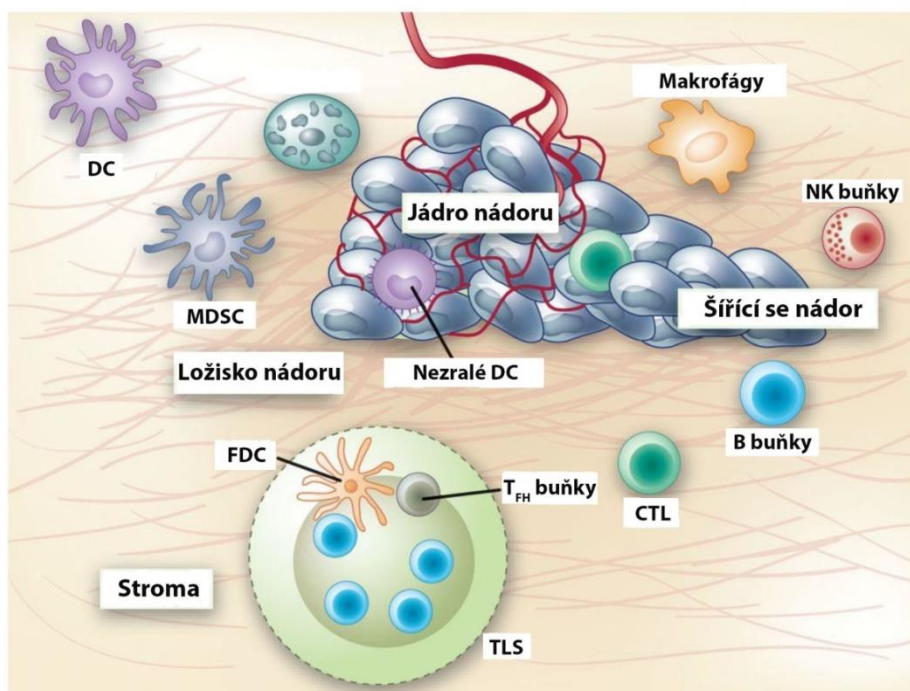
ECM se ukázala být významným faktorem v průběhu karcinogeneze. Na základě její funkční diverzity a dynamické povahy, které jí umožňují být aktivním účastníkem většiny buněčných reakcí a vývojových procesů, je významnou složkou, kterou je potřeba brát v potaz při vývoji nových postupů v léčbě například právě nádorových onemocnění. Důležitým cílem budoucího výzkumu je zjištění, zda může být abnormální ECM vhodným cílem pro terapii. Abychom toho dosáhli, je však třeba nejprve porozumět, jakým způsobem jsou skladba a uspořádání ECM regulovány, respektive jak mohou být u nádorů deregulovány. Velmi důležité v této otázce je zjistit povahu změn, které jsou doopravdy zodpovědné za progresi onemocnění a jaký mohou mít tyto změny, ať už samostatně či jejich kombinací, vliv na nádorové či stromální buňky.

4 ROLE IMUNITNÍHO SYSTÉMU V OBRANĚ PROTI NÁDORŮM

Hlavním úkolem imunitního systému je chránit organismus před škodlivými mikroorganismy, ale také odstraňovat poškozené a abnormální buňky těla vlastní. Jak přirozená, tak adaptivní imunita hraje zásadní roli v obraně proti nádorům, ale ačkoliv má imunitní systém schopnost zahájit protinádorovou odpověď, existují také mechanismy, které tomuto procesu brání.

V mnoha studiích za poslední desetiletí bylo popsáno, že u imunodeficitních myší, které postrádají například interferon (IFN γ), perforin, T lymfocyty či NK buňky, dochází ke spontánnímu vzniku nádoru (Girardi et al., 2001; Smyth et al., 2000; Street et al., 2001). U lidí byla vyšší incidence v rozvoji nádorů zjištěna u jedinců s oslabeným imunitním systémem (například HIV pozitivní pacienti) (Melbye et al., 1994) či u transplantovaných pacientů, jež dlouhodobě podstupují imunosupresivní léčbu (Euvrard et al., 2003; Sanchez et al., 2002). Předpokládá se proto, že imunitní systém hraje v obraně proti rozvoji nádorového onemocnění zásadní roli.

Nádory vznikají a rostou ve složité síti tvořené epiteliálními buňkami, krevními a lymfatickými cévami, cytokiny a chemokiny a infiltrujícími imunitními buňkami. Různé typy infiltrujících imunitních buněk mají různý vliv na progresi nádoru, a ta je rovněž závislá na typu nádoru. Pohled na nádorovou imunologii zásadně změnily práce Schreiber a kol., které vyústily v teorii, že T buňky infiltrující nádory mají zásadní vliv na klinický průběh nádorového onemocnění. Hypotézy, jaký vliv má imunitní odpověď na invazi nádoru, jeho případnou recidivu a metastazování, vycházejí z *in situ* analýz jednotlivých komponent imunitního systému a jejich zastoupení v nádoru. Jednotlivé populace imunitních buněk můžeme nalézt jak v samém středu nádoru, tak na jeho okrajích, či v přilehlých terciálních lymfatických strukturách a identifikace jejich lokalizace, frekvence zastoupení či funkce jsou nezbytné v kontextu určení, zda mají příznivý nebo negativní vliv na pacientovu prognózu (Fridman et al., 2012) (obr. 3).



Obr. 3: Složení imunitních buněk v nádoru

Upraveno dle (Fridman et al., 2012)

FDC, folikulární dendritické buňky; TLS, terciální lymfatická struktura; TFH, folikulární pomocné T buňky; CTL, cytotoxické lymfocyty; MDSC, myeloidní supresorové buňky; DC, dendritické buňky

4.1 Imunitní buňky infiltrující do nádoru a jejich prognostický význam

Vzájemná souvislost mezi přítomností imunitních buněk v nádorové tkáni a klinickým stavem pacienta je v současnosti zkoumána u různých typů nádorových onemocnění. Mezi všemi typy imunitních buněk infiltrujících do nádoru jsou však s pozitivní prognózou pacientů nejvíce spojovány T lymfocyty (TILs; tumor infiltrating lymphocytes). Proto se zastoupení T lymfocytů v nádorovém mikroprostředí, a jejich vliv na protinádorovou imunitu, intenzivně studují po desetiletí. Analýzy nádorového mikroprostředí u pacientů s různými typy solidních tumorů ukázaly, že velká většina nádorů vykazuje fenotyp s přítomností TILs. Již studie z 90. let potvrdily, že nádory, které jsou infiltrovány T lymfocyty, jsou asociovány s pozitivní prognózou u pacientů s melanomem (Clemente et al., 1996). Později byla tato data potvrzena i u dalších typů nádorů, jako jsou například nádory hlavy a krku (Badoual et al., 2006), kolorektální

karcinom (Baier et al., 1998; Naito et al., 1998), nádor ovarií (Sato et al., 2005; Zhang et al., 2003) či karcinom močového měchýře (Sharma et al., 2007). Protinádorový efekt TILs byl také demonstrován klinickými studiemi, ve kterých pomocí infuzí TILs pacientům s nádory účinně kontrolovali růst nádoru (Rosenberg et al., 2008). Vysoké zastoupení CD3+ T buněk, cytotoxických CD8+ T lymfocytů a paměťových CD45+ T buněk bylo ve většině případů asociováno s delším bezpříznakovým přežitím a/nebo celkovým přežitím (Clemente et al., 1996; Ito et al., 2005; Shibuya et al., 2002; Zhang et al., 2003). V porovnání s účinkem cytotoxických a paměťových T buněk se zdá být vztah mezi CD4+ T buněčnou populací a klinickým stavem pacientů o něco rozporuplnější. Jasným příkladem jsou například regulační T lymfocyty (Treg). Jednou z pilotních studií v této oblasti je studie Curiela a kol., ve které demonstrovali korelaci nádorových Treg se špatnou prognózou pacientek s ovariálním karcinomem (Curiel et al., 2004a). Několik dalších studií tento koncept v následujících letech potvrdilo (Fu et al., 2007; Gao et al., 2007). U některých nádorů, jako například u kolorektálního karcinomu, se však ukázalo, že vyšší frekvence Treg je spojována s delším přežíváním pacientů. Hodnocení zastoupení Treg u tohoto typu nádoru se tak ukázalo mít větší prognostický význam, nežli stanovení CD45RO+ či CD8+ lymfocytů (Salama et al., 2009).

Tyto a další analýzy naznačují, že by prognostická hodnota imunofenotypizace mohla být u některých typů nádorů dokonce účinnější, než tradiční rozdělení nádorů do anatomických stadií (tzv. „staging“), neboť většina pacientů ve stádiu I a II, kterým chybí T buněčný infiltrát, během pěti let zrelabuje, zatímco přítomnost T buněk v infiltrátu u pacientů ve stádiu III může předpovídat neobvykle dlouhé celkové bezpříznakové přežití (Mlecnik et al., 2011). Tento způsob, při kterém se využívá imunitní systém jako biomarker, a kterému se říká „imunitní skóre“ („immunescore“), je v současné době ověřován v multicentrické mezinárodní studii (Galon et al., 2014; Galon et al., 2012a; Galon et al., 2012b).

4.1.1 Pomocné T lymfocyty

Tato buněčná populace byla původně definována na základě její pomocné funkce v imunitní odpovědi zprostředkované protilátkami. CD4+ T lymfocyty však vykazují vysoký stupeň plasticity a schopnosti diferencovat se do několika fenotypově i funkčně rozdílných subpopulací v odpovědi na různé podněty. Tyto CD4+ subpopulace zastávají

široké spektrum efektorových funkcí v počátečních i paměťových fázích imunitní odpovědi. Současné studie dokazují, že se CD4⁺ T lymfocyty také aktivně podílejí na formování protinádorové imunity.

Polarizace imunitní odpovědi směrem k zánětlivé nebo protilátkové je dána především povahou invadujících patogenů. Buňky prezentující antigen (APC; antigen-presenting cells), které jsou stimulovány agonisty Toll-like receptorů (TLR, Toll-like receptor) 3, 4 a 8, produkují interleukin-12 (IL-12) a diferencují tak T lymfocyty směrem k Th1 linii (Napolitani et al., 2005). Tyto buňky produkují IFN γ , který zesiluje buněčnou imunitu a má zásadní roli v obraně proti intracelulárním patogenům a bakteriálním infekcím. Vývoj Th2 buněk je naopak závislý na stimulaci proteiny pocházejících z extracelulárních agens (parazitických helmintů, toxinů či alergenů), jsou typické produkcí cytokinů IL-4, IL-5 a IL-13, zesilují imunitu zprostředkovanou protilátkami a účastní se reakcí, při nichž dochází k eliminaci extracelulárních patogenů (Coffman, 1989; Mosmann and Coffman, 1989).

Th1 buňky jsou považovány za jednu z hlavních populací pomocných T lymfocytů, které jsou zahrnuty v protinádorové odpovědi, a to zejména díky produkci IFN γ , který má nespočet funkcí majících vliv na schopnost imunitního systému kontrolovat a eliminovat nádory.

Původně se předpokládalo, že primární funkcí Th1 buněk v protinádorové imunologii je napomáhat aktivaci makrofágů spolu s aktivní pomocí CD8⁺ T lymfocytům při vykonávání jejich cytolytických funkcí. Bylo však prokázáno, že i tyto buňky dokáží zabíjet nádorové buňky skrze přímý buněčný kontakt prostřednictvím FasL- a TRAIL-signalizace, stejně tak jako působením účinku perforinu a granzymu B, které byly nejdříve spojovány pouze s cytotoxickými T buňkami (Schattner et al., 1996; Thomas and Hersey, 1998). Populace těchto CD4⁺ T buněk, která získala cytolytické vlastnosti, vykazuje jasnou protinádorovou aktivitu. Například při přenosu malého počtu nádorově specifických CD4⁺ T buněk do lymfopenického hostitele s jeho následným ozářením a léčbou protilátkou namířenou proti molekule CTLA-4 (CTLA-4; cytotoxic lymphocyte antigen 4) dochází k expanzi buněk a expresi IFN γ a granzymu B a následné regresi nádoru (Quezada et al., 2010).

Ligandy TLR2, Dectin-1 a NOD vyvolávají u APC produkci interleukinu-23 (IL-23) a vznik prozánětlivých Th17 lymfocytů, které jsou známé díky produkci IL-17, IL-21 a IL-22 (Acosta-Rodriguez et al., 2007). Jejich přítomnost bývá pozorována v místech zánětu a často je spjata se vznikem různých typů autoimunitních onemocnění,

jako je psoriáza, revmatoidní artritida nebo diabetes (Korn et al., 2009). Ačkoliv byla přítomnost Th17 lymfocytů a IL-17A objevena u mnoha typů nádorů, dosud není zcela jasné, jakou úlohu v nádorové imunologii tyto buňky mají. Pokusy na myších modelech ukázaly, že IL-17 přispívá k růstu nádoru u imunodeficientních myší skrze chronický zánět, kdežto u imunokompetentních myší napomáhal odhojení nádoru zvyšováním protinádorové imunitní odpovědi (Benchetrit et al., 2002; Tartour et al., 1999; Wilke et al., 2011). U pacientek s karcinomem ovarií bylo dokázáno, že nižší zastoupení Th17 v nádoru a nižší hladiny IL-17 v ascitu souvisí s pokročilým stádiem onemocnění a pozitivně predikuje jejich přežívání (Kryczek et al., 2009). Bylo ale také prokázáno, že exprese IL-17 v nádoru může vést ke zvýšené produkci proangiogenních faktorů a prozánětlivých cytokinů nádorovými buňkami a následně k progresi nádoru (Liu et al., 2011). Skupina Tosoliniho potvrdila, že vyšší zastoupení Th17 buněk koreluje s horším přežíváním pacientů s kolorektálními nádory (Tosolini et al., 2011). Langowski a kol. dále dokázali, že cytokin IL-23 podporuje zánětlivou odpověď například zvýšenou regulací MMP9, zesílením angiogeneze a inhibicí infiltrace CD8+ T lymfocytů. Pokud ale IL-23 geneticky nebo pomocí protilátky vyrušili, došlo k opětovnému nárůstu infiltrace těchto cytotoxických lymfocytů (Langowski et al., 2006). Na druhou stranu, Hu a kol. ukázali, že dendritické buňky transdukované IL-23 působily jako spouštěč účinné protinádorové aktivity (Hu et al., 2006). Nicméně efekt cytokinu IL-23 nelze brát jako seriózní důkaz účasti Th17 buněk v pro- či proti-nádorové odpovědi.

Další možný mechanismus protinádorového účinku Th17 buněk spočívá v jejich napomáhání při migraci dalších imunitních buněk do místa nádoru (Galon et al., 2006; Zhang et al., 2003). V souladu s touto hypotézou je například pozitivní korelace cytokinu IL-17 s nádor-infiltrujícími efektorovými buňkami produkujícími IFN- γ . Synergický efekt IL-17 a IFN- γ indukoval produkci Th1 chemokinů CXCL9 a CXCL10 nádorovými buňkami, což pak vedlo k migraci efektorových T buněk do nádoru (Kryczek et al., 2009). Je známo, že hladiny CXCL9 a CXCL10 korelují s počtem CD8+ T lymfocytů a NK buněk infiltrujících nádor.

Protinádorová aktivita zprostředkovaná Th17 buňkami může být rovněž vyvolána prostřednictvím migrace dendritických buněk do nádoru. Th17 buňky stimulují expresi chemokinů CCL20 v nádorové tkáni a napomáhají tak přicestování DC skrze CCL20-CCR6 interakci. V zápětí jsou aktivovány dendritickými buňkami CD8+ T lymfocyty a dochází k zahájení imunitní odpovědi. Tato data vypovídají o tom, že Th17 buňky sice nemají přímý vliv na eliminaci nádoru, ale hrají nepřímou roli

v protinádorové imunitě prostřednictvím jejich působení na přicestování dalších imunitních buněk do nádorového mikroprostředí (Zou and Restifo, 2010).

V posledních letech byl dosažen velký pokrok v porozumění, jak Th17 buňky vznikají, jak jsou regulovány, či jaká je jejich role v souvislosti s různými patologickými stavy. To se týká především autoimunitních onemocnění, u kterých je úloha Th17 lymfocytů již dobře známa. Nicméně přesná povaha Th17 buněk v protinádorové odpovědi není zcela jasně definována. Jak již bylo popsáno výše, tyto buňky se ukázaly mít v tumorogenezi funkci jak pro-, tak proti-nádorovou a vztah mezi Th17 lymfocyty a nádorovou imunitou je zcela jistě závislý na kontextu a typu nádoru. Proto je potřeba lépe porozumět těmto souvislostem, aby mohly být Th17 buňky případně využity pro vývoj nových imunoterapeutických protokolů.

4.1.2 Cytotoxické CD8+ T lymfocyty

CD8+ T lymfocyty, nebo též cytotoxické lymfocyty (CTLs; cytotoxic lymphocytes), představují jednu z klíčových složek adaptivní imunity, které se uplatňují v boji s nádory a v obraně proti intracelulárním patogenům. CTLs mají schopnost indukovat apoptózu cílových buněk pomocí speciálních cytotoxických granulí či prostřednictvím příslušných receptorů. Zatímco NK buňky dokáží také vyvolat buněčnou smrt, CTLs se od nich liší především svou mimořádnou specificitou pro antigen, který rozpoznávají díky svým unikátním TCR receptorům (TCR; T-cell receptor). CTLs navíc disponují také efektorovými mechanismy, jako je produkce IFN- γ , cytokinu, který je znám pro své protinádorové vlastnosti (Qin et al., 2003).

Vývoj efektorových CTLs je proces, při kterém dochází k antigenem řízené diferenciaci z naivních CD8+ T lymfocytů. Buňky prezentující antigen pohltnou antigen a migrují do místních lymfatických uzlin, kde se v ideálním případě setkají s naivními lymfocyty, které kolují sekundárními lymfatickými tkáněmi. Aby mohly CD8+ T buňky zahájit odpověď na nádor, musí rozpoznat antigeny, které jsou vystaveny na povrchu APC v komplexu s MHC molekulami I. třídy. Interakcí tohoto komplexu peptid-MHC mol I. třídy, a TCR receptoru, který je pro něj specifický, dochází ke klonální expanzi a diferenciaci CD8+ T lymfocytů. V místě imunitní reakce pak využívají CD8+ T lymfocyty své efektorové funkce zahrnující schopnost degranulace a produkci cytokinů. Takto aktivované cytotoxické T buňky vyvolávají v případě setkání svého TCR receptoru s komplexem MHC-antigen na nádorové buňce jejich specifickou

destrukci uvolněním lytických složek. Perforin a enzymatické proteázy (jako je granzym B) způsobují buněčnou smrt rozrušením buněčné membrány a aktivací apoptotických drah.

Některé *in vitro* a *in vivo* studie podpořily hypotézu, že pro optimální navození cytotoxické CD8+ T buněčné odpovědi je vyžadována pomoc od CD4+ T buněk (Bach et al., 1977; Bennett et al., 1997; Bevan, 1989; Guerder and Matzinger, 1989). Ukázalo se, že CD4+ T buňky mohou přímo interagovat s CD8+ T lymfocyty prostřednictvím CD40-CD154 interakce (Bourgeois et al., 2002), což kompromituje dřívější tvrzení, která říkají, že CD4+ i CD8+ T buňky musí být přítomny současně na jedné antigen prezentující buňce pro efektivní poskytnutí IL-2 signálu sousedním CD8+ T buňkám (Cassell and Forman, 1988). Aby byla zahájena účinná odpověď, CD8+ T lymfocyty potřebují dále cytokin IL-2 produkovaný CD4+ T buňkami (Lai et al., 2009).

4.1.2.1 Nádorově/virově-specifické CTLs

Existence nádorově-specifických CTLs byla popsána již v mnoha studiích, ve kterých používali T buněčné linie izolované z různých nádorových tkání, k identifikaci CTL epitopů nádorových antigenů. Od objevení prvního CTL epitopu z nádorového antigenu u melanomu (van der Bruggen et al., 1991) bylo identifikováno velké množství dalších nádorových antigenů odvozených z různých typů nádorů, například nádoru jícnu, střeva, plic či žaludku (Itoh and Yamada, 2006; Shichijo et al., 1998). Mezi nádorové antigeny, které mají vysoký potenciál vyvolat nádorově-specifickou imunitní odpověď, patří: virové antigeny, antigeny, jež jsou výsledkem různých mutací a antigeny kódované CT geny (CT; cancer-testis antigeny; antigeny rakoviny a varlat).

Nádory indukované viry se ukázaly být důležitou podskupinou lidských nádorových onemocnění, mezi něž se řadí karcinomy děložního čípku, orofaryngu, nazofaryngu, či hepatocelulární karcinomy. Perzistující infekce vysoce rizikových typů lidského papillomaviru (HPV; human papillomavirus) byla identifikována jako klíčový faktor v patogenezi nádorů děložního čípku a orofaryngu. Podobně jako neonkogenní viry, jako je virus chřipky nebo cytomegalovirus, je i HPV vysoce imunogenní a dokáže indukovat imunitní odpověď. Nádorové buňky infikované virem HPV mohou na svém povrchu exprimovat antigeny odvozené z E6 a E7 onkoproteinů produkovaných tímto virem, které T lymfocyt rozpozná jako cizí, a tudíž by mělo dojít k zahájení imunitní

odpovědi. Využití virové specificity T lymfocytů se ukázalo být slibným přístupem pro vývoj různých imunoterapeutických protokolů. Postupy založené na bázi izolace specifických lymfocytů z nádorové tkáně, jejich expanzi a aplikaci zpět pacientovi se dostaly do popředí zájmu mnoha laboratoří a obecně se označují jako adoptivní buněčný transfer (ACT; adoptive cell transfer). Například Stevanovic se svou skupinou testoval ACT u pacientek s metastatickým nádorem děložního čípku. U jedné z devíti pacientek zahrnutých ve studii pozorovali částečnou odpověď, u dvou došlo k odpovědi kompletní (Stevanovic et al., 2015). Slibné výsledky tohoto postupu jsou však vykoupeny značnou technickou náročností, neboť je velmi obtížné získat dostatečné množství specifických T lymfocytů pro jejich následné terapeutické použití.

Mutované geny významně přispívají k imunogenicitě nádorů. Výsledkem mutací jsou nové antigenní peptidy, které mohou vzniknout například záměnou i jedné aminokyseliny, a které je odlišují od normálních antigenů. U onkologických pacientů převažují zejména nádorově-specifické antigeny kódované mutovanými a CT geny, které indukují T lymfocytární buněčnou odpověď. Mutované antigeny nejsou běžně využívány pro přípravu terapeutických vakcín, neboť vzhledem k jejich rozmanitosti nelze vakcínu použít pro širší spektrum pacientů. Jedním z možných přístupů by však mohla být extrakce dendritických buněk z krve pacienta, jejich transfekce celkovou mRNA izolovanou z autologního nádoru a jejich následná infuze zpět do těla pacienta (Boczkowski et al., 2000; Van Tendeloo et al., 2001).

CT geny jsou důležitým zdrojem nádorově-specifických antigenů. Patří sem MAGE genová rodina, která se skládá z 25 genů, dalšími rodinami jsou pak G antigeny (GAGE), CTAG a SSX. Celkem bylo popsáno již přes 60 CT genů a jejich exprese byla popsána na širokém spektru různých typů nádorů. Na normálních buňkách exprimovány nejsou, s výjimkou mužských zárodečných buněk a trofoblastu. U lidí, stejně jako u myši, tyto dva typy buněk neexprimují MHC molekuly, a proto nemohou prezentovat antigeny T buňkám (Fiszer and Kurpisz, 1998). Z těchto důvodů jsou CT antigeny často využívány pro imunoterapii, jako je vakcinace či adoptivní buněčný transfer.

4.1.2.2 Dysfunkční fenotyp cytotoxických T lymfocytů

Imunitní systém vyvinul vlastní regulační mechanismy bránící vzniku patologických stavů, které by se mohly rozvinout v důsledku nepřiměřené imunitní reakce. Jedním z těchto mechanismů je exprese tzv. negativních regulátorů či molekul kontrolních bodů, jako jsou cytotoxický lymfocytární antigen CTLA-4 nebo molekula programované smrti PD-1 (PD-1; programmed cell death 1) na aktivovaných T lymfocytech. Tyto molekuly tlumí odpověď T buněk různými mechanismy, například kompeticí s kostimulačními molekulami (CTLA-4) nebo narušením signalizace přes T buněčný receptor (PD-1). U pacientů s nádorovým onemocněním však exprese těchto molekul představuje značný problém, neboť dochází k potlačení imunitní odpovědi v důsledku dysfunkčních neboli vyčerpaných T lymfocytů.

Vyčerpání T buněk bylo původně popsáno u myši s chronickou lymfocytickou choriomeningitidou virovou infekcí (LCMV; Lymphocytic Choriomeningitis Virus) (Zajac et al., 1998). T lymfocyty ztrácejí schopnost proliferovat a vykonávat efektorové funkce, jako je cytotoxicita či sekrece cytokinů v odpovědi na stimulaci antigenem. Jedná se o progresivní proces, při němž dochází nejprve ke ztrátě produkce IL-2, dále TNF α a nakonec IFN γ . V navazujících studiích byl fenotyp vyčerpaných T buněk dále charakterizován expresí inhibiční molekuly programované smrti. Bylo popsáno, že blokáda interakce PD-1 a jejího ligandu PD-L1 (PD-L1; programmed cell death ligand 1) může dojít k obnově původního fenotypu buněk a specifické T buněčné odpovědi u LCMV-infikovaných myši (Barber et al., 2006). Výskyt buněk s tímto vyčerpaným fenotypem se objevuje také u lidí trpících chronickými infekcemi, jako je HIV (Trautmann et al., 2006) či virus hepatitidy C (Urbani et al., 2006). Bylo zjištěno, že T lymfocyty těchto jedinců exprimují vysoké hladiny PD-1 a blokováním PD-1-PD-L1 interakce dochází k obnovení funkcí T buněk *in vitro*.

Současné studie však ukazují, že se problematika dysfunkčních T lymfocytů týká také pacientů s nádorovým onemocněním. PD-1 exprese na T lymfocytech byla pozorována u pacientů s různými typy solidních nádorů (Ahmadzadeh et al., 2009; Gehring et al., 2009), stejně tak jako na T lymfocytech specifických k antigenu u pacientů s hematologickými nádory (Mumprecht et al., 2009). Navíc exprese ligandu PD-1, PD-L1, byla detekována na různých nádorech, přičemž bylo prokázáno, že je vysoká exprese této molekuly na nádorových buňkách spjata u některých typů nádorů se špatnou prognózou pacientů (Brown et al., 2003; Dong et al., 2002). Přestože

se u některých nádorů zjistilo, že narušení PD-1-PD-L1 signalizace může vést ke zlepšení klinického stavu pacientů, ne vždy vede blokace této signalizační dráhy k navrácení do normálního fenotypu T buněk (Blackburn et al., 2008). Navíc se ukázalo, že exprese PD-1 nemusí nutně znamenat fenotyp vyčerpaných lymfocytů (Fourcade et al., 2009; Fourcade et al., 2010; Sauce et al., 2007). U pacientek s nádory ovarií či pacientů s HPV-pozitivními nádory hlavy a krku byla dokonce prokázána korelace exprese PD-1 s pozitivní prognózou (Badoual et al., 2013; Webb et al., 2015). Tato data podporují hypotézu, že za fenotyp vyčerpaných buněk jsou pravděpodobně zodpovědné ještě další molekuly.

Další molekulou, kterou je proto potřeba zmínit v souvislosti s dysfunkcemi T lymfocyty, je Tim-3 (Tim-3; T cell immunoglobulin mucin 3). Tim-3 byl objeven v roce 2002 v souvislosti s experimentální autoimunitní encefalomyelitidou a od ostatních inhibičních molekul se liší tím, že není exprimován na všech T lymfocytech po aktivaci, ale je specificky exprimovaný pouze na T buňkách, které produkují IFN γ , pomocných CD4⁺ a cytotoxických CD8⁺ T lymfocytech (Monney et al., 2002). Interakce Tim-3 a jeho ligandu, galektinu-9, indukuje smrt Tim-3⁺ T buněk, což znamená, že Tim-3 specificky tlumí imunitní odpověď řízenou IFN γ -produkcí buňkami (Zhu et al., 2005). Výzkum posledních let potvrdil expresi Tim-3 také na T lymfocytech pacientů s nádorovým onemocněním (Baitsch et al., 2011; Fourcade et al., 2010). Zajímavé je, že jsou hladiny Tim-3 detekovány téměř výhradně na T buňkách přítomných v nádorové tkáni, oproti lymfocytům v periferních lymfoidních tkáních a cirkulujícím T lymfocytům, což by mohlo být způsobeno různými vlivy působícími v nádorovém mikroprostředí (Sakuishi et al., 2010). Navíc v mnoha případech dochází na lymfocytech ke ko-expresi PD-1 a Tim-3, která značí fenotyp nejvíce vyčerpaných CD8⁺ T buněk, v porovnání s buňkami, které exprimují pouze PD-1 a stále si zachovávají některé funkce (Fourcade et al., 2010; Sakuishi et al., 2010).

4.1.3 Buňky prezentující antigen

Funkci spojky mezi adaptivní a přirozenou imunitou vykonávají buňky prezentující antigen. Jejich hlavní úlohou je pomocí MHC II. třídy prezentovat na svém povrchu peptidy, které pocházejí z pohlcených částic. Tyto komplexy MHC-peptid poté

rozpoznávají T lymfocyty a také díky dalším signálům (kostimulační a cytokinové signály) dostávají impuls k proliferaci a diferenciaci.

Mezi typické APC patří makrofágy, které jsou specifické svojí enzymatickou výbavou, pomocí níž usmrcují pohlcené patogeny a v místě reakce aktivují lymfocyty specifické pro antigen. Dalšími APC jsou B lymfocyty a některé další typy buněk, na jejichž povrchu jsou po aktivaci exprimovány MHC II. třídy. Jedinečné postavení mezi APC však mají dendritické buňky, neboť jako jediné dokáží aktivovat naivní T lymfocyty a tím zahájit primární specifickou imunitní odpověď.

4.1.3.1 Dendritické buňky

Populace dendritických buněk byla objevena v roce 1973 Ralphem Steinmanem a Zanvilem Cohnem a dostala jméno na základě charakteristické morfologie s množstvím výběžků, dendritů (Steinman and Cohn, 1973). Tato populace je však velmi heterogenní a základním rysem, který všechny tyto typy DC spojuje, je jejich schopnost migrovat a efektivně zahájit primární odpověď T lymfocytů (Inaba et al., 1990).

DC jsou lokalizovány v periferních tkáních, tedy v místech, kde dochází k nejčastějšímu průniku patogenů. Specifické receptory jim umožňují rozpoznat antigeny pocházející z virů, bakterií a dalších patogenů a DC tak zahajují proces zrání, maturace. Zralé DC exprimují množství kostimulačních molekul CD80, CD86, MHC molekul a adhezivních molekul, které jim umožňují vytvořit pevné spojení mezi T buňkou a DC (imunologická synapse). Maturované dendritické buňky cestují do sekundárních lymfatických orgánů, kde dochází ke kontaktu s naivními T buňkami specifickými pro antigen.

Maturace DC reguluje navíc produkci mnoha cytokinů, od zánětlivých ($\text{TNF}\alpha$, IL-1, IL-6), až po imunoregulační (IL-12, $\text{IFN}\alpha$, IL-6, IL-10), které působí na T buňky a ovlivňují výsledný typ T buněčné odpovědi. Pravděpodobně nejdůležitější je schopnost zralých DC produkovat heterodimer IL-12, IL-12 p70, který směřuje vývoj nediferencovaných Th0 CD4+ T buněk do Th1 typu. Produkci IL-12 p70 však mohou indukovat pouze některé ligandy toll-like receptorů a signály T buněk (CD40L). Schopnost vyvolat sekreci IL-12 p70, ale i dalších cytokinů, a tím ovlivnit výsledný fenotyp T buněk, je tudíž závislá na konkrétním TLR ligandu.

Další důležitou vlastností DC v kontrole infekcí je jejich schopnost prezentovat exogenní antigeny, které buňka pohltila, na MHC I molekulách. Tento proces se označuje jako „zkřížená prezentace“ (z ang. cross-presentation) (Albert et al., 1998). Zkřížená prezentace je klíčová při aktivaci CD8⁺ cytotoxických T lymfocytů, uplatňujících se zejména v obraně proti virovým a intracelulárním patogenům či při eliminaci nádorových buněk.

V současné době jsou u člověka obecně definovány dvě hlavní fenotypově i funkčně se lišící populace: plazmacytoidní (pDC) a myeloidní (mDC) dendritické buňky.

Lidské pDC jsou morfologicky podobné plazmatickým buňkám (odtud také jejich název plazmacytoidní DC) (Lennert and Remmele, 1958) a jsou známy mimo jiné tím, že produkují velká množství IFN α (Trinchieri et al., 1978). pDC neexprimují myeloidní marker CD11c a naopak exprimují receptor pro cytokin IL-3, molekulu CD123. Specifickými znaky periferních pDC jsou molekuly BDCA-2 a BDCA-4 (Dzionek et al., 2002). V souvislosti s nádorovým onemocněním je této populaci DC připisována spíše negativní úloha, neboť u některých typů nádorů je přítomnost pDC v nádorovém prostředí spojována s horší prognózou pacientů (Conrad et al., 2012; Treilleux et al., 2004). Na souboru pacientů s nádory hlavy a krku bylo prokázáno, že nádor jako takový indukuje sníženou expresi toll-like receptoru 9, čímž pravděpodobně dochází k narušení funkce pDC a jejich schopnosti produkovat IFN α (Hartmann et al., 2003). Studie provedená u pacientek s nádorem vaječníku zase ukázala, že pDC napomáhají angiogenezi *in vivo* srze produkcí TNF α a IL-8 (Curiel et al., 2004b).

Myeloidní DC jsou odvozené z myeloidních prekurzorů v periferní krvi exprimující MHC II. třídy. Od pDC se liší expresí myeloidního markeru CD11c a absencí znaku CD123. Do této populace se řadí také dendritické buňky, které jsou v *in vitro* podmínkách derivovány z monocytů.

4.1.3.1.1 Myeloidní dendritické buňky infiltrující do nádoru

Jak již bylo zmíněno, DC hrají v imunitním dohledu nepostradatelnou roli. Bylo dokázáno, že infiltrace primárních nádorů dendritickými buňkami je spjata s výrazně delším přežitím a sníženým výskytem metastáz u pacientů s nádory hlavy a krku, močového měchýře, jícnu či žaludku (Lotze, 1997). U většiny solidních nádorů je vyšší zastoupení infiltrujících DC (TIDC; tumor-infiltrating dendritic cell) detekováno

u dobře diferencovaných a méně invazivních nádorů, což poukazuje na to, že míra zastoupení T1DC negativně koreluje se stádiem onemocnění a pozitivně koreluje s lepší prognózou pacientů.

Další studie s dendritickými buňkami potvrdily, že potenciální prognostický význam by mohl mít také jejich maturační stav. Ladanyi a kol. analyzovali pomocí imunohistochemie denzitu DC exprimujících CD1a a maturační znak DC-LAMP u melanomu. Ukázali, že CD1a+ DC byly přítomny jak v nádoru, tak okolním stroma, zatímco zastoupení DC-LAMP+ zralých DC bylo omezeno pouze na prostředí nádoru a navíc ještě spjato s infiltrátem lymfocytů. Míra infiltrace CD1a+ DC a DC-LAMP+ DC ukázala inverzní korelaci s velikostí nádoru a vysoké zastoupení zralých DC v peritumorální oblasti korelovalo s delším přežitím (Kocian et al., 2011; Ladanyi et al., 2007). Tato data dokazují, že je třeba zvážit tyto parametry jako jeden z možných znaků, který má vliv na funkční imunitní odpověď související s lepším přežíváním pacientů.

4.1.4 Populace supresorových buněk

4.1.4.1 Regulační T lymfocyty

Regulační T lymfocyty jsou klíčovými mediátory suprese v protinádorové imunitě a zvýšený výskyt Treg byl popsán u většiny typů nádorových onemocnění (Ormandy et al., 2005; Sasada et al., 2003; Woo et al., 2001). Jedna z prvních prací poukazující na fakt, že jsou Treg schopné potlačit protinádorovou imunitu, pochází již z počátku 80. let 20. století. Na myších pokusech s fibrosarkomem Bursuker a kol. zjistili, že prvotní imunitní odpověď vyvinutá v odpovědi na rostoucí nádor byla potlačena populací Ly-1+2- „supresorových“ T buněk (Bursuker and North, 1984). v roce 1999 Itoh a kol. popsali regulační T lymfocyty pomocí znaků CD4 a CD25 a doložili, že se jedná o populaci T buněk odvozených z thymu, která brání rozvoji autoimunitních onemocnění (Itoh et al., 1999). Hlavní úlohou regulačních T lymfocytů je tedy potlačení vzniku autoimunitních chorob udržováním tolerance vůči tělu vlastním tkáním prostřednictvím inhibice autoreaktivních T lymfocytů, které unikly centrální toleranci v thymu. Jejich přítomnost u pacientů s nádorovým onemocněním je však u většiny typů nádorů považována za nežádoucí, neboť brání nádorově-specifickým T lymfocytům zahájit účinnou odpověď na nádor. Jak již bylo zmíněno, u lidí jsou Treg

obecně definovány na základě exprese molekul CD4 a CD25 a dále transkripčního faktoru FoxP3. Nicméně, FoxP3 byl detekován také u *in vitro* aktivovaných efektorových T buněk (Gavin et al., 2006), a tak tvrzení, že je tento transkripční faktor specifický pouze pro regulační T lymfocyty, je poněkud kontroverzní.

Regulační T lymfocyty dokáží inhibovat CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocyty jak v počáteční, tak v efektorové fázi imunitní odpovědi. Treg produkují IL-10 a TGF- β , které potlačují odpověď efektorových T buněk a oba tyto cytokiny se ukázaly být mediátory infekční tolerance (Gravano and Vignali, 2012). V souvislosti s nádory jsou nejpřesvědčivější *in vitro* studie na lidských T lymfocytech. Například FoxP3⁺ buňky izolované ze vzorků pacientů s nádory hlavy a krku produkují IL-10 i TGF- β , jejichž prostřednictvím dochází k potlačení odpovědi efektorových T lymfocytů (Bergmann et al., 2008). Collison a kol. dále dokázali, že Treg produkují navíc cytokin IL-35, který je zodpovědný za sníženou schopnost efektorových T lymfocytů proliferovat (Collison et al., 2007). Velmi důležitou molekulou bránící rozvoji imunitní odpovědi na nádor je CTLA-4 exprimovaná regulačními T buňkami. Přímou interakcí Treg s APCs skrze molekulu B7, vyskytující se na povrchu DC, dochází k produkci enzymu IDO (IDO; Indoleamine 2, 3-dioxygenase), který degraduje esenciální aminokyselinu tryptofan. Buňky produkující IDO jsou známy svou schopností potlačit T-buněčnou odpověď a navodit toleranci (Liu et al., 2009). Dalšími mechanismy, díky nimž mají Treg schopnost potlačit protinádorovou odpověď, jsou mimo jiné produkce adenosinu a prostaglandinu E2 (Mandapathil et al., 2010) či granzymu (Gondek et al., 2005).

Vzhledem k tomu, že pacienti s nádorovým onemocněním nejsou většinou plošně imunosuprimováni, obecně se věří, že regulační T lymfocyty rozvíjí nejúčinnější potlačení imunitní odpovědi přímo v místě nádoru. Proto musí být pravděpodobně do nádoru aktivně přitahovány, aby mohly vykonávat optimálně svou inhibiční funkci. Za migraci imunitních buněk do nádoru jsou nejčastěji zodpovědné chemokiny produkované různými buněčnými typy. Ve vzorcích karcinomu ovaria byly zjištěny hladiny chemokinu CCL22, jež byly produkovány primárními nádorovými buňkami a makrofágy, a které byly zodpovědné za migraci Treg do místa nádoru prostřednictvím receptoru CCR4 exprimovaném na regulačních T lymfocytech (Curiel et al., 2004a; Fialova et al., 2013) Migrace Treg prostřednictvím interakce CCL22-CCR4 byla pozorována také u pacientek s karcinomem prsu (Faget et al., 2011). Dalším faktorem podílejícím se na infiltraci nádoru regulačními T lymfocyty je růstový faktor pro endoteliální buňky cév VEGF (VEGF; vascular endothelial growth factor),

produkovaný nádorovými buňkami, neboť Treg exprimují jeho receptory VEGFR2 (VEGFR2; vascular endothelial growth factor receptor 2) a Nrp-1 (Neuropilin-1) (Bruder et al., 2004; Terme et al., 2013). Interakce VEGF-Nrp-1 vyvolala akumulaci Treg v nádoru například u melanomového modelu (Hansen et al., 2012) Současné studie však dokazují, že VEGF a Nrp-1 nemají vliv pouze na migraci Treg, ale také na jejich funkci. Role VEGF byla popsána v souvislosti se spuštěním jejich proliferační aktivity (Terme et al., 2013) a Nrp-1 dokáže zprostředkovat delší interakci s nezralými dendritickými buňkami (iDC; immature dendritic cells), vedoucí k vyšší citlivosti k omezenému množství antigenu, což jim dává výhodu oproti naivním CD4+CD25-T buňkám, které Nrp-1 neexprimují (Sarris et al., 2008).

Jednou z prvních studií popisující negativní vliv Treg na prognózu pacienta je práce Curiela a kol. z roku 2004, která byla provedena na souboru 70 pacientek s karcinomem ovarií (Curiel et al., 2004a). Poté následovalo několik studií s podobnými výsledky, jež ukazovaly, že přítomnost Treg je spojována se špatnou prognózou pacientů (Hiraoka et al., 2006; Kono et al., 2006; Shimizu et al., 2010).

Navzdory těmto výsledkům, zastoupení Treg může v některých případech fungovat také jako pozitivní prognostický faktor, což bylo popsáno například u hematologických malignit, jako je folikulární a Hodgkinův lymfom (Carreras et al., 2006; Tzankov et al., 2008), ale i u solidních tumorů, jako jsou nádory hlavy a krku či kolorektální karcinom (Badoual et al., 2006; Salama et al., 2009). V současnosti máme dostatek informací, abychom mohli říci, že regulační T lymfocyty brání rozvoji účinné protinádorové odpovědi u většiny typů nádorů. K dnešnímu dni existuje již několik klinických studií testujících látky, které dokáží tyto supresorové buňky eliminovat nebo alespoň potlačit jejich inhibiční funkci.

4.1.4.2 Myeloidní supresorové buňky

Myeloidní supresorové buňky (MDSC; myeloid-derived suppressor cells) jsou velmi heterogenní populací sestávající z nezralých makrofágů, granulocytů, DC a dalších myeloidních buněk v časných fázích diferenciaci. U zdravých jedinců se nezralé myeloidní buňky tvoří v kostní dřeni a jsou záhy diferencovány do zralých myeloidních buněk, aniž by působily imunosupresivně. Avšak v důsledku různých patologických stavů, jako jsou například nádorová onemocnění, infekce či některá autoimunitní onemocnění, je jejich vývoj částečně potlačen, což vede k expanzi této

supresorové populace. Aktivací MDSC dochází ke zvýšení exprese imunosupresivních faktorů, jako jsou argináza (ARG1) a indukovatelná syntáza oxidu dusnatého (iNOS, inducible nitric oxide synthase), zvýšená aktivita NADPH oxidázového komplexu a produkce oxidu dusnatého, reaktivních forem kyslíku a cytokinů (například TGF- β) (Gabrilovich and Nagaraj, 2009).

MDSC byly popsány u experimentálních myší a u většiny pacientů s nádorovým onemocněním. Současná data ukazují, že lidské MDSC sdílí mnohé z funkčních vlastností MDSC popsaných u myší. Přestože jsou myší MDSC dnes již dobře definovány, u lidských MDSC stále chybí panel specifických znaků, který by je odlišil od dalších buněk. To může být způsobeno jejich vysokou plasticitou a heterogenitou, která je pro ně typická. Fenotypové rozdíly lidských MDSC se mohou navíc odrážet i v rozdílnosti jednotlivých pacientů. Vliv může mít například typ nádoru, stádium, věk pacienta nebo pouze genetické rozdíly, které jsou u lidí větší než u laboratorních myší.

MDSC postrádají na svém povrchu expresi znaků specifických pro monocyty, makrofágy nebo DC a jsou tvořeny mixem myeloidních buněk s granulocytickou a monocytickou morfologií (Youn et al., 2008). Zatímco u myší je typická exprese znaků Gr1 a CD11, u lidí jsou MDSC nejčastěji definovány jako CD14-CD11b⁺ buňky, konkrétněji jako buňky exprimující klasický myeloidní marker CD33 a zároveň neexprimují MHC molekulu II. třídy HLA-DR, která je přítomna na zralých myeloidních a lymfoidních buňkách (Almand et al., 2001).

MDSC se dělí na dvě subpopulace, granulocytární (g-MDSC) a monocytické MDSC (m-MDSC). Granulocytární MDSC jsou obecně označovány jako CD11b⁺CD15⁺, s chybějící expresí monocytického znaku CD14 a kostimulačních molekul CD11a, CD80, CD86 a CD83 a molekuly HLA-DR. Monocytické MDSC jsou definovány jako CD14⁺, CD11b⁺, s nízkou nebo žádnou expresí CD15 a HLA-DR.

Expanze MDSC je úzce spjata s jejich aktivací. Některé studie ukazují, že jsou VEGF a GM-CSF, často spojované se záněty, (faktor stimuluje růst granulocytů a makrofágů) asociovány s akumulací MDSC, což poukazuje na možnou souvislost mezi zánětlivým prostředím a expanzí MDSC. Dalšími faktory schopnými vyvolat indukci MDSC jsou cyklooxygenáza-2 (COX2), prostaglandiny (PGE₂), faktor stimuluje růst makrofágů (M-CSF), IL-1 β nebo IL-6 (Gabrilovich and Nagaraj, 2009).

Zdá se, že supresorová aktivita MDSC není závislá pouze na faktorech, které vyvolávají jejich proliferaci, ale také na těch, které napomáhají jejich aktivaci. Většinou

jsou tyto faktory produkovány nádorovými buňkami nebo aktivovanými T lymfocyty, jako jsou IFN γ , IL-4, IL-13 a TGF β (Gabrilovich and Nagaraj, 2009).

Jejich supresorová aktivita je dána schopností potlačit efektorové funkce T buněk. Historicky je připisována účinku metabolismu L-argininu, který slouží jako substrát pro dva enzymy, iNOS a arginázu. MDSC produkují větší množství jak arginázy, tak iNOS a již dříve byl popsán účinek těchto enzymů na inhibici T lymfocytů. Neméně důležitým faktorem jsou ROS. Vyšší produkce ROS MDSC byla popsána jako jeden z hlavních znaků u pacientů s různými typy nádorů a ukázalo se, že pokud byla produkce ROS narušena, došlo k úplné ztrátě inhibičního účinku MDSC *in vitro* (Kusmartsev et al., 2004). Recentnější studie však ukázaly, že klíčovým mediátorem suprese je peroxynitrit (ONOO $^-$). Peroxynitrit je produkt vzniklý chemickou reakcí oxidu dusnatého s anionem superoxidu a je jedním z hlavních oxidantů v lidském těle, jehož zvýšené množství je navíc spojováno s progresí nádoru (Ekmekcioglu et al., 2000; Nakamura et al., 2006). Mimoto MDSC dokáží snížit expresi L-selektinu, který je nezbytný pro vycestování naivních T lymfocytů do lymfatických uzlin. Tím dochází ke snížené aktivaci T lymfocytů, které nemohou migrovat do lymfatických uzlin, setkat se s nádorovými antigeny a zahájit tak efektivní imunitní odpověď (Hanson et al., 2009). Na závěr je třeba zmínit schopnost MDSC ovlivňovat funkci T lymfocytů prostřednictvím indukce regulačních T buněk, čímž dochází k potlačení imunitní odpovědi (Serafini et al., 2004).

U onkologických pacientů má imunosupresivní prostředí zásadní vliv na progresi nádoru, což může způsobovat značná úskalí v nádorové imunoterapii. Proto by se v rámci imunoterapie mělo pomýšlet i na postupy, kterými se potlačí supresivní faktory, jakými jsou například právě myeloidní supresorové buňky či regulační T lymfocyty.

4.2 Chemokiny a jejich úloha v nádorovém mikroprostředí

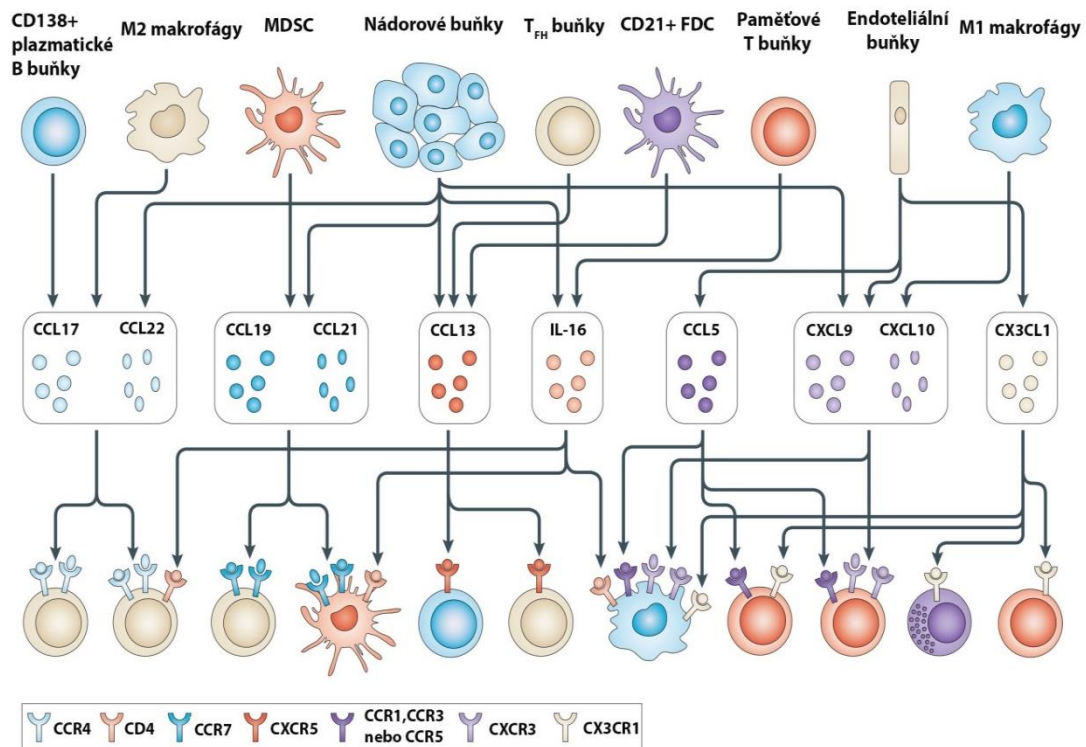
Porozumění mechanismům, které by mohly přispívat k příznivému vývoji imunitní reakce, je zásadní pro vývoj nových inovativních terapií. K tomu je mimo jiné nezbytné určit, které faktory jsou spojovány s nádorovými buňkami nebo jak se imunitní odpověď vyvíjí během progresu nádoru či jeho léčby.

Chemokiny a jejich receptory patří do superrodiny malých sekretovaných molekul, které byly původně popsány pro jejich schopnost indukovat migraci leukocytů (obr. 4). Dobře popsán je například účinek interakce receptoru CCR7 a jeho ligandů

CCL19 a CCL21, kterou vyžadují T lymfocyty pro vstup do lymfatických uzlin (Nakano and Gunn, 2001). Podobně je pro vstup B buněk do lymfatických uzlin nezbytný chemokin CXCL13 a jeho receptor CXCR5 (Muller et al., 2003). Chemokiny podporující atrahování Th1 buněk se v kontextu protinádorové odpovědi považují spíše za prospěšné. První z chemokinů popsany v souvislosti s vyvoláním protinádorové imunity skrze přilákání efektorových T buněk byl chemokin CCL5 (RANTES). Existují však údaje, ve kterých jsou vysoké hladiny RANTES u pacientek s nádory prsu a děložního čípku spojovány s pokročilým stádiem onemocnění (Luboshits et al., 1999; Niwa et al., 2001). Dalšími chemokiny spojovanými s infiltrací paměťových a efektorových T buněk, a to zejména Th1 lymfocytů, do nádorové tkáně jsou chemokiny CXCL9 a CXCL10. Tyto chemokiny jsou navíc asociovány s delším celkovým bezpříznakovým přežitím pacientů s kolorektálními nádory (Mlecnik et al., 2010). Chemokin, který má pravděpodobně vliv na vývoj prostředí, které přispívá k rozvoji imunitní odpovědi v pozitivním slova smyslu, je chemokin CCL21, který má schopnost atrahovat jak DC, tak naivní T lymfocyty (Ansel and Cyster, 2001) a může být také chemoatraktantem paměťových buněk (Sallusto et al., 1999).

Otázkou zůstává, zda může tento fenomén fungovat také u nádorových buněk. Skupina Mullera a kol. analyzovala expresi všech chemokinových receptorů na prsních nádorových buňkách, na nichž zjistili významnou expresi receptorů CXCR4 a CCR7. Dokázali, že nádorové buňky odpovídají na ligand receptoru CXCR4, CXCL12, a že protilátkou namířenou proti CXCR4 mohou blokovat metastazování nádorové linie MDA-MB-231, která běžně metastazuje do plic a lymfatických uzlin u zvířecích modelů (Muller et al., 2001). Velmi zajímavá retrospektivní studie ukázala významnou korelaci receptoru CCR7 se schopností nádorových buněk šířit se do lymfatických uzlin pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic (Takanami, 2003). Stejně tak Wang a kol. prokázali korelaci exprese receptoru CCR7 s přítomností metastáz u pacientů s nádory hlavy a krku (Wang et al., 2005).

Různé retrospektivní studie dokládají, že je exprese některých chemokinových receptorů (zejména CXCR4) spojována s horší prognózou. Proto by se měření exprese těchto receptorů ve vzorcích získaných z nádorové tkáně mohlo stát potencionálním biomarkerem agresivity různých typů nádorů. Tato informace by pak mohla přispět k výběru vhodného léčebného přístupu určitých pacientů s nádorovým onemocněním.

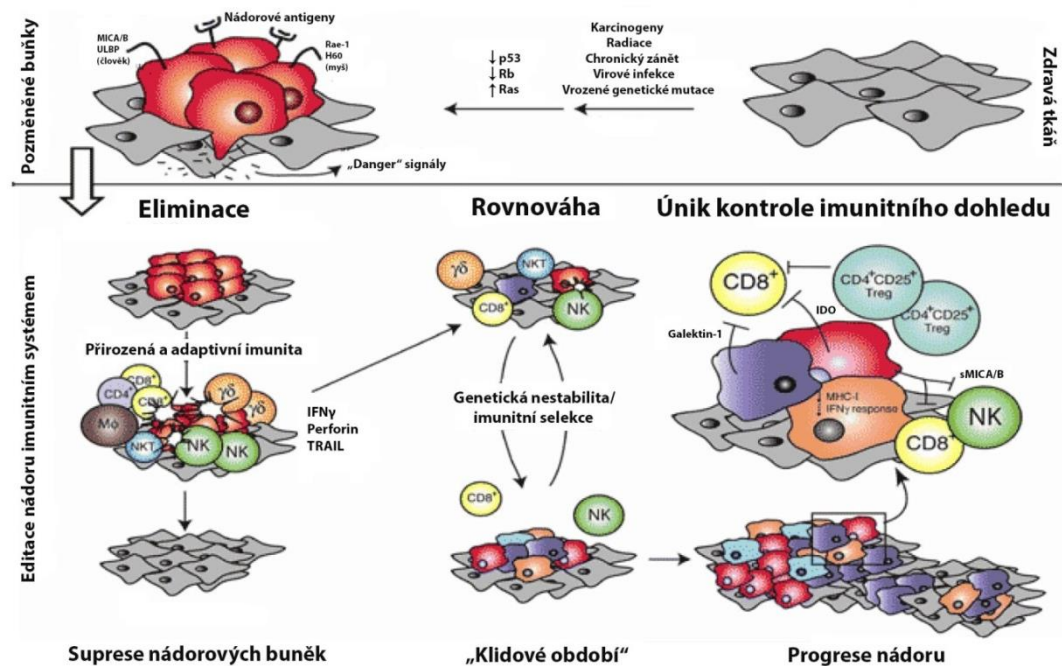


Obr. 4: Buněčné populace a chemokiny, které ovlivňují nádorové mikroprostředí

Upraveno dle (Fridman et al., 2012)

5 DYNAMICKÝ VZTAH NÁDORU A IMUNITNÍHO SYSTÉMU, IMUNOGENICITA NÁDORŮ

Funkcí imunitního systému je na jedné straně účinně bránit organismus proti cizím a nebezpečným patogenům, na druhé straně ale musí být schopen rozpoznat a tolerovat vlastní tkáň. Základním předpokladem pro rozpoznání nádorových buněk je exprese nádorově specifických, respektive s nádory asociovaných antigenů. Tyto antigeny nádorové buňky v menší či větší míře exprimují a stávají se tak potenciálním cílem pro imunitní systém. Nicméně se ukázalo, že některé nádory, které nevytvořily dostatek antigenně cizích proteinů, imunitní systém nerozpoznává jako cizí nebezpečí. Navíc se zjistilo, že imunitní systém ovlivňuje jak počet nádorových buněk, tak i jejich imunogenicitu. Nádory rostoucí v imunodeficitních zvířatech byly totiž více imunogenní v porovnání s nádory rostoucími v imunokompetentních zvířatech (Dunn et al., 2005). Tato hypotéza se nazývá „cancer immune editing“, nebo-li editace nádoru imunitním systémem. Popisuje boj imunitního systému s nádory, jenž prochází třemi fázemi – fází eliminace, rovnováhy a úniku (obr. 5). Nádory jsou nejčastěji diagnostikovány již ve fázi úniku, a tak dochází k tomu, že jsou nádorové buňky schopné vyhnout se kontrole imunitního systému.



Obr. 5: Hypotéza imunitního dohledu

Upraveno dle (Smyth et al., 2006)

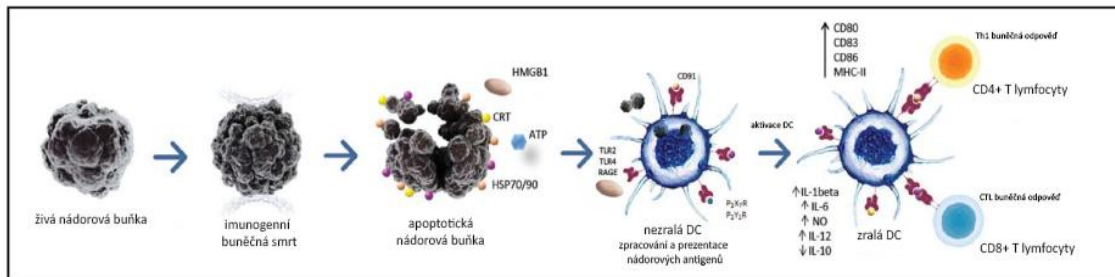
Imunitní systém se rutinně setkává s umírajícími buňkami během běžného obměňování buněk, při poranění či infekci. Musí proto existovat mechanismus, na základě kterého se rozliší různé formy buněčné smrti, aby mohlo dojít ke správné eliminaci patogenů a naopak, aby nedošlo k reakci vůči vlastním složkám, což by mohlo mít za následek rozvoj autoimunit. Klíčovým bodem je proto porozumět, jak imunitní systém určuje, zda je buněčná smrt imunogenní (ICD; immune cell death), tedy kdy je schopna vyvolat specifickou imunitní odpověď, a kdy je tolerogenní, při níž je výsledkem tolerance vůči zabitě buňce, či zda se jedná o tzv. tichou smrt.

Tato otázka byla řešena pomocí dvou přístupů: zkoumáním signálů, které jsou produkovány umírajícími buňkami a zkoumáním následků, které různé formy buněčné smrti způsobují. První z přístupů je založen na teorii, kdy rozpoznání molekul označovaných jako PAMPs (PAMPs; pathogen-associated molecular patterns) imunitními buňkami určuje rozdíl mezi tichou a imunogenní buněčnou smrtí (indukovanou patogenem). Následně byl však předložen koncept molekul označovaných zkratkou DAMPs (DAMPs; damage-associated molecular patterns) jako vysvětlení potenciální imunogenicity stresovaných či umírajících buněk. DAMPs se uvolňují z hynoucích buněk a indukují imunitní odpověď vůči antigenům, ať už je buňka nádorová, infikovaná patogenem či se jedná o autologní tkáň. Je tedy zřejmé, že aby se jednalo o imunogenní buněčnou smrt, musí pro stimulaci imunitních buněk dojít k uvolnění těchto molekul (Green et al., 2009b).

Pokud se nádorová buňka dostane do stresu, DAMPs se exprimují na jejím povrchu, případně dojde k uvolnění do mezibuněčného prostoru v místě nádoru. Tam poté aktivují různé složky imunity a obvykle dochází k zahájení protinádorové imunitní reakce (Garg et al., 2010).

Imunogenní buněčná smrt probíhá v několika fázích. Nejdříve v prvních hodinách dochází k translokaci chaperonového proteinu kalretikulinu (CRT; calreticulin) (Panaretakis et al., 2009) a proteinů tepelného šoku 70 a 90 (HSP; heat shock proteins) z endoplasmatického retikula na buněčný povrch (Spisek et al., 2007). V další fázi dojde k sekreci adenosintrifosfátu (ATP; adenosintrifosfát) a na závěr k uvolnění nukleárního proteinu HMGB1 (HMGB1; high mobility group box 1) do mezibuněčného prostoru (Apetoh et al., 2007). Tyto molekuly dokáží aktivovat buňky imunitního systému, a to především dendritické buňky, které jsou pak schopné zahájit účinnou imunitní odpověď (Krysko and Vandenabeele, 2008). Důležitost těchto molekul byla prokázána v mnoha studiích (Fucikova et al., 2011; Fucikova et al., 2014; Krysko et al.,

2012) a v současné době vědci po celém světě testují nové terapeutické přístupy založené na bázi zvyšování imunogenicity nádorových buněk, které by mohly být slibným krokem v léčbě nádorových onemocnění.



Obr. 6: Indukce protinádorové odpovědi imunogenní nádorovou buňkou

Upraveno dle (Adkins et al., 2014)

6 MOŽNOSTI IMUNOTERAPIE NÁDORŮ

6.1 Imunoterapie založené na protilátkách

V současné době je rutinně k dispozici řada protinádorových monoklonálních protilátek, jejichž mechanismy působení zahrnují známé fyziologické funkce protilátek, jako jsou opsonizace, aktivace komplementu, indukce apoptózy a nebo mechanismus známý pod pojmem ADCC (ADCC; antibody dependent cellular toxicity), při kterém dochází prostřednictvím Fc receptorů k aktivaci fagocytů a NK buněk. Pro využití v klinické praxi je však nezbytné, aby byly původně myší monoklonální protilátky co nejvíce strukturně podobné protilátkám lidským, tedy aby byly tzv. „humanizovány“, čímž se minimalizuje imunogenita těchto preparátů. Úspěšně se klinicky používají například trastuzumab při léčbě karcinomu prsu či rituximab pro léčbu lymfomů.

Ve fázi výzkumu nebo klinických studií je však celá řada dalších (Redman et al., 2015; Weiner et al., 2010).

Kromě samotných monoklonálních protilátek se testují preparáty i v konjugované formě, tedy v kombinaci s účinnými toxiny, radioizotopy nebo vysoce toxickými léky (ADC; antibody drug conjugates). V případě ADC dochází nejprve k internalizaci daného léku, jeho následnému uvolnění a posléze k lýze nádorové buňky. Podstata těchto preparátů spočívá v tom, že daná protilátka zanesou toxické látky specificky do místa nádoru, čímž by se mělo zabránit nespecifickému poškození zdravých tkání.

Velké naděje se v posledních letech vkládají do vývoje monoklonálních protilátek namířených proti inhibičním receptorům na T lymfocytech, především CTLA-4 a PD-1 (tzv. checkpoint inhibitory). Použitím checkpoint inhibitorů dochází k „odblokování“ T lymfocytů, které tím získají zpět schopnost reakce proti nádorovým buňkám. V současné době je v pokročilých fázích klinických studií například ipilimumab (anti-CTLA-4) nebo nivolumab (anti-PD-1). Léčba checkpoint inhibitory je testována u většiny solidních nádorů, ale i u hematologických malignit. Bylo prokázáno, že významně zlepšuje přežití u maligního melanomu, nemalobuněčného karcinomu plic a karcinomu ledvin. Odpověď na tuto léčbu se významně zvyšuje s použitím kombinace anti-CTLA-4 a anti-PD-1, kdy se eviduje odpověď až u 50 % pacientů (Callahan et al., 2014). Mimo tyto preparáty probíhá klinické testování také protilátek proti PD-L1 nebo

dalšímu inhibičnímu receptoru LAG-3, či preklinické studie zaměřené na řadu dalších povrchových receptorů T lymfocytů (například Tim-3).

Další možností pro využití protilátek v klinické praxi jsou uměle konstruované bispecifické monoklonální protilátky. Jedno jejich vazebné místo reaguje s nádorovým antigenem, zatímco druhé se váže na některou molekulu na povrchu T či NK buněk, čímž dochází k uměle navozenému kontaktu mezi nádorovou buňkou a nespecifickým T lymfocytem a k aktivaci jeho cytotoxických mechanismů, které vedou k usmrcení nádorové buňky. Prvním přípravkem schváleným FDA (Food and Drug Administration) je blinatumomab, protilátka namířená proti CD19/CD3, určená pro léčbu refraktorní B buněčné akutní lymfoidní leukémie (Wu et al., 2015).

6.2 Imunoterapie založené na buňkami zprostředkovaných mechanismech

Jedním z možných mechanismů, jak pomocí buněk aktivovat protinádorovou imunitu, je adoptivní T buněčný transfer. V principu jde o namnožení a aktivaci T lymfocytů *ex vivo*, které jsou získávány z periferní krve či přímo z nádorové tkáně pacienta, a jejich vrácení zpět pomocí nitrožilní infuze (Rosenberg and Restifo, 2015). Jde buď o tzv. LAK buňky (LAK; lymphokine-activated killer cells) nebo TILs. V prvním případě se *in vitro* namnoží velké množství lymfoidních buněk, které se nastimulují pomocí interleukinu 2 a takto stimulované buňky se vrátí zpět do pacientova oběhu. U některých pacientů je růst nádoru alespoň částečně potlačen (Rosenberg et al., 1985). V případě TILs se buňky získají izolací T lymfocytů z nádoru. Tyto lymfocyty by měly být již nádorově specifické. Ty jsou však pravděpodobně utlumené samotným nádorovým mikroprostředím, a tak by mohla stimulace cytokiny tento problém částečně vyřešit.

Další metodou založenou na podobném principu, ale zřejmě mnohem účinnější, je podávání geneticky *in vitro* modifikovaných buněk, tzv. CAR buněk (CAR; chimeric antigen receptor). Do nich je *in vitro*, například za pomoci retroviru, vložen konstrukt, který obsahuje extracelulární část (většinou v podobě protilátky) a intracelulární signalizační doménu, která zajistí aktivaci efektorových funkcí T lymfocytu. Po jejich *in vitro* namnožení se získá libovolný počet cytotoxických lymfocytů, které rozpoznávají daný nádorový antigen. Výsledkem je tedy populace buněk, které se po specifickém rozpoznání nádorové buňky aktivují a zabijí ji. Nadějně výsledky

klinických studií založených na tomto principu byly dosaženy například pomocí chimérických receptorů proti povrchovému antigenu CD19 u pacientů s hematologickými malignitami (Chen et al., 2015).

Již nějakou dobu se ve snaze indukovat imunitní odpověď proti specifickým nádorovým antigenům testují také různé druhy nádorových vakcín. Jako jedna z možností se jeví využití dendritických buněk. Ty se jako účinné buňky prezentující antigen kultivují s nádorovými antigeny, které mohou být například ve formě lyzátu nádorové tkáně nebo apoptotických nádorových buněk. Takto připravené buňky se injikují pacientovi, v němž pak stimulují autologní T lymfocyty k protinádorové odpovědi. Jedinou pro praxi prozatím schválenou vakcínou tohoto typu je Sipuleucel-T, indikovaný pro léčbu metastatického karcinomu prostaty (Anassi and Ndefo, 2011). Další obdobou jsou peptidové vakcíny, při nichž lze pomocí synteticky připravených peptidů *in vitro* nebo *in vivo* stimulovat protinádorové T lymfocyty a tím aktivovat imunitní odpověď proti nádoru. Jejich nevýhodou je však HLA-restrikce, což v praxi znamená, že může být použita pouze u pacientů s vhodnou alelickou formou HLA molekul.

V neposlední řadě je potřeba zmínit přístup, který je založen na využití virů selektivně napadajících nádorové buňky, tzv. onkolytických virů. Jsou to viry modifikované pomocí genového inženýrství, které se replikují v nádorových buňkách a lyzují je. V buňkách zdravých tkání se tyto viry nemnoží. Selektivity viru pro nádorové buňky lze docílit odstraněním či zablokováním genů nezbytných k replikaci viru v normálních buňkách. Byly však popsány i viry, které mají specifický onkolytický účinek bez genové modifikace. Infekce těmito přirozenými viry jsou většinou asymptomatické nebo působí onemocnění s velmi mírným průběhem. Příkladem je reovirus obsahující dvouvláknovou RNA, který normálně infikuje trávicí a dýchací trakt, většinou bez příznaků onemocnění. Může však infikovat a ničit nádorové buňky s mutovaným nebo aktivovaným genem z rodiny Ras (Smith and Chiocca, 2000).

V posledních 20 letech byl zaznamenán nesmírný pokrok v imunoterapii nádorů, který byl umožněn tím, že byly pochopeny některé z komplexních vztahů mezi nádorem a imunitním systémem. Tím začalo testování nových modalit umožňujících ovlivnění protinádorové odpovědi a zdá se, že některé imunoterapeutické postupy mohou již brzy přinést alespoň u některých onemocnění značné benefity a doplnit tak léčbu standardními metodami jako je radioterapie nebo chemoterapie.

7 CÍLE PRÁCE

Předcházející teoretická část této dizertační práce shrnuje současné poznatky v oblasti nádorové biologie z hlediska komplexního pohledu na nádorové mikroprostředí, se zaměřením na imunitní systém a jeho úlohu v obraně proti nádorům. Problematika, která je řešena v této dizertační práci byla shrnuta do čtyř tématických celků:

- **Zhodnocení dynamiky imunitní odpovědi u pacientek s karcinomem ovaria**
Hypotéza: U pacientek s ovariálním karcinomem dochází během progresu onemocnění k dynamickému posunu od aktivní protizánětlivé odpovědi směrem k imunosupresivní odpovědi.
- **Porovnání infiltrátu imunitních buněk u HPV-indukovaných a HPV-neindukovaných nádorů hlavy a krku**
Hypotéza: U pacientů s nádory hlavy a krku, které jsou indukovány HPV virem, je odlišný imunitní infiltrát oproti HPV-negativním pacientům, který významně ovlivňuje jejich prognózu.
- **Využití vysokého hydrostatického tlaku pro navození imunogenní buněčné smrti u lidských nádorových buněk**
Hypotéza: Využití vysokého hydrostatického tlaku je novou modalitou, kterou lze navodit imunogenní buněčnou smrt u nádorových buněk, a tím vyvolat efektivní protinádorovou imunitní odpověď.
- **Porovnání exprese antigenů na primárních nádorových buňkách karcinomu ovaria a nádorových liniích pro případné využití v imunoterapeutických protokolech**
Hypotéza: Pro vývoj imunoterapeutických protokolů založených na bázi dendritických buněk je možné nahradit primární nádorové buňky komerčně dostupnými ovariálními nádorovými liniemi.

8 SEZNAM POUŽITÝCH METOD

Níže je uveden seznam metod, které byly použity pro přípravu publikací uvedených v této dizertační práci.

Buňky

- Příprava dendritických buněk + pulzace ošetřenými nádorovými buňkami.

Buněčné kultury

- Práce s nádorovými liniemi.

Cytokiny/chemokiny

- MILLIPLEX cytokinový/chemokinový kit (Luminex);
- Quantibody Array Kit.

HPV typizace

Kvantitativní PCR v reálném čase

Mikroskopie

- Imunofluorescence;

Nativní tkáň a periferní krev

- Mechanické a enzymatické zpracování nádorové tkáně;
- Zpracování periferní krve – Ficoll Paque.

Průtoková cytometrie

- Imunofenotypizace, detekce cytokinů;
- Detekce imunogenních molekul;
- Detekce apoptózy.

Western blot

- SDS-PAGE.

9 VÝSLEDKY A DISKUSE

Výsledky této práce byly shrnuty do čtyř publikací. V následující kapitole jsou tyto publikace uvedené ve formě, ve které byly otištěny v zahraničním tisku. Komentář předcházející každé publikaci shrnuje a diskutuje zásadní výsledky práce a hodnotí jejich význam.

9.1 Příloha 1: Dynamika T buněk infiltrujících do nádoru během progresu onemocnění pacientek s ovariálním karcinomem

Nádor ovarii patří mezi jedno z nejčastějších nádorových onemocnění u žen, vyznačující se špatnou prognózou a vysokou mortalitou. Špatná prognóza je dána především absencí závažnějších symptomů v raných stádiích onemocnění, a tak je téměř 70 % pacientek diagnostikováno v pokročilém stádiu onemocnění. Přestože konvenční léčba vede ve většině případů k výrazné redukci nádorové hmoty, u většiny pacientek dochází během 2-5 let k relapsu onemocnění, který je způsoben zbytkovými nádorovými buňkami rezistentními k chemoterapii. Výzkumy posledních let ukazují, že přítomnost buněk imunitního systému v nádorové tkáni má významný vliv na prognózu onemocnění. Přesto existuje velmi málo údajů o dynamice protinádorové imunitní reakce přímo v nádorové tkáni během progresu onemocnění.

V práci jsme studovali charakteristiku infiltrátu buněk imunitního systému v nádorové tkáni pacientek s karcinomem ovaria v různých stádiích onemocnění a zároveň jsme sledovali zastoupení těchto buněk v periferní krvi pacientek. Abychom zjistili, zda T lymfocyty infiltrující do nádoru vznikají *in situ*, nebo jsou do místa nádoru atrahovány z periferie, měřili jsme koncentraci různých chemokinů v supernatantech z buněk nádorové tkáně.

Z našich výsledků vyplývá, že časná stadia onemocnění jsou charakterizována zvýšeným počtem Th17 lymfocytů, zatímco ve stádiu II jsme pozorovali narůstající počet Th1 buněk. V pokročilých stádiích onemocnění (stadia III-IV) jsme detekovali výrazné zastoupení funkčních Helios+ regulačních T lymfocytů, spolu se zvýšeným výskytem makrofágů a myeloidních DC. Z analýzy cytokinového a chemokinového profilu jsme zjistili pozitivní korelaci počtu Treg s produkcí chemokinů CCL22, který je znám jako chemokin atrahující regulační T lymfocyty. Abychom podpořili naši hypotézu, že jsou Tregs aktivně rekrutovány do místa nádoru, měřili jsme expresi

CCR4, receptoru pro chemokin CCL22. Detekovali jsme významně nižší expresi CCR4 u Tregs izolovaných z nádorové tkáně, v porovnání s cirkulujícími regulačními T lymfocyty. Dále jsme zjistili, že produkce CCL22 nádorovými buňkami byla výrazně zvýšena po stimulaci IFN γ .

Z výsledků vyplývá, že v průběhu progresu karcinomu ovaria dochází k postupnému snížení prozánětlivé Th17 a Th1 imunitní odpovědi a dochází ke specifické migraci regulačních T lymfocytů do nádorové tkáně. Migrace je zprostředkována chemokinem CCL22, který je v zánětlivém prostředí produkován nádorovými buňkami. Tento proces vede v pokročilých stádiích karcinomu ovaria k silné imunosupresi v nádorovém mikroprostředí.

9.2 Příloha 2: Rozdílný vzorec imunitních buněk infiltrujících do nádoru u pacientů s HPV-asociovanými a HPV-negativními nádory hlavy a krku

Infekce lidským papillomavirem se v posledních několika letech považuje za jeden z nejvýznamnějších rizikových faktorů způsobujících nádory hlavy a krku (HNSCC; head and neck squamous cell carcinoma), zejména pro karcinom orofaryngu. Dnes je známo více než 100 kmenů HPV, ale za primární příčinu vzniku HNSCC je zodpovědný převážně vysoce rizikový kmen HPV 16. Pacienti s HPV-pozitivními nádory, přestože mají častěji metastatické postižení místních lymfatických uzlin, a tedy pokročilejší stádia, odpovídají lépe na chirurgickou léčbu, chemoterapii i radioterapii. Dosavadní data se shodují na tom, že HPV-pozitivní a HPV-negativní nádory jsou dvě různé entity a dosud není zcela jasné, jaké faktory jsou zodpovědné za lepší prognózu HPV-pozitivních nádorů. Za jeden z hlavních faktorů se dnes považuje charakter imunitní reakce. Nejedná se však o rozdíly v chování HPV-pozitivních a HPV-negativních nádorových buněk, ale klinická odpověď je pravděpodobně vyvolána aktivací imunitního systému proti HPV-specifickým antigenům. Současné znalosti nádorové imunologie ukazují, že ačkoliv se protinádorové odpovědi účastní různé populace imunitních buněk, největší význam se dnes přikládá populacím efektorových T lymfocytů.

V této práci jsme si kladli za cíl charakterizovat infiltrát imunitních buněk, jako jsou APC, naivní T lymfocyty, regulační a efektorové T buňky, ale také hladiny cytokinů a chemokinů v nádorové tkáni, a to s ohledem na HPV status. Naše výsledky potvrdily významný rozdíl v povaze imunitní odpovědi HPV-pozitivních v porovnání s HPV-negativními nádory. HPV-pozitivní vzorky vykazovaly signifikantně vyšší zastoupení imunitních buněk, a to zejména CD8⁺ T lymfocytů, které byly schopné produkovat IFN γ a IL-17, dále myeloidních DC a vyšší hladiny prozánětlivých cytokinů a chemokinů.

HPV-pozitivní nádory vznikají na podkladě chronické virové infekce, která se z doposud nejasných příčin vymkla kontrole imunitního systému. Jedním z možných vysvětlení může být dlouhodobá expozice virovým antigenům, která vede k aktivaci inhibičních a regulačních mechanismů a ke změně funkčního stavu

imunokompetentních buněk. Vyčerpané či funkčně zablokované lymfocyty nedokáží eliminovat virem infikované buňky a může docházet k replikaci viru. Ukázalo se, že tyto dvě skupiny nádorů se liší také v expresi regulačních genů, které jsou spjaty s fenotypem vyčerpaných buněk, PD-1 a Tim-3. U HPV-pozitivních nádorů jsme detekovali signifikantně vyšší expresi PD-1, a pokud jsme ji vztáhli k expresi CD45, neboť PD-1 i Tim-3 jsou molekuly exprimované převážně imunitními buňkami, exprimovaly HPV-pozitivní nádory výrazně méně Tim-3. Tyto výsledky odpovídají datům některých dalších skupin, ve kterých autoři potvrdili asociaci PD-1+ HNSCC nádorů s lepší prognózou onemocnění.

Naše výsledky přispívají k hypotézám poukazujícím na fakt, že vysoké zastoupení infiltrujících imunitních buněk může být klíčovým faktorem, který má zásadní vliv na významně lepší prognózu HPV-pozitivních pacientů. Imunitní profilování HNSCC nádorů s ohledem na jejich HPV status by tak mohlo být významným prognostickým nástrojem využitelným pro vývoj nových inovativních přístupů v oblasti imunoterapie.

9.3 Příloha 3: Využití vysokého hydrostatického tlaku k navození imunogenní buněčné smrti u lidských nádorových buněk

Ze současných studií vyplývá, že buněčnou smrt nádorových buněk lze z imunologického hlediska rozdělit na imunogenní a neimunogenní. Typ buněčné smrti neurčuje, zda jde o imunogenní smrt, rozhodující je vliv podnětu, který buněčnou smrt navodí. ICD je charakterizována expresí molekul tepelného šoku, HSP70 a HSP90, a kalretikulinu. Dále dochází k aktivní sekreci ATP a pasivnímu uvolnění HMGB1 do extracelulárního prostoru. Pokud se buňka dostane do stresu, dochází k expresi těchto molekul na buněčném povrchu, respektive k jejich uvolňování do mezibuněčného prostoru, což je podnět pro aktivaci různých složek imunity a většinou tak dochází k zahájení protinádorové imunitní odpovědi.

V naší práci jsme se zaměřili na testování nové modality pro navození ICD u lidských nádorových buněk, vysokého hydrostatického tlaku (HHP; high hydrostatic pressure). HHP indukoval velmi rychle translokaci HSP70, HSP90 i kalretikulinu na buněčný povrch a zároveň uvolnění ATP a HMGB1. Dále jsme dokázali, že pulzování DC nádorovými buňkami ošetřenými HHP vedlo k rychlejší fagocytóze, maturaci a sekreci cytokinů dendritickými buňkami. Navíc DC pulzované takto ošetřenými nádorovými buňkami dokázaly indukovat nádorově-specifické T lymfocyty a naopak velmi nízké hladiny regulačních T lymfocytů. Důležité bylo zjištění, že pomocí HHP byly indukovány také klíčové faktory apoptotické dráhy aktivované stresem, jako je produkce volných kyslíkových radikálů, fosforylace translačního iniciačního faktoru eIF2 α a aktivace kaspázy 8.

V této práci jsme na spektru lidských nádorových linií i primárních nádorových buňkách otestovali *in vitro* pokusech vysoký hydrostatický tlak, jako potenciální techniku pro navození ICD. HHP-indukovaná buněčná smrt splňuje všechna kritéria ICD, podobně jako například některá chemoterapeutika. Ošetření buněk pomocí HHP je standardizovatelné a snadno převeditelné do GMP podmínek (GMP; good manufacturing practice – správná výrobní praxe). V našich laboratořích se dnes HHP využívá pro přípravu imunogenních nádorových buněk a je začleněn do výrobního protokolu imunoterapeutické vakcíny založené na bázi DC v klinických studiích fáze II a III pro karcinom prostaty, ovaríí a plic.

9.4 Příloha 4: Expresse antigenů na primárních nádorových buňkách karcinomu ovaria v porovnání s lidskými ovariálními nádorovými liniemi

Chirurgická léčba a chemoterapie představují základní léčebný postup pro pacientky s ovariálním karcinomem. I přesto, že více než 80 % pacientek odpovídá na léčbu příznivě, kvůli přítomnosti malého počtu buněk rezistentních k chemoterapii (tzv. minimální reziduální nemoc), většina pacientek prodělá během 2-5 let relaps onemocnění. Z tohoto důvodu by aktivace protinádorové imunitní odpovědi mohla představovat doplňující léčebnou modalitu, která by mohla vést ke stabilizaci nebo zpomalení nádorového růstu právě ve stádiu minimální reziduální nemoci.

V naší práci jsme se zaměřili na detekci 21 vybraných nádorových antigenů na primárních ovariálních nádorových buňkách izolovaných z nádorové tkáně a tuto expresi porovnali s antigenním profilem čtyř vybraných ovariálních nádorových linií (OV-90, SKOV-3, OVCAR-3, CAO-3), s cílem identifikovat vhodnou linii, popřípadě jejich kombinaci, pro využití v imunoterapeutických protokolech založených na bázi dendritických buněk. Zároveň jsme sledovali hladiny protilátek v séru proti těmto nádorovým antigenům.

Zjistili jsme velkou variabilitu v expresi antigenů jak u primárních buněk, tak u nádorových linií. Více než 90 % vzorků z nádorové tkáně však exprimovalo CA125, FBP, EPCAM a MUC-1 a zvýšené hladiny Her-2/neu, podobně jako nádorová linie OVCAR-3. Kombinace OV-90 a OVCAR-3 ukázala nejvyšší překryv exprimovaných antigenů s expresí antigenů testovaných pacientek.

Variabilita v expresi nádorových antigenů ukazuje na nutnost využití přístupu pulzace DC celými nádorovými buňkami, což umožní indukci protinádorové imunitní odpovědi proti širokému spektru antigenů, a tím zvýší potenciál případné imunoterapie pro pacienty s různými typy nádorových onemocnění.

10 SOUHRN

Vznik a progresse nádoru se velmi liší v závislosti na typu nádoru, jeho lokalizaci, invazivitě, imunogenicitě a z velké části také na schopnosti aktivace imunitního systému. Dochází k četným interakcím mezi nádorovými buňkami a buňkami imunitního systému, ať již lokálně v místě vzniku primárního nádoru, nebo cestou působení různých mediátorů a cytokinů. V této dizertační práci je diskutováno, jakým způsobem dokáže imunitní systém kontrolovat a regulovat růst nádorových buněk a jaký vliv má nedostatečná imunitní odpověď na prognózu pacienta.

Hlavním předmětem této práce bylo studium klíčových složek a aspektů imunitní odpovědi u pacientů s nádorovým onemocněním.

Analyzovali jsme zastoupení buněk imunitního systému v jednotlivých stádiích onemocnění pacientek s karcinomem ovaria. V této práci jsme si kladli za cíl sledovat dynamiku imunitní odpovědi, a to převážně v kontextu zastoupení jednotlivých populací T lymfocytů v periferní krvi a T lymfocytů infiltrujících do nádoru v časných a pokročilých stádiích onemocnění. Zjistili jsme, že v průběhu progresse karcinomu ovaria dochází k postupnému snížení prozánětlivé Th17 a Th1 imunitní odpovědi a dochází ke specifické migraci regulačních T lymfocytů do nádorové tkáně, jejímž důsledkem je silná imunosuprese v nádorovém mikroprostředí. Tato data upozorňují na fakt, že pro případnou imunoterapii je třeba zvažovat nejen přístupy založené na aktivaci imunitního systému, ale také nutnost potlačit imunosupresivní prostředí.

Prokázali jsme, že povaha imunitní odpovědi u pacientů s HPV-asociovanými nádory hlavy a krku se výrazně liší od pacientů, jejichž nádory nejsou indukovány virovou infekcí. U HPV-pozitivních pacientů jsme zjistili významně vyšší zastoupení buněk imunitního systému v nádorové tkáni, a to převážně CD8+ T lymfocytů. Tyto buňky vykazují vyšší potenciál k aktivaci, což jsme prokázali produkcí cytokinů IFN γ a IL-17. U HPV-pozitivních pacientů jsme navíc detekovali nižší mRNA expresi genu Cox-2 a vyšší expresi genu PD-1. Výsledky této práce přispívají k hypotézám, že HPV-pozitivní a HPV-negativní nádory jsou dvě zcela rozdílné entity a je třeba detailněji objasnit, které faktory přispívají k lepší prognóze HPV-pozitivních pacientů.

Studovali jsme možnost využití vysokého hydrostatického tlaku pro navození imunogenní buněčné smrti u lidských nádorových buněk. Dokázali jsme, že pulzování DC nádorovými buňkami ošetřenými HHP vedlo k rychlejší fagocytóze, maturaci a sekreci cytokinů dendritickými buňkami. Navíc DC pulzované takto ošetřenými

nádorovými buňkami dokázaly indukovat nádorově-specifické T lymfocyty a naopak velmi nízké hladiny regulačních T lymfocytů. Tato práce se stala stavebním pilířem, na jehož podkladě vznikla možnost využití vysokého hydrostatického tlaku pro standardizovanou přípravu imunogenních buněk s jejich následným uplatněním ve výrobním protokolu imunoterapeutické vakcíny založené na bázi DC.

Zjistili jsme velkou variabilitu v expresi antigenů jak u primárních buněk karcinomu ovaria, tak u buněčných linií odvozených od ovariálních nádorů. Většina vzorků získaných z nádorové tkáně exprimovala CA125, FBP, EPCAM a MUC-1 a zvýšené hladiny Her-2/neu, podobně jako nádorová linie OVCAR-3. Ukázali jsme, že kombinace linií OV-90 a OVCAR-3 vykazuje nejvyšší překryv exprimovaných antigenů s antigeny naměřenými u pacientek a mohla by tak být využita pro vývoj imunoterapeutických protokolů.

11 SUMMARY

Cancer development and progression vary depending on tumor type, localization, invasion, immunogenicity and the ability of immune system to become activated. There are frequent interactions between tumor cells and immune cells, occurring locally at the site of primary tumor or distally through paracrine signalling of various mediators and cytokines. This PhD thesis examines how the immune system is able to control and regulate tumor cell growth and how the insufficient immune response can effect patient's prognosis.

The main subject of this PhD thesis is to study key factors and aspects of immune response in cancer patients.

In the first part, we analyzed immune cells infiltrating tumor tissues of ovarian cancer patients at different stages of disease. We focused on the dynamics of immune response, primarily on frequency of individual T lymphocyte populations in peripheral blood and tumor infiltrating T lymphocytes in tumors of early and advanced stages of ovarian cancer. We found that during disease progression there is a gradual decrease of proinflammatory Th17 and Th1 immune responses and a specific recruitment of regulatory T cells to the tumor site, which results in a significant immune suppression in the tumor microenvironment. These data support the idea that immunotherapeutic approaches based on the immune system activation should be accompanied with inhibition of immunosuppressive milieu.

In the second part, we demonstrated that the character of immune response in HPV-positive head and neck cancer patients is very different from the patients with tumors not associated with HPV infection. In HPV-positive patients, significantly higher frequency of immune cells, predominantly CD8⁺ T cells, is observed in the tumor tissue. These cells seem to have a higher potential for activation as confirmed by IFN γ and IL-17 production. Furthermore, patients with HPV-positive tumors had significantly lower expression of Cox-2 mRNA and higher expression of PD1 mRNA compared to HPV-negative tumors. These data suggest hypothesis that HPV-positive and HPV-negative tumors are two completely different entities with a need to clarify factors involved in better prognosis of HPV-positive patients.

Additionally, we studied the possibility of using high hydrostatic pressure to induce immunogenic cell death in human tumor cells. We confirmed that loading of dendritic cells with HHP-treated tumor cells leads to more rapid rate of phagocytosis,

maturation and cytokine secretion by dendritic cells. Moreover, dendritic cells pulsed with HHP-treated tumor cells induced tumor-specific T lymphocytes, but very low levels of regulatory T cells. This work has become the basis for the use of HHP in standardized preparation of immunogenic tumor cells and their subsequent application in the manufacturing protocol of immunotherapeutic DC-based vaccine.

Lastly, we observed high variability in expression levels of tumor-associated antigens in both primary ovarian tumor cells and established ovarian tumor cell lines. Most of the primary tumor samples expressed very high levels of CA125, FBP, EPCAM and MUC-1 and elevated levels of Her-2/neu, which is similar to expression in OVCAR-3 cell line. The combination of OV-90 and OVCAR-3 cell lines shows the highest overlap of expressed antigens with tumor antigens expressed in patients samples. This data suggests that these cell lines might be a valuable source of tumor antigens for development of immunotherapeutic protocols.

12 ZÁVĚR

Přesto, že současná úroveň vědeckého poznání v oblasti imuno-onkologie ještě nedokáže na mnohé otázky dávat dostačující odpovědi, imunitní systém by se do budoucna mohl stát ideální protinádorovou zbraní, protože je velmi rozmanitý. Je to dynamický systém, pro jehož fungování je zásadní, aby se dokázal adaptovat a reagovat na změny prostředí, jedině tehdy může být protinádorová odpověď účinná. Posledních několik let se ukazuje, že imuno-onkologické přístupy se intenzivně rozvíjí. Spolu s přibývajícimi znalostmi o tom, jak je imunitní systém regulován, se objevují další a další možnosti, jak potenciál imunitního systému při protinádorové terapii využít.

13 SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- Acosta-Rodriguez, E.V., L. Rivino, J. Geginat, D. Jarrossay, M. Gattorno, A. Lanzavecchia, F. Sallusto, and G. Napolitani. 2007. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nature immunology* 8:639-646.
- Adkins, I., J. Fucikova, A.D. Garg, P. Agostinis, and R. Spisek. 2014. Physical modalities inducing immunogenic tumor cell death for cancer immunotherapy. *Oncoimmunology* 3:e968434.
- Ahmadzadeh, M., L.A. Johnson, B. Heemskerk, J.R. Wunderlich, M.E. Dudley, D.E. White, and S.A. Rosenberg. 2009. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood* 114:1537-1544.
- Albert, M.L., S.F. Pearce, L.M. Francisco, B. Sauter, P. Roy, R.L. Silverstein, and N. Bhardwaj. 1998. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 188:1359-1368.
- Almand, B., J.I. Clark, E. Nikitina, J. van Beynen, N.R. English, S.C. Knight, D.P. Carbone, and D.I. Gabrilovich. 2001. Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *Journal of immunology* 166:678-689.
- Anassi, E., and U.A. Ndefo. 2011. Sipuleucel-T (provenge) injection: the first immunotherapy agent (vaccine) for hormone-refractory prostate cancer. *P & T : a peer-reviewed journal for formulary management* 36:197-202.
- Annibaldi, A., and C. Widmann. 2010. Glucose metabolism in cancer cells. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 13:466-470.
- Ansel, K.M., and J.G. Cyster. 2001. Chemokines in lymphopoiesis and lymphoid organ development. *Current opinion in immunology* 13:172-179.
- Apetoh, L., F. Ghiringhelli, A. Tesniere, A. Criollo, C. Ortiz, R. Lidereau, C. Mariette, N. Chaput, J.P. Mira, S. Delaloge, F. Andre, T. Tursz, G. Kroemer, and L. Zitvogel. 2007. The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Immunological reviews* 220:47-59.
- Badoual, C., S. Hans, N. Merillon, C. Van Ryswick, P. Ravel, N. Benhamouda, E. Levionnois, M. Nizard, A. Si-Mohamed, N. Besnier, A. Gey, R. Rotem-Yehudar, H. Pere, T. Tran, C.L. Guerin, A. Chauvat, E. Dransart, C. Alanio, S. Albert, B. Barry, F. Sandoval, F. Quintin-Colonna, P. Bruneval, W.H. Fridman, F.M. Lemoine, S. Oudard, L. Johannes, D. Olive, D. Brasnu, and E. Tartour. 2013. PD-1-expressing tumor-infiltrating T cells are a favorable prognostic biomarker in HPV-associated head and neck cancer. *Cancer research* 73:128-138.
- Badoual, C., S. Hans, J. Rodriguez, S. Peyrard, C. Klein, H. Agueznay Nel, V. Mosseri, O. Laccourreye, P. Bruneval, W.H. Fridman, D.F. Brasnu, and E. Tartour. 2006. Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 12:465-472.
- Bach, F.H., C. Grillo-Courvalin, O.J. Kuperman, H.W. Sollinger, C. Hayes, P.M. Sondel, B.J. Alter, and M.L. Bach. 1977. Antigenic requirements for triggering of cytotoxic T lymphocytes. *Immunological reviews* 35:76-96.

- Baier, P.K., S. Wimmenauer, T. Hirsch, B.U. von Specht, S. von Kleist, H. Keller, and E.H. Farthmann. 1998. Analysis of the T cell receptor variability of tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal carcinomas. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 19:205-212.
- Baitsch, L., P. Baumgaertner, E. Devere, S.K. Raghav, A. Legat, L. Barba, S. Wieckowski, H. Bouzourene, B. Deplancke, P. Romero, N. Rufer, and D.E. Speiser. 2011. Exhaustion of tumor-specific CD8(+) T cells in metastases from melanoma patients. *The Journal of clinical investigation* 121:2350-2360.
- Barber, D.L., E.J. Wherry, D. Masopust, B. Zhu, J.P. Allison, A.H. Sharpe, G.J. Freeman, and R. Ahmed. 2006. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 439:682-687.
- Barker, H.E., J. Chang, T.R. Cox, G. Lang, D. Bird, M. Nicolau, H.R. Evans, A. Gartland, and J.T. Erler. 2011. LOXL2-mediated matrix remodeling in metastasis and mammary gland involution. *Cancer research* 71:1561-1572.
- Benchetrit, F., A. Ciree, V. Vives, G. Warnier, A. Gey, C. Sautes-Fridman, F. Fossiez, N. Haicheur, W.H. Fridman, and E. Tartour. 2002. Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell-dependent mechanism. *Blood* 99:2114-2121.
- Bennett, S.R., F.R. Carbone, F. Karamalis, J.F. Miller, and W.R. Heath. 1997. Induction of a CD8+ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4+ T cell help. *The Journal of experimental medicine* 186:65-70.
- Bergmann, C., L. Strauss, Y. Wang, M.J. Szczepanski, S. Lang, J.T. Johnson, and T.L. Whiteside. 2008. T regulatory type 1 cells in squamous cell carcinoma of the head and neck: mechanisms of suppression and expansion in advanced disease. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14:3706-3715.
- Bevan, M.J. 1989. Immunology. Stimulating killer cells. *Nature* 342:478-479.
- Bierie, B., and H.L. Moses. 2006. Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nature reviews. Cancer* 6:506-520.
- Bindra, R.S., and P.M. Glazer. 2005. Genetic instability and the tumor microenvironment: towards the concept of microenvironment-induced mutagenesis. *Mutation research* 569:75-85.
- Biteau, B., C.E. Hochmuth, and H. Jasper. 2011. Maintaining tissue homeostasis: dynamic control of somatic stem cell activity. *Cell stem cell* 9:402-411.
- Blackburn, S.D., H. Shin, G.J. Freeman, and E.J. Wherry. 2008. Selective expansion of a subset of exhausted CD8 T cells by alphaPD-L1 blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:15016-15021.
- Boczkowski, D., S.K. Nair, J.H. Nam, H.K. Lysterly, and E. Gilboa. 2000. Induction of tumor immunity and cytotoxic T lymphocyte responses using dendritic cells transfected with messenger RNA amplified from tumor cells. *Cancer research* 60:1028-1034.
- Bourgeois, C., B. Rocha, and C. Tanchot. 2002. A role for CD40 expression on CD8+ T cells in the generation of CD8+ T cell memory. *Science* 297:2060-2063.
- Brahimi-Horn, M.C., and J. Pouyssegur. 2007. Oxygen, a source of life and stress. *FEBS letters* 581:3582-3591.
- Brown, J.A., D.M. Dorfman, F.R. Ma, E.L. Sullivan, O. Munoz, C.R. Wood, E.A. Greenfield, and G.J. Freeman. 2003. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *Journal of immunology* 170:1257-1266.

- Bruder, D., M. Probst-Kepper, A.M. Westendorf, R. Geffers, S. Beissert, K. Loser, H. von Boehmer, J. Buer, and W. Hansen. 2004. Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *European journal of immunology* 34:623-630.
- Bursucker, I., and R.J. North. 1984. Generation and decay of the immune response to a progressive fibrosarcoma. II. Failure to demonstrate postexcision immunity after the onset of T cell-mediated suppression of immunity. *The Journal of experimental medicine* 159:1312-1321.
- Callahan, M.K., M.A. Postow, and J.D. Wolchok. 2014. CTLA-4 and PD-1 Pathway Blockade: Combinations in the Clinic. *Frontiers in oncology* 4:385.
- Carreras, J., A. Lopez-Guillermo, B.C. Fox, L. Colomo, A. Martinez, G. Roncador, E. Montserrat, E. Campo, and A.H. Banham. 2006. High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *Blood* 108:2957-2964.
- Cassell, D., and J. Forman. 1988. Linked recognition of helper and cytotoxic antigenic determinants for the generation of cytotoxic T lymphocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 532:51-60.
- Clemente, C.G., M.C. Mihm, Jr., R. Bufalino, S. Zurrada, P. Collini, and N. Cascinelli. 1996. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* 77:1303-1310.
- Coffman, R.L. 1989. T-helper heterogeneity and immune response patterns. *Hospital practice* 24:101-105, 108, 113-114, passim.
- Cojoc, M., C. Peitzsch, F. Trautmann, L. Polishchuk, G.D. Telegeev, and A. Dubrovskaya. 2013. Emerging targets in cancer management: role of the CXCL12/CXCR4 axis. *OncoTargets and therapy* 6:1347-1361.
- Collison, L.W., C.J. Workman, T.T. Kuo, K. Boyd, Y. Wang, K.M. Vignali, R. Cross, D. Sehy, R.S. Blumberg, and D.A. Vignali. 2007. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450:566-569.
- Conrad, C., J. Gregorio, Y.H. Wang, T. Ito, S. Meller, S. Hanabuchi, S. Anderson, N. Atkinson, P.T. Ramirez, Y.J. Liu, R. Freedman, and M. Gilliet. 2012. Plasmacytoid dendritic cells promote immunosuppression in ovarian cancer via ICOS costimulation of Foxp3(+) T-regulatory cells. *Cancer research* 72:5240-5249.
- Cox, T.R., and J.T. Erler. 2011. Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. *Disease models & mechanisms* 4:165-178.
- Csiszar, K. 2001. Lysyl oxidases: a novel multifunctional amine oxidase family. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* 70:1-32.
- Cukierman, E., and D.R. Khan. 2010. The benefits and challenges associated with the use of drug delivery systems in cancer therapy. *Biochemical pharmacology* 80:762-770.
- Curiel, T.J., G. Coukos, L. Zou, X. Alvarez, P. Cheng, P. Mottram, M. Evdemon-Hogan, J.R. Conejo-Garcia, L. Zhang, M. Burow, Y. Zhu, S. Wei, I. Kryczek, B. Daniel, A. Gordon, L. Myers, A. Lackner, M.L. Disis, K.L. Knutson, L. Chen, and W. Zou. 2004a. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature medicine* 10:942-949.
- Curiel, T.J., P. Cheng, P. Mottram, X. Alvarez, L. Moons, M. Evdemon-Hogan, S. Wei, L. Zou, I. Kryczek, G. Hoyle, A. Lackner, P. Carmeliet, and W. Zou. 2004b. Dendritic cell subsets differentially regulate angiogenesis in human ovarian cancer. *Cancer research* 64:5535-5538.

- Dang, C.V. 2012. Links between metabolism and cancer. *Genes & development* 26:877-890.
- Distler, J.H., A. Hirth, M. Kurowska-Stolarska, R.E. Gay, S. Gay, and O. Distler. 2003. Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *The quarterly journal of nuclear medicine : official publication of the Italian Association of Nuclear Medicine* 47:149-161.
- Dong, H., S.E. Strome, D.R. Salomao, H. Tamura, F. Hirano, D.B. Flies, P.C. Roche, J. Lu, G. Zhu, K. Tamada, V.A. Lennon, E. Celis, and L. Chen. 2002. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nature medicine* 8:793-800.
- Dunn, G.P., A.T. Bruce, K.C. Sheehan, V. Shankaran, R. Uppaluri, J.D. Bui, M.S. Diamond, C.M. Koebel, C. Arthur, J.M. White, and R.D. Schreiber. 2005. A critical function for type I interferons in cancer immunoediting. *Nature immunology* 6:722-729.
- Dzionek, A., Y. Inagaki, K. Okawa, J. Nagafune, J. Rock, Y. Sohma, G. Winkels, M. Zysk, Y. Yamaguchi, and J. Schmitz. 2002. Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions. *Human immunology* 63:1133-1148.
- Egeblad, M., M.G. Rasch, and V.M. Weaver. 2010. Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. *Current opinion in cell biology* 22:697-706.
- Ekmekcioglu, S., J. Ellerhorst, C.M. Smid, V.G. Prieto, M. Munsell, A.C. Buzaid, and E.A. Grimm. 2000. Inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in human metastatic melanoma tumors correlate with poor survival. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 6:4768-4775.
- Euvrard, S., J. Kanitakis, and A. Claudy. 2003. Skin cancers after organ transplantation. *The New England journal of medicine* 348:1681-1691.
- Faget, J., C. Biota, T. Bachelot, M. Gobert, I. Treilleux, N. Goutagny, I. Durand, S. Leon-Goddard, J.Y. Blay, C. Caux, and C. Menetrier-Caux. 2011. Early detection of tumor cells by innate immune cells leads to T(reg) recruitment through CCL22 production by tumor cells. *Cancer research* 71:6143-6152.
- Fialova, A., S. Partlova, L. Sojka, H. Hromadkova, T. Brtnicky, J. Fucikova, P. Kocian, L. Rob, J. Bartunkova, and R. Spisek. 2013. Dynamics of T-cell infiltration during the course of ovarian cancer: the gradual shift from a Th17 effector cell response to a predominant infiltration by regulatory T-cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 132:1070-1079.
- Fischer, K., P. Hoffmann, S. Voelkl, N. Meidenbauer, J. Ammer, M. Edinger, E. Gottfried, S. Schwarz, G. Rothe, S. Hoves, K. Renner, B. Timischl, A. Mackensen, L. Kunz-Schughart, R. Andreesen, S.W. Krause, and M. Kreutz. 2007. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood* 109:3812-3819.
- Fiszer, D., and M. Kurpisz. 1998. Major histocompatibility complex expression on human, male germ cells: a review. *American journal of reproductive immunology* 40:172-176.
- Fourcade, J., P. Kudela, Z. Sun, H. Shen, S.R. Land, D. Lenzner, P. Guillaume, I.F. Luescher, C. Sander, S. Ferrone, J.M. Kirkwood, and H.M. Zarour. 2009. PD-1 is a regulator of NY-ESO-1-specific CD8+ T cell expansion in melanoma patients. *Journal of immunology* 182:5240-5249.

- Fourcade, J., Z. Sun, M. Benallaoua, P. Guillaume, I.F. Luescher, C. Sander, J.M. Kirkwood, V. Kuchroo, and H.M. Zarour. 2010. Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8+ T cell dysfunction in melanoma patients. *The Journal of experimental medicine* 207:2175-2186.
- Frantz, C., K.M. Stewart, and V.M. Weaver. 2010. The extracellular matrix at a glance. *Journal of cell science* 123:4195-4200.
- Frezza, C., and E. Gottlieb. 2009. Mitochondria in cancer: not just innocent bystanders. *Seminars in cancer biology* 19:4-11.
- Fridman, W.H., F. Pages, C. Sautes-Fridman, and J. Galon. 2012. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nature reviews. Cancer* 12:298-306.
- Fu, J., D. Xu, Z. Liu, M. Shi, P. Zhao, B. Fu, Z. Zhang, H. Yang, H. Zhang, C. Zhou, J. Yao, L. Jin, H. Wang, Y. Yang, Y.X. Fu, and F.S. Wang. 2007. Increased regulatory T cells correlate with CD8 T-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *Gastroenterology* 132:2328-2339.
- Fucikova, J., P. Kralikova, A. Fialova, T. Brtnicky, L. Rob, J. Bartunkova, and R. Spisek. 2011. Human tumor cells killed by anthracyclines induce a tumor-specific immune response. *Cancer research* 71:4821-4833.
- Fucikova, J., I. Moserova, I. Truxova, I. Hermanova, I. Vancurova, S. Partlova, A. Fialova, L. Sojka, P.F. Cartron, M. Houska, L. Rob, J. Bartunkova, and R. Spisek. 2014. High hydrostatic pressure induces immunogenic cell death in human tumor cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 135:1165-1177.
- Gabrilovich, D.I., and S. Nagaraj. 2009. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nature reviews. Immunology* 9:162-174.
- Galon, J., A. Costes, F. Sanchez-Cabo, A. Kirilovsky, B. Mlecnik, C. Lagorce-Pages, M. Tosolini, M. Camus, A. Berger, P. Wind, F. Zinzindohoue, P. Bruneval, P.H. Cugnenc, Z. Trajanoski, W.H. Fridman, and F. Pages. 2006. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313:1960-1964.
- Galon, J., B. Mlecnik, G. Bindea, H.K. Angell, A. Berger, C. Lagorce, A. Lugli, I. Zlobec, A. Hartmann, C. Bifulco, I.D. Nagtegaal, R. Palmqvist, G.V. Masucci, G. Botti, F. Tatangelo, P. Delrio, M. Maio, L. Laghi, F. Grizzi, M. Asslaber, C. D'Arrigo, F. Vidal-Vanaclocha, E. Zavadova, L. Chouchane, P.S. Ohashi, S. Hafezi-Bakhtiari, B.G. Wouters, M. Roehrl, L. Nguyen, Y. Kawakami, S. Hazama, K. Okuno, S. Ogino, P. Gibbs, P. Waring, N. Sato, T. Torigoe, K. Itoh, P.S. Patel, S.N. Shukla, Y. Wang, S. Kopetz, F.A. Sinicrope, V. Scripcariu, P.A. Ascierto, F.M. Marincola, B.A. Fox, and F. Pages. 2014. Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. *The Journal of pathology* 232:199-209.
- Galon, J., F. Pages, F.M. Marincola, H.K. Angell, M. Thurin, A. Lugli, I. Zlobec, A. Berger, C. Bifulco, G. Botti, F. Tatangelo, C.M. Britten, S. Kreiter, L. Chouchane, P. Delrio, H. Arndt, M. Asslaber, M. Maio, G.V. Masucci, M. Mihm, F. Vidal-Vanaclocha, J.P. Allison, S. Gnjatic, L. Hakansson, C. Huber, H. Singh-Jasuja, C. Ottensmeier, H. Zwierzina, L. Laghi, F. Grizzi, P.S. Ohashi, P.A. Shaw, B.A. Clarke, B.G. Wouters, Y. Kawakami, S. Hazama, K. Okuno, E. Wang, J. O'Donnell-Tormey, C. Lagorce, G. Pawelec, M.I. Nishimura, R. Hawkins, R. Lapointe, A. Lundqvist, S.N. Khleif, S. Ogino, P. Gibbs, P. Waring, N. Sato, T. Torigoe, K. Itoh, P.S. Patel, S.N. Shukla, R. Palmqvist, I.D. Nagtegaal, Y. Wang, C. D'Arrigo, S. Kopetz, F.A. Sinicrope, G. Trinchieri, T.F.

- Gajewski, P.A. Ascierto, and B.A. Fox. 2012a. Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. *Journal of translational medicine* 10:205.
- Galon, J., F. Pages, F.M. Marincola, M. Thurin, G. Trinchieri, B.A. Fox, T.F. Gajewski, and P.A. Ascierto. 2012b. The immune score as a new possible approach for the classification of cancer. *Journal of translational medicine* 10:1.
- Gao, Q., S.J. Qiu, J. Fan, J. Zhou, X.Y. Wang, Y.S. Xiao, Y. Xu, Y.W. Li, and Z.Y. Tang. 2007. Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 25:2586-2593.
- Garg, A.D., D. Nowis, J. Golab, P. Vandenabeele, D.V. Krysko, and P. Agostinis. 2010. Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: an emerging amalgamation. *Biochimica et biophysica acta* 1805:53-71.
- Gatenby, R.A., and R.J. Gillies. 2004. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature reviews. Cancer* 4:891-899.
- Gavin, M.A., T.R. Torgerson, E. Houston, P. DeRoos, W.Y. Ho, A. Stray-Pedersen, E.L. Ocheltree, P.D. Greenberg, H.D. Ochs, and A.Y. Rudensky. 2006. Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:6659-6664.
- Gehring, A.J., Z.Z. Ho, A.T. Tan, M.O. Aung, K.H. Lee, K.C. Tan, S.G. Lim, and A. Bertolotti. 2009. Profile of tumor antigen-specific CD8 T cells in patients with hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 137:682-690.
- Gillies, R.J., N. Raghunand, G.S. Karczmar, and Z.M. Bhujwalla. 2002. MRI of the tumor microenvironment. *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI* 16:430-450.
- Girardi, M., D.E. Oppenheim, C.R. Steele, J.M. Lewis, E. Glusac, R. Filler, P. Hobby, B. Sutton, R.E. Tigelaar, and A.C. Hayday. 2001. Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science* 294:605-609.
- Gondek, D.C., L.F. Lu, S.A. Quezada, S. Sakaguchi, and R.J. Noelle. 2005. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *Journal of immunology* 174:1783-1786.
- Goonewardene, T.I., H.M. Sowter, and A.L. Harris. 2002. Hypoxia-induced pathways in breast cancer. *Microscopy research and technique* 59:41-48.
- Gravano, D.M., and D.A. Vignali. 2012. The battle against immunopathology: infectious tolerance mediated by regulatory T cells. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 69:1997-2008.
- Green, C.E., T. Liu, V. Montel, G. Hsiao, R.D. Lester, S. Subramaniam, S.L. Gonias, and R.L. Klemke. 2009a. Chemoattractant signaling between tumor cells and macrophages regulates cancer cell migration, metastasis and neovascularization. *PloS one* 4:e6713.
- Green, D.R., T. Ferguson, L. Zitvogel, and G. Kroemer. 2009b. Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nature reviews. Immunology* 9:353-363.
- Grose, R., and S. Werner. 2004. Wound-healing studies in transgenic and knockout mice. *Molecular biotechnology* 28:147-166.
- Guerder, S., and P. Matzinger. 1989. Activation versus tolerance: a decision made by T helper cells. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 54 Pt 2:799-805.

- Hamanaka, R.B., and N.S. Chandel. 2012. Targeting glucose metabolism for cancer therapy. *The Journal of experimental medicine* 209:211-215.
- Hanahan, D., and R.A. Weinberg. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.
- Hansen, W., M. Hutzler, S. Abel, C. Alter, C. Stockmann, S. Kliche, J. Albert, T. Sparwasser, S. Sakaguchi, A.M. Westendorf, D. Schadendorf, J. Buer, and I. Helfrich. 2012. Neuropilin 1 deficiency on CD4+Foxp3+ regulatory T cells impairs mouse melanoma growth. *The Journal of experimental medicine* 209:2001-2016.
- Hanson, E.M., V.K. Clements, P. Sinha, D. Ilkovitch, and S. Ostrand-Rosenberg. 2009. Myeloid-derived suppressor cells down-regulate L-selectin expression on CD4+ and CD8+ T cells. *Journal of immunology* 183:937-944.
- Hartmann, E., B. Wollenberg, S. Rothenfusser, M. Wagner, D. Wellisch, B. Mack, T. Giese, O. Gires, S. Endres, and G. Hartmann. 2003. Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer. *Cancer research* 63:6478-6487.
- Hiraoka, N., K. Onozato, T. Kosuge, and S. Hirohashi. 2006. Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 12:5423-5434.
- Holmgren, L., M.S. O'Reilly, and J. Folkman. 1995. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nature medicine* 1:149-153.
- Hu, J., X. Yuan, M.L. Belladonna, J.M. Ong, S. Wachsmann-Hogiu, D.L. Farkas, K.L. Black, and J.S. Yu. 2006. Induction of potent antitumor immunity by intratumoral injection of interleukin 23-transduced dendritic cells. *Cancer research* 66:8887-8896.
- Chang, C.L., G. Marra, D.P. Chauhan, H.T. Ha, D.K. Chang, L. Ricciardiello, A. Randolph, J.M. Carethers, and C.R. Boland. 2002a. Oxidative stress inactivates the human DNA mismatch repair system. *American journal of physiology. Cell physiology* 283:C148-154.
- Chang, H.Y., J.T. Chi, S. Dudoit, C. Bondre, M. van de Rijn, D. Botstein, and P.O. Brown. 2002b. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:12877-12882.
- Chen, R., X.T. Song, and B. Chen. 2015. CD19 chimeric antigen receptor T cell therapy for the treatment of B cell lineage acute lymphoblastic leukemia. *Discovery medicine* 20:185-190.
- Ilan, N., M. Elkin, and I. Vlodavsky. 2006. Regulation, function and clinical significance of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis. *The international journal of biochemistry & cell biology* 38:2018-2039.
- Inaba, K., J.P. Metlay, M.T. Crowley, and R.M. Steinman. 1990. Dendritic cells pulsed with protein antigens in vitro can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells in situ. *The Journal of experimental medicine* 172:631-640.
- Ito, N., Y. Suzuki, Y. Taniguchi, K. Ishiguro, H. Nakamura, and S. Ohgi. 2005. Prognostic significance of T helper 1 and 2 and T cytotoxic 1 and 2 cells in patients with non-small cell lung cancer. *Anticancer research* 25:2027-2031.
- Itoh, K., and A. Yamada. 2006. Personalized peptide vaccines: a new therapeutic modality for cancer. *Cancer science* 97:970-976.
- Itoh, M., T. Takahashi, N. Sakaguchi, Y. Kuniyasu, J. Shimizu, F. Otsuka, and S. Sakaguchi. 1999. Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+

- naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *Journal of immunology* 162:5317-5326.
- Kagan, H.M., and W. Li. 2003. Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. *Journal of cellular biochemistry* 88:660-672.
- Kalluri, R., and R.A. Weinberg. 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation* 119:1420-1428.
- Kalluri, R., and M. Zeisberg. 2006. Fibroblasts in cancer. *Nature reviews. Cancer* 6:392-401.
- Karagiannis, G.S., T. Poutahidis, S.E. Erdman, R. Kirsch, R.H. Riddell, and E.P. Diamandis. 2012. Cancer-associated fibroblasts drive the progression of metastasis through both paracrine and mechanical pressure on cancer tissue. *Molecular cancer research : MCR* 10:1403-1418.
- Kessenbrock, K., V. Plaks, and Z. Werb. 2010. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 141:52-67.
- Kim, Y., M.A. Stolarska, and H.G. Othmer. 2011. The role of the microenvironment in tumor growth and invasion. *Progress in biophysics and molecular biology* 106:353-379.
- Klein, G., E. Vellenga, M.W. Fraaije, W.A. Kamps, and E.S. de Bont. 2004. The possible role of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in cancer, e.g. acute leukemia. *Critical reviews in oncology/hematology* 50:87-100.
- Kocian, P., M. Sedivcova, J. Drgac, K. Cerna, J. Hoch, R. Kodet, J. Bartunkova, R. Spisek, and A. Fialova. 2011. Tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells in human colorectal cancer: their relationship to KRAS mutational status and disease recurrence. *Human immunology* 72:1022-1028.
- Kohrmann, A., U. Kammerer, M. Kapp, J. Dietl, and J. Anacker. 2009. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: New findings and review of the literature. *BMC cancer* 9:188.
- Kono, K., H. Kawaida, A. Takahashi, H. Sugai, K. Mimura, N. Miyagawa, H. Omata, and H. Fujii. 2006. CD4(+)CD25high regulatory T cells increase with tumor stage in patients with gastric and esophageal cancers. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 55:1064-1071.
- Korn, T., E. Bettelli, M. Oukka, and V.K. Kuchroo. 2009. IL-17 and Th17 Cells. *Annual review of immunology* 27:485-517.
- Kryczek, I., M. Banerjee, P. Cheng, L. Vatan, W. Szeliga, S. Wei, E. Huang, E. Finlayson, D. Simeone, T.H. Welling, A. Chang, G. Coukos, R. Liu, and W. Zou. 2009. Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood* 114:1141-1149.
- Krysko, D.V., A.D. Garg, A. Kaczmarek, O. Krysko, P. Agostinis, and P. Vandenabeele. 2012. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nature reviews. Cancer* 12:860-875.
- Krysko, D.V., and P. Vandenabeele. 2008. From regulation of dying cell engulfment to development of anti-cancer therapy. *Cell death and differentiation* 15:29-38.
- Kunz, M., and S.M. Ibrahim. 2003. Molecular responses to hypoxia in tumor cells. *Molecular cancer* 2:23.
- Kusmartsev, S., Y. Nefedova, D. Yoder, and D.I. Gibrilovich. 2004. Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species. *Journal of immunology* 172:989-999.

- Ladanyi, A., J. Kiss, B. Somlai, K. Gilde, Z. Fejos, A. Mohos, I. Gaudi, and J. Timar. 2007. Density of DC-LAMP(+) mature dendritic cells in combination with activated T lymphocytes infiltrating primary cutaneous melanoma is a strong independent prognostic factor. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 56:1459-1469.
- Lai, Y.P., C.C. Lin, W.J. Liao, C.Y. Tang, and S.C. Chen. 2009. CD4+ T cell-derived IL-2 signals during early priming advances primary CD8+ T cell responses. *PloS one* 4:e7766.
- Langowski, J.L., X. Zhang, L. Wu, J.D. Mattson, T. Chen, K. Smith, B. Basham, T. McClanahan, R.A. Kastelein, and M. Oft. 2006. IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature* 442:461-465.
- Lawrence, D.A. 1996. Transforming growth factor-beta: a general review. *European cytokine network* 7:363-374.
- Le, Q.T., J. Harris, A.M. Magliocco, C.S. Kong, R. Diaz, B. Shin, H. Cao, A. Trotti, J.T. Erler, C.H. Chung, A. Dicker, T.F. Pajak, A.J. Giaccia, and K.K. Ang. 2009. Validation of lysyl oxidase as a prognostic marker for metastasis and survival in head and neck squamous cell carcinoma: Radiation Therapy Oncology Group trial 90-03. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27:4281-4286.
- Lennert, K., and W. Remmele. 1958. [Karyometric research on lymph node cells in man. I. Germinoblasts, lymphoblasts & lymphocytes]. *Acta haematologica* 19:99-113.
- Levental, K.R., H. Yu, L. Kass, J.N. Lakins, M. Egeblad, J.T. Erler, S.F. Fong, K. Csiszar, A. Giaccia, W. Weninger, M. Yamauchi, D.L. Gasser, and V.M. Weaver. 2009. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* 139:891-906.
- Liu, C., S. Gao, Z. Qu, and L. Zhang. 2007. Tumor microenvironment: hypoxia and buffer capacity for immunotherapy. *Medical hypotheses* 69:590-595.
- Liu, H., L. Liu, K. Liu, P. Bizargity, W.W. Hancock, and G.A. Visner. 2009. Reduced cytotoxic function of effector CD8+ T cells is responsible for indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent immune suppression. *Journal of immunology* 183:1022-1031.
- Liu, J., Y. Duan, X. Cheng, X. Chen, W. Xie, H. Long, Z. Lin, and B. Zhu. 2011. IL-17 is associated with poor prognosis and promotes angiogenesis via stimulating VEGF production of cancer cells in colorectal carcinoma. *Biochemical and biophysical research communications* 407:348-354.
- Loeffler, M., J.A. Kruger, A.G. Niethammer, and R.A. Reisfeld. 2006. Targeting tumor-associated fibroblasts improves cancer chemotherapy by increasing intratumoral drug uptake. *The Journal of clinical investigation* 116:1955-1962.
- Lochter, A., S. Galosy, J. Muschler, N. Freedman, Z. Werb, and M.J. Bissell. 1997. Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. *The Journal of cell biology* 139:1861-1872.
- Lopez, J.I., I. Kang, W.K. You, D.M. McDonald, and V.M. Weaver. 2011. In situ force mapping of mammary gland transformation. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro* 3:910-921.
- Lotze, M.T. 1997. Getting to the source: dendritic cells as therapeutic reagents for the treatment of patients with cancer. *Annals of surgery* 226:1-5.

- Luboshits, G., S. Shina, O. Kaplan, S. Engelberg, D. Nass, B. Lifshitz-Mercer, S. Chaitchik, I. Keydar, and A. Ben-Baruch. 1999. Elevated expression of the CC chemokine regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) in advanced breast carcinoma. *Cancer research* 59:4681-4687.
- Mahoney, B.P., N. Raghunand, B. Baggett, and R.J. Gillies. 2003. Tumor acidity, ion trapping and chemotherapeutics. I. Acid pH affects the distribution of chemotherapeutic agents in vitro. *Biochemical pharmacology* 66:1207-1218.
- Mandapathil, M., M.J. Szczepanski, M. Szajnik, J. Ren, E.K. Jackson, J.T. Johnson, E. Gorelik, S. Lang, and T.L. Whiteside. 2010. Adenosine and prostaglandin E2 cooperate in the suppression of immune responses mediated by adaptive regulatory T cells. *The Journal of biological chemistry* 285:27571-27580.
- Melbye, M., T.R. Cote, L. Kessler, M. Gail, and R.J. Biggar. 1994. High incidence of anal cancer among AIDS patients. The AIDS/Cancer Working Group. *Lancet* 343:636-639.
- Mlecnik, B., M. Tosolini, P. Charoentong, A. Kirilovsky, G. Bindea, A. Berger, M. Camus, M. Gillard, P. Bruneval, W.H. Fridman, F. Pages, Z. Trajanoski, and J. Galon. 2010. Biomolecular network reconstruction identifies T-cell homing factors associated with survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* 138:1429-1440.
- Mlecnik, B., M. Tosolini, A. Kirilovsky, A. Berger, G. Bindea, T. Meatchi, P. Bruneval, Z. Trajanoski, W.H. Fridman, F. Pages, and J. Galon. 2011. Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29:610-618.
- Monney, L., C.A. Sabatos, J.L. Gaglia, A. Ryu, H. Waldner, T. Chernova, S. Manning, E.A. Greenfield, A.J. Coyle, R.A. Sobel, G.J. Freeman, and V.K. Kuchroo. 2002. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature* 415:536-541.
- Mosmann, T.R., and R.L. Coffman. 1989. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Advances in immunology* 46:111-147.
- Mueller, M.M., and N.E. Fusenig. 2004. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nature reviews. Cancer* 4:839-849.
- Muller, A., B. Homey, H. Soto, N. Ge, D. Catron, M.E. Buchanan, T. McClanahan, E. Murphy, W. Yuan, S.N. Wagner, J.L. Barrera, A. Mohar, E. Verastegui, and A. Zlotnik. 2001. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410:50-56.
- Muller, G., U.E. Hopken, and M. Lipp. 2003. The impact of CCR7 and CXCR5 on lymphoid organ development and systemic immunity. *Immunological reviews* 195:117-135.
- Mumprecht, S., C. Schurch, J. Schwaller, M. Solenthaler, and A.F. Ochsenbein. 2009. Programmed death 1 signaling on chronic myeloid leukemia-specific T cells results in T-cell exhaustion and disease progression. *Blood* 114:1528-1536.
- Naito, Y., K. Saito, K. Shiiba, A. Ohuchi, K. Saigenji, H. Nagura, and H. Ohtani. 1998. CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer research* 58:3491-3494.
- Nakamura, Y., H. Yasuoka, M. Tsujimoto, K. Yoshidome, M. Nakahara, K. Nakao, M. Nakamura, and K. Kakudo. 2006. Nitric oxide in breast cancer: induction of vascular endothelial growth factor-C and correlation with metastasis and poor prognosis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 12:1201-1207.

- Nakano, H., and M.D. Gunn. 2001. Gene duplications at the chemokine locus on mouse chromosome 4: multiple strain-specific haplotypes and the deletion of secondary lymphoid-organ chemokine and EBI-1 ligand chemokine genes in the plt mutation. *Journal of immunology* 166:361-369.
- Napolitani, G., A. Rinaldi, F. Bertoni, F. Sallusto, and A. Lanzavecchia. 2005. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nature immunology* 6:769-776.
- Niwa, Y., H. Akamatsu, H. Niwa, H. Sumi, Y. Ozaki, and A. Abe. 2001. Correlation of tissue and plasma RANTES levels with disease course in patients with breast or cervical cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 7:285-289.
- Orimo, A., P.B. Gupta, D.C. Sgroi, F. Arenzana-Seisdedos, T. Delaunay, R. Naeem, V.J. Carey, A.L. Richardson, and R.A. Weinberg. 2005. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 121:335-348.
- Ormandy, L.A., T. Hillemann, H. Wedemeyer, M.P. Manns, T.F. Greten, and F. Korangy. 2005. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer research* 65:2457-2464.
- Page-McCaw, A., A.J. Ewald, and Z. Werb. 2007. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nature reviews. Molecular cell biology* 8:221-233.
- Panaretakis, T., O. Kepp, U. Brockmeier, A. Tesniere, A.C. Bjorklund, D.C. Chapman, M. Durchschlag, N. Joza, G. Pierron, P. van Endert, J. Yuan, L. Zitvogel, F. Madeo, D.B. Williams, and G. Kroemer. 2009. Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *The EMBO journal* 28:578-590.
- Parangi, S., M. O'Reilly, G. Christofori, L. Holmgren, J. Grosfeld, J. Folkman, and D. Hanahan. 1996. Antiangiogenic therapy of transgenic mice impairs de novo tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:2002-2007.
- Parsonage, G., A.D. Filer, O. Haworth, G.B. Nash, G.E. Rainger, M. Salmon, and C.D. Buckley. 2005. A stromal address code defined by fibroblasts. *Trends in immunology* 26:150-156.
- Paszek, M.J., N. Zahir, K.R. Johnson, J.N. Lakins, G.I. Rozenberg, A. Gefen, C.A. Reinhart-King, S.S. Margulies, M. Dembo, D. Boettiger, D.A. Hammer, and V.M. Weaver. 2005. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer cell* 8:241-254.
- Qin, Z., J. Schwartzkopff, F. Pradera, T. Kammertoens, B. Seliger, H. Pircher, and T. Blankenstein. 2003. A critical requirement of interferon gamma-mediated angiostasis for tumor rejection by CD8+ T cells. *Cancer research* 63:4095-4100.
- Quezada, S.A., T.R. Simpson, K.S. Peggs, T. Merghoub, J. Vider, X. Fan, R. Blasberg, H. Yagita, P. Muranski, P.A. Antony, N.P. Restifo, and J.P. Allison. 2010. Tumor-reactive CD4(+) T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *The Journal of experimental medicine* 207:637-650.
- Rebustini, I.T., C. Myers, K.S. Lassiter, A. Surmak, L. Szabova, K. Holmbeck, V. Pedchenko, B.G. Hudson, and M.P. Hoffman. 2009. MT2-MMP-dependent release of collagen IV NC1 domains regulates submandibular gland branching morphogenesis. *Developmental cell* 17:482-493.

- Redman, J.M., E.M. Hill, D. AlDeghaither, and L.M. Weiner. 2015. Mechanisms of action of therapeutic antibodies for cancer. *Molecular immunology* 67:28-45.
- Reynolds, T.Y., S. Rockwell, and P.M. Glazer. 1996. Genetic instability induced by the tumor microenvironment. *Cancer research* 56:5754-5757.
- Rodemann, H.P., and G.A. Muller. 1991. Characterization of human renal fibroblasts in health and disease: II. In vitro growth, differentiation, and collagen synthesis of fibroblasts from kidneys with interstitial fibrosis. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 17:684-686.
- Rosenberg, S.A., M.T. Lotze, L.M. Muul, S. Leitman, A.E. Chang, S.E. Ettinghausen, Y.L. Matory, J.M. Skibber, E. Shiloni, J.T. Vetto, and et al. 1985. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *The New England journal of medicine* 313:1485-1492.
- Rosenberg, S.A., and N.P. Restifo. 2015. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science* 348:62-68.
- Rosenberg, S.A., N.P. Restifo, J.C. Yang, R.A. Morgan, and M.E. Dudley. 2008. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nature reviews. Cancer* 8:299-308.
- Sakuishi, K., L. Apetoh, J.M. Sullivan, B.R. Blazar, V.K. Kuchroo, and A.C. Anderson. 2010. Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *The Journal of experimental medicine* 207:2187-2194.
- Salama, P., M. Phillips, F. Grieu, M. Morris, N. Zeps, D. Joseph, C. Platell, and B. Iacopetta. 2009. Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27:186-192.
- Sallusto, F., D. Lenig, R. Forster, M. Lipp, and A. Lanzavecchia. 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401:708-712.
- Sanchez, E.Q., S. Marubashi, G. Jung, M.F. Levy, R.M. Goldstein, E.P. Molmenti, C.G. Fasola, T.A. Gonwa, L.W. Jennings, B.K. Brooks, and G.B. Klintmalm. 2002. De novo tumors after liver transplantation: a single-institution experience. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 8:285-291.
- Sarris, M., K.G. Andersen, F. Randow, L. Mayr, and A.G. Betz. 2008. Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition. *Immunity* 28:402-413.
- Sasada, T., M. Kimura, Y. Yoshida, M. Kanai, and A. Takabayashi. 2003. CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression. *Cancer* 98:1089-1099.
- Sato, E., S.H. Olson, J. Ahn, B. Bundy, H. Nishikawa, F. Qian, A.A. Jungbluth, D. Frosina, S. Gnjatic, C. Ambrosone, J. Kepner, T. Odunsi, G. Ritter, S. Lele, Y.T. Chen, H. Ohtani, L.J. Old, and K. Odunsi. 2005. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:18538-18543.
- Sauce, D., J.R. Almeida, M. Larsen, L. Haro, B. Autran, G.J. Freeman, and V. Appay. 2007. PD-1 expression on human CD8 T cells depends on both state of differentiation and activation status. *Aids* 21:2005-2013.

- Serafini, P., R. Carbley, K.A. Noonan, G. Tan, V. Bronte, and I. Borrello. 2004. High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells. *Cancer research* 64:6337-6343.
- Sharma, P., Y. Shen, S. Wen, S. Yamada, A.A. Jungbluth, S. Gnjatic, D.F. Bajorin, V.E. Reuter, H. Herr, L.J. Old, and E. Sato. 2007. CD8 tumor-infiltrating lymphocytes are predictive of survival in muscle-invasive urothelial carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:3967-3972.
- Shibuya, T.Y., N. Nugyen, C.E. McLaren, K.T. Li, W.Z. Wei, S. Kim, G.H. Yoo, A. Rogowski, J. Ensley, and W. Sakr. 2002. Clinical significance of poor CD3 response in head and neck cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 8:745-751.
- Shichijo, S., M. Nakao, Y. Imai, H. Takasu, M. Kawamoto, F. Niiya, D. Yang, Y. Toh, H. Yamana, and K. Itoh. 1998. A gene encoding antigenic peptides of human squamous cell carcinoma recognized by cytotoxic T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 187:277-288.
- Shimizu, K., M. Nakata, Y. Hirami, T. Yukawa, A. Maeda, and K. Tanemoto. 2010. Tumor-infiltrating Foxp3+ regulatory T cells are correlated with cyclooxygenase-2 expression and are associated with recurrence in resected non-small cell lung cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 5:585-590.
- Schattner, E.J., J. Mascarenhas, J. Bishop, D.H. Yoo, A. Chadburn, M.K. Crow, and S.M. Friedman. 1996. CD4+ T-cell induction of Fas-mediated apoptosis in Burkitt's lymphoma B cells. *Blood* 88:1375-1382.
- Smith, E.R., and E.A. Chiocca. 2000. Oncolytic viruses as novel anticancer agents: turning one scourge against another. *Expert opinion on investigational drugs* 9:311-327.
- Smyth, M.J., G.P. Dunn, and R.D. Schreiber. 2006. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Advances in immunology* 90:1-50.
- Smyth, M.J., K.Y. Thia, S.E. Street, E. Cretney, J.A. Trapani, M. Taniguchi, T. Kawano, S.B. Pelikan, N.Y. Crowe, and D.I. Godfrey. 2000. Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *The Journal of experimental medicine* 191:661-668.
- Spisek, R., A. Charalambous, A. Mazumder, D.H. Vesole, S. Jagannath, and M.V. Dhodapkar. 2007. Bortezomib enhances dendritic cell (DC)-mediated induction of immunity to human myeloma via exposure of cell surface heat shock protein 90 on dying tumor cells: therapeutic implications. *Blood* 109:4839-4845.
- Steeg, P.S. 2003. Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. *Nature reviews. Cancer* 3:55-63.
- Steinman, R.M., and Z.A. Cohn. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *The Journal of experimental medicine* 137:1142-1162.
- Stevanovic, S., L.M. Draper, M.M. Langan, T.E. Campbell, M.L. Kwong, J.R. Wunderlich, M.E. Dudley, J.C. Yang, R.M. Sherry, U.S. Kammula, N.P. Restifo, S.A. Rosenberg, and C.S. Hinrichs. 2015. Complete regression of metastatic cervical cancer after treatment with human papillomavirus-targeted tumor-infiltrating T cells. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 33:1543-1550.

- Street, S.E., E. Cretney, and M.J. Smyth. 2001. Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood* 97:192-197.
- Takanami, I. 2003. Overexpression of CCR7 mRNA in nonsmall cell lung cancer: correlation with lymph node metastasis. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 105:186-189.
- Tartour, E., F. Fossiez, I. Joyeux, A. Galinha, A. Gey, E. Claret, X. Sastre-Garau, J. Couturier, V. Mosseri, V. Vives, J. Banchereau, W.H. Fridman, J. Wijdenes, S. Lebecque, and C. Sautes-Fridman. 1999. Interleukin 17, a T-cell-derived cytokine, promotes tumorigenicity of human cervical tumors in nude mice. *Cancer research* 59:3698-3704.
- Terme, M., S. Pernot, E. Marcheteau, F. Sandoval, N. Benhamouda, O. Colussi, O. Dubreuil, A.F. Carpentier, E. Tartour, and J. Taieb. 2013. VEGFA-VEGFR pathway blockade inhibits tumor-induced regulatory T-cell proliferation in colorectal cancer. *Cancer research* 73:539-549.
- Thomas, W.D., and P. Hersey. 1998. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces apoptosis in Fas ligand-resistant melanoma cells and mediates CD4 T cell killing of target cells. *Journal of immunology* 161:2195-2200.
- Tomasek, J.J., G. Gabbiani, B. Hinz, C. Chaponnier, and R.A. Brown. 2002. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature reviews. Molecular cell biology* 3:349-363.
- Tosolini, M., A. Kirilovsky, B. Mlecnik, T. Fredriksen, S. Mauger, G. Bindea, A. Berger, P. Bruneval, W.H. Fridman, F. Pages, and J. Galon. 2011. Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer research* 71:1263-1271.
- Trautmann, L., L. Janbazian, N. Chomont, E.A. Said, S. Gimmig, B. Bessette, M.R. Boulassel, E. Delwart, H. Sepulveda, R.S. Balderas, J.P. Routy, E.K. Haddad, and R.P. Sekaly. 2006. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nature medicine* 12:1198-1202.
- Treilleux, I., J.Y. Blay, N. Bendriss-Vermare, I. Ray-Coquard, T. Bachelot, J.P. Guastalla, A. Bremond, S. Goddard, J.J. Pin, C. Barthelemy-Dubois, and S. Lebecque. 2004. Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 10:7466-7474.
- Trinchieri, G., D. Santoli, R.R. Dee, and B.B. Knowles. 1978. Anti-viral activity induced by culturing lymphocytes with tumor-derived or virus-transformed cells. Identification of the anti-viral activity as interferon and characterization of the human effector lymphocyte subpopulation. *The Journal of experimental medicine* 147:1299-1313.
- Tzankov, A., C. Meier, P. Hirschmann, P. Went, S.A. Pileri, and S. Dirnhofer. 2008. Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3+ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 93:193-200.
- Urbani, S., B. Amadei, D. Tola, M. Massari, S. Schivazappa, G. Missale, and C. Ferrari. 2006. PD-1 expression in acute hepatitis C virus (HCV) infection is associated with HCV-specific CD8 exhaustion. *Journal of virology* 80:11398-11403.
- van der Bruggen, P., C. Traversari, P. Chomez, C. Lurquin, E. De Plaen, B. Van den Eynde, A. Knuth, and T. Boon. 1991. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254:1643-1647.

- Van Tendeloo, V.F., P. Ponsaerts, F. Lardon, G. Nijs, M. Lenjou, C. Van Broeckhoven, D.R. Van Bockstaele, and Z.N. Berneman. 2001. Highly efficient gene delivery by mRNA electroporation in human hematopoietic cells: superiority to lipofection and passive pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells. *Blood* 98:49-56.
- Vander Heiden, M.G., L.C. Cantley, and C.B. Thompson. 2009. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324:1029-1033.
- Wang, G.L., B.H. Jiang, E.A. Rue, and G.L. Semenza. 1995. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:5510-5514.
- Wang, J., L. Xi, W. Gooding, T.E. Godfrey, and R.L. Ferris. 2005. Chemokine receptors 6 and 7 identify a metastatic expression pattern in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Advances in oto-rhino-laryngology* 62:121-133.
- Webb, J.R., K. Milne, and B.H. Nelson. 2015. PD-1 and CD103 Are Widely Coexpressed on Prognostically Favorable Intraepithelial CD8 T Cells in Human Ovarian Cancer. *Cancer immunology research* 3:926-935.
- Weiner, L.M., R. Surana, and S. Wang. 2010. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nature reviews. Immunology* 10:317-327.
- Wilke, C.M., I. Kryczek, S. Wei, E. Zhao, K. Wu, G. Wang, and W. Zou. 2011. Th17 cells in cancer: help or hindrance? *Carcinogenesis* 32:643-649.
- Witz, I.P., and O. Levy-Nissenbaum. 2006. The tumor microenvironment in the post-PAGET era. *Cancer letters* 242:1-10.
- Woo, E.Y., C.S. Chu, T.J. Goletz, K. Schlienger, H. Yeh, G. Coukos, S.C. Rubin, L.R. Kaiser, and C.H. June. 2001. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer research* 61:4766-4772.
- Wu, J., J. Fu, M. Zhang, and D. Liu. 2015. Blinatumomab: a bispecific T cell engager (BiTE) antibody against CD19/CD3 for refractory acute lymphoid leukemia. *Journal of hematology & oncology* 8:104.
- Wykoff, C.C., N. Beasley, P.H. Watson, L. Campo, S.K. Chia, R. English, J. Pastorek, W.S. Sly, P. Ratcliffe, and A.L. Harris. 2001. Expression of the hypoxia-inducible and tumor-associated carbonic anhydrases in ductal carcinoma in situ of the breast. *The American journal of pathology* 158:1011-1019.
- Youn, J.I., S. Nagaraj, M. Collazo, and D.I. Gaborilovich. 2008. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Journal of immunology* 181:5791-5802.
- Zajac, A.J., J.N. Blattman, K. Murali-Krishna, D.J. Sourdive, M. Suresh, J.D. Altman, and R. Ahmed. 1998. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *The Journal of experimental medicine* 188:2205-2213.
- Zhang, L., J.R. Conejo-Garcia, D. Katsaros, P.A. Gimotty, M. Massobrio, G. Regnani, A. Makrigiannakis, H. Gray, K. Schlienger, M.N. Liebman, S.C. Rubin, and G. Coukos. 2003. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *The New England journal of medicine* 348:203-213.
- Zhu, C., A.C. Anderson, A. Schubart, H. Xiong, J. Imitola, S.J. Khoury, X.X. Zheng, T.B. Strom, and V.K. Kuchroo. 2005. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nature immunology* 6:1245-1252.

Zou, W., and N.P. Restifo. 2010. T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy.
Nature reviews. Immunology 10:248-256.

Seznam autorských publikací

1. publikace *in extenso*, které jsou podkladem dizertační práce

Fialová A, **Partlová S**, Sojka L, Hromádková H, Brtnický T, Fučíková J, Kocián P, Rob L, Bartůňková J, Špišek R. Dynamics of T-cell infiltration during the course of ovarian cancer: The gradual shift from a Th17 effector cell response to a predominant infiltration by regulatory T-cells. **Int J Cancer**, 2012 Aug 2. doi:10.1002/ijc.27759 **IF 5.531**

Partlová Simona, Bouček Jan, Kloudová Kamila, Lukešová Eva, Zábrodský Michal, Grega Marek, Fučíková Jitka, Truxová Iva, Tachezy Ruth, Špišek Radek, Fialová Anna. *Distinct patterns of intratumoral immune cell infiltrates in patients with HPV-associated compared to non-virally induced head and neck squamous cell carcinoma*. **OncoImmunology**. 2015 Jan 30;4(1):e965570. eCollection 2015. **IF 6.283**

Fucikova J, Moserova I, Truxova I, Hermanova I, Vancurova I, **Partlova S**, Fialova A, Sojka L, Cartron PF, Houska M, Rob L, Bartunkova J, Spisek R. *High hydrostatic pressure induces immunogenic cell death in human tumor cells*. **Int J Cancer**. 2014 Sep 1;135(5):1165-77. doi: 10.1002/ijc.28766. Epub 2014 Feb 20. **IF 5.531**

Kamila Kloudová, Hana Hromádková, **Simona Partlová**, Tomáš Brtnický, Lukáš Rob, Jiřina Bartůňková, Michal Hensler, Michael J. Halaška, Radek Špišek, Anna Fialová. *Expression of tumor antigens on primary ovarian cancer cells compared to established ovarian cancer cell lines*. **Oncotarget**. 2016 Jun 14. doi: 10.18632/oncotarget.10028. **IF 6.368**

2. publikace *in extenso* bez vztahu k tématu dizertační práce

Truxova I, Pokorna K, Kloudova K, **Partlova S**, Spisek R, Fucikova J. *Day 3 Poly (I:C)-activated dendritic cells generated in CellGro for use in cancer immunotherapy trials are fully comparable to standard Day 5 DCs*. **Immunol Lett**. 2014 Jul;160(1):39-49. doi: 10.1016/j.imlet.2014.03.010. Epub 2014 Apr 12. **IF 2.367**

Uhlík J, Šimůnková P, Žaloudíková M, **Partlová S**, Jarkovský J, Vajner L. *Airway wall remodeling in young and adults rats with experimentally provoked bronchial asthma*. **Int Arch Allergy Immunol**. 2014 ;164(4):289-300. doi: 10.1159/000366278. Epub 2014 Sep 16 **IF 2.667**

Thomas Condamine, George A. Dominguez , Je-In Youn, Andrew V. Kossenkov, Sridevi Mony, Kevin Alicea-Torres, Evgenii Tcyganov, Ayumi Hashimoto, Yulia Nefedova, Cindy Lin, **Simona Partlova**, Alfred Garfall, Dan T. Vogl, Xiaowei Xu, Stella C. Knight, George Malietzis, Gui Han Lee, Evgeniy Eruslanov, Steven M. Albelda, Xianwei Wang, Jawahar L. Mehta, Meenakshi Bewtra, Anil Rustgi, Neil Hockstein, Robert Witt , Gregory Masters, Brian Nam, Denis Smirnov, Manuel A. Sepulveda, and Dmitry I. Gabrilovich. *Lectin-type oxidized LDL receptor 1 distinguishes population of human polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in cancer patients*. **Science Immunology** 05 Aug 2016: Vol. 1, Issue 2, pp. aaf8943 DOI: 10.1126/sciimmunol.aaf8943

Publikace v domácím tisku:

Simona Partlová, Jan Bouček, Kamila Kloudová, Radek Špišek, Anna Fialová. *Imunitní systém u pacientů s nádory hlavy a krku*. **Klinická onkologie**. 2015