

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

BIOLOGIE

FYZIOLOGIE BUŇKY



Bc. Zuzana Paračková

**Vplyv chemoterapie na expresiu imunoregulačných génov v
mikroprostredí nádorov**

**Impacts of chemotherapy on immunoregulatory gene
expression in the tumor microenvironment**

Diplomová práca

Školiteľ: RNDr. Milan Reiniš, CSc.

Praha 2013

Prehlásenie

Prehlasujem, že som záverečnú prácu vypracovala samostatne a že som uviedla všetky použité informačné zdroje a literatúru. Táto práca ani jej podstatná časť nebola predložená k získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu.

V Prahe,

Podpis

Podakovanie

Touto cestou by som sa chcela poďakovať svojmu školiteľovi RNDr. Milanovi Reinišovi, CSc. za odborné vedenie behom vypracovávaní tejto diplomovej práce. Tiež by som sa chcela poďakovať MUDr. Romane Mikyškovej, PhD. a RNDr. Márii Indrovej, CSc. za cenné rady a pomoc pri *in vivo* experimentoch a Ing. Jane Bieblovej za pomoc pri FACS analýze. A samozrejme celému tímu Oddelenia nádorovej imunologie za pomoc.

Moje osobné poďakovanie patrí mojej rodine a priateľom za ich podporu, pomoc a rady počas celého môjho štúdia.

Obsah

1.	Abstrakt.....	7
2.	Abstract.....	8
3.	Zoznam použitých skratiek.....	9
4.	Úvod.....	11
5.	Literárny prehľad.....	12
5.1.	Hypotéza o imunitnom dozore.....	12
5.2.	Mechanizmy únikov nádorov	13
5.3.	Úloha mikroprostredia nádoru.....	14
5.3.1.	Imunocyty v mikroprostredí nádorov a ich úloha pri progresii nádorov..	15
5.3.1.1.	Myeloidné supresorové bunky (MDSC)	16
5.3.1.2.	Makrofágy (MF).....	19
5.3.1.3.	CD8 ⁺ T lymfocyty.....	22
5.3.1.4.	CD4 ⁺ T lymfocyty.....	22
5.3.1.5.	Natural killer bunky (NK).....	22
5.3.1.6.	T regulačné lymfocyty (Treg).....	23
5.3.1.7.	Th17 lymfocyty	24
5.3.1.8.	Dendritické bunky (DC)	24
5.4.	Nádorová terapia.....	25
5.3.2.	Použitá chemoterapia	25
5.3.2.1.	5-azacytidín (5AC).....	25
5.3.2.2.	Cyklofosfamid (CY).....	28
6.	Ciele práce.....	29
7.	Materiál a metódy.....	30

7.1.	Myši.....	30
7.2.	Bunkové línie.....	30
7.3.	Práca s bunkovými líniami.....	30
7.3.1.	Kultivácia buniek.....	30
7.3.2.	Počítanie buniek.....	31
7.3.3.	Zamrazovanie buniek.....	31
7.3.4.	Rozmrazovanie buniek.....	31
7.4.	<i>In vivo</i> experimenty.....	31
7.4.1.	Transplantácia nádorových buniek.....	31
7.4.2.	Chemoterapia.....	31
7.4.3.	Meranie veľkosti nádorov.....	32
7.4.4.	Odstránenie nádorov.....	32
7.4.5.	Homogenizácia nádorov pre prietokovú cytometriu.....	32
7.4.6.	Magnetická separácia.....	33
7.4.7.	Prietoková cytometria.....	33
7.4.8.	Homogenizácia tkaniva pre RNA izoláciu.....	34
7.4.9.	Izolácia a purifikácia RNA.....	34
7.4.10.	Reverzná transkripcia.....	34
7.4.11.	Kvantitatívna PCR (qPCR).....	35
7.5.	Zloženie médií a roztokov.....	36
8.	Výsledky.....	38
8.1.	Relatívna zmena expresie vybraných imunosupresorových génov počas rastu nádorov.....	38
8.2.	Vplyv epigenetickej liečby 5-azacytidínom na mikroprostredie nádorov.....	41

8.2.1. Vplyv epigenetickej liečby 5-azacytidínom na mikroprostredie nádorov TRAM-C2.....	41
8.2.2. Vplyv epigenetickej liečby 5-azacytidínom na mikroprostredie nádorov TC-1/A9.....	46
8.3. Vplyv CY a kombinovanej terapie na mikroprostredie nádorov.....	50
8.3.1. Vplyv CY a kombinovanej terapie CY+5AC na mikroprostredie nádorov TRAMP-C2.....	50
8.3.2. Vplyv CY a kombinovanej terapie CY+AC na mikroprostredie nádorov TC-1/A9.....	55
9. Diskusia.....	60
10. Záver.....	64
11. Zoznam použitej literatúry.....	65
12. Prílohy.....	75

1. Abstrakt

Mikroprostredie nádoru je miesto, kde mnohokrát prevládajú lokálne imunosupresorové účinky a kde je aktívne bránené imunitnému systému vykonávať svoje fyziologické funkcie. Medzi mnohými bunkovými typmi majú významnú úlohu bunky imunitného systému infiltrujúce mikroprostredie, keďže produkujú veľké množstvo faktorov potláčajúcich imunitnú odpoveď. V našej práci boli imunologické zmeny v priebehu rastu a chemoterapie nádorov monitorované v mikroprostredí nádoru dvoma spôsobmi, analýzou zastúpenia a fenotypu jednotlivých populácií imunocytov a ďalej analýzou celkovej úrovne expsie vybraných génov, ktoré sú spojené s imunosupresiou alebo charakteristické pre jednotlivé populácie imunocytov.

Cieľom našej práce bolo u dvoch typov myšacích nádorov TRAMP-C2 a TC-1/A9 zistiť, ako 5-azacytidín (5AC), cytostatikum s epigenetickými účinkami, mení percentuálne zastúpenie leukocytov infiltrujúcich nádor v jeho mikroprostredí a či je to sprevádzané zníženou expresiou imunosupresorových génov. Ďalej nás zaujímal vplyv 5AC na nádory, ktoré boli už liečené cyklofosfamidom (CY), DNA alkylačným činidlom a široko používaným chemoterapeutikom pri terapii nádorov. CY vo vyšších dávkach potláča imunitné reakcie tiež tým, že indukuje akumuláciu myeloidných supresorových buniek (MDSC). Okrem percentuálneho zastúpenia TIL a zmeny relatívnej expsie vybraných imunosupresorových génov, zamerali sme sa aj na zmeny relatívnej expsie génov kódujúcich znaky lymfoidnej línie a ďalšie imunoregulačné gény pre cytokíny IL-6, IL-10, IL-12, IL-4 a IFN γ v mikroprostredí týchto nádorových modeloch.

5AC významne spomaľoval rast etablovaných TRAMP-C2 nádorov, zatiaľ čo u TC-1/A9 nebol tento efekt pozorovaný. U oboch nádoroch došlo k výraznému zníženiu relatívnej expsie imunosupresorových génov pre ARG-1, iNOS, ROS a došlo aj k zníženiu percentuálneho zastúpenia MDSC v mikroprostredí oboch typov nádorov. Kombinovaná terapia CY spolu s 5AC výrazne spomalila rast TRAMP-C2 i TC-1/A9 nádorov. Po liečení samotným CY dochádzalo k zvýšenej akumulácii MDSC a dendritických buniek. U TC-1/A9 nádoroch bola pozorovaná aj zvýšená akumulácia nádor-infiltrujúcich makrofágov. Zvýšená akumulácia bola sprevádzaná zvýšením relatívnej expsie imunosupresorových génov pre ARG-1, iNOS a ROS. Pri následnom opakovanom podaní 5AC po CY liečbe, došlo k potlačeniu tohto účinku, čo sa prejavilo nižšou akumuláciou myeloidných supresorových buniek a zníženou relatívnou expresiou imunosupresorových génov.

Kľúčové slová: nádorové mikroprostredie, imunosupresia, 5-azacytidín, cyklofosfamid, nádorová terapia

2. Abstract

Tumor microenvironment is an area, where the local immunosuppressive effects dominate and prevents the immune system to perform its physiological functions. The cells infiltrating the microenvironment have an important function among many cell types since they produce a large quantity of factors suppressing the immune response. In our work, we monitored the immune changes in the microenvironment during tumor growth and chemotherapy. For these purposes, we utilized the methods for analysis of the proportion and phenotype of the distinct populations of immunocytes and for analysis of the total level of expressions of selected genes associated with immunosuppression or with distinct populations of immunocytes.

The aim of our work was to discover, using two types of mouse tumors (TRAMP-C2 and TC-1/A9), how 5-azacytidine (5AC), a cytostatic drug with epigenetic activity, affects the proportion of leukocytes infiltrating the tumor microenvironment and, further, whether these changes are accompanied by decreased expression of immunosuppressing genes. In addition, we have also focused on the changes of relative expression of genes encoding markers of lymphoid lines and, on other immunoregulating genes, encoding IL-6, IL-10, IL-12, IL-4 and IFN γ cytokines, in the microenvironment of these tumors.

Furthermore, we were interested in the effects of 5AC on tumors pretreated with the cyclophosphamide (CY), a DNA alkylating agent widely used in the treatment of tumors. A higher dose of CY suppressed the immune reaction by inducing accumulation of myeloid-derived suppressor cells (MDSC). It has been found that 5AC significantly suppressed the growth of established TRAMP-C2 tumors, while this effect was not noticed on TC-1/A9. The relative expression of immunosuppressed genes for ARG-1, iNOS, ROS and percentage of MDSC in microenvironment of both types of tumors was significantly reduced.

Combined therapy with CY and 5AC significantly inhibited growth of both TRAMP-C2 and TC-1/A9 tumors. After the treatment with CY only, accumulation of MDSC and dendritic cells was increased. In TC-1/A9 tumors, increased accumulation of tumor-infiltrating macrophages was also observed. This increased accumulation was associated with the reduction of relative expression of the immunosuppressing genes for ARG-1, iNOS and ROS. Further, subsequent therapy of CY-pretreated mice with repeated 5AC administration, led to lower accumulation of MDSC and reduced the relative expression of immunosuppressive genes.

Keywords: tumor microenvironment, immunosuppression, 5-azacytidine, cyclophosphamide, tumor therapy

3. Zoznam použitých skratiek

5AC	5-azacytidín
AK	aminokyselina
APC	antigen presenting cells
APM	antigen presenting machinery
ARG-1	Argináza-1
C _T	threshold cycle
CTLA-4	Cytotoxic T-lymfocyte-associated protein 4
CY	cyklofosamid
DAC	2'-deoxy-5-azacytín
DC	dendritic cells
DNMT	DNA metyltransferázy
EGF	Epidermal growth factor
EL	efektorové lymfocyty
ELISPOT	The Enzyme-linked immunosorbent spot
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FGF	Fibroblast growth factor
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HIF	Hypoxia inducible factor
IDO	indolamín-2,3-dioxygenáza
IL	Interleukin
IFN γ	Interferon γ
IMC	immature myeloid cells
iNOS	inducibilná NO syntháza
IS	imunitný systém
LPS	lipopolysacharid
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MACS	magnetic-activated cell sorting
MDSC	myeloid-derived suppressor cells
MF	makrofágy
MHC	Major Histocompatibility complex
MMP	matrix metaloproteinázy
NK	natural killer cells
PBS	phosphate buffered saline

PCR	polymerase chain reaction
ROS	reactive oxygen species
RT-PCR	real-time PCR
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TA-DC	tumor-associated dendritic cells
TAA	tumor-associated antigens
TAM	tumor-associated macrophages
TCR	T cell receptor
TGF β	Transforming growth factor β
Th	T helper cells
TIL	tumor- infiltrating leukocytes
TNF α	Tumor necrosis factor α
Treg	T regulatory lymphocytes
VEGF	Vascular-endothelial growth factor

4. Úvod

Nádory počas svojho rastu vytvárajú mikroprostredie, zložené z rôznych bunkových typov. V mikroprostredí sa nachádzajú fibroblasty, vaskulárne bunky hladkého svalstva, endoteliálne bunky, epiteliálne bunky či imunocyty. Často má imunosupresorové účinky aj vďaka privolaným bunkám imunitného systému organizmu. Na tomto mieste dochádza k donúteniu vlastného imunitného systému, aby aktívne potláčal imunitnú odpoveď rôznymi spôsobmi ako je uvoľňovanie inhibičných cytokínov, zmeny v prezentácii antigénov, nedostatočná expresia kostimulačných molekúl či privolanie regulačných a supresorových buniek. Tieto mechanizmy a mnohé ďalšie podporujú ďalší rast a prosperitu nádoru (Whiteside, 2010).

Väčšina bunkových typov infiltrujúcich nádor je schopných protinádorovej odpovede, no v skutočnosti sú zotročené nádorovými bunkami a ich produktmi k podpore ich rastu a invazivite. Následne samé uvoľňujú do mikroprostredia faktory spôsobujúce napríklad privolanie T regulačných lymfocytov (Treg) či nedostatočnú aktiváciu efektorových T lymfocytov prípadne ich apoptózu. Výraznú úlohu majú populácie, ktoré sú špecializované na umlčanie imunitnej odpovede. Ide o Treg (Woo et al., 2001), myeloidné supresorové bunky (MDSC) (Serafini et al., 2006), nádorové makrofágy (TAM) (Martinez et al., 2008) a nádorové dendritické bunky (TA-DC) (Curiel et al., 2004). Mechanizmy ich účinkov sú rôzne. Môže ísť o priamy bunkový kontakt, produkciu inhibičných cytokínov ako je IL-10 či TGF β (Martinez et al., 2008; Strauss et al., 2007). Ďalej majú svoj význam aj uvoľňované enzýmy zapojené v metabolizme aminokyselín potrebných pre aktiváciu T lymfocytov alebo zvýšená produkcia voľných kyslíkových radikálov (Nefedova et al., 2007).

Lepšie porozumenie týmto mechanizmom a vzťahom medzi nádormi a imunitným systémom sa stáva veľmi dôležitým a môže viesť k vývoju nádejnejším terapeutickým stratégiám (Albini and Sporn, 2007). Tieto stratégie sa pravdepodobne budú zameriavať na kombináciu viacerých aspektov, na obnovu protinádorových imunitných odpovediach, zabránenie úniku nádorom pred imunitným systémom a náprave nádorom indukovanej supresii, aby bolo umožnené viac efektívne kontrolovať rast nádoru (Whiteside, 2008).

V prvej časti práce sa venujeme zmene expresie vybraných imunosupresorových génov v mikroprostredí nádorov v priebehu ich rastu na dvoch typoch myšacích nádorov TC-1/A9 a TRAMP-C2. V druhej časti sa venujeme 5-azacytidínu, cytostatiku s epigenetickými účinkami a jeho vplyvu na mikroprostredie u týchto dvoch typov nádorov. Tretia časť je venovaná vplyvu 5-azacytidínu na nádory liečené cyklofosfamidom, čo je bežne využívané chemoterapeutikum, ktoré pri vyšších dávkach má imunosupresorové účinky. Zaujímala nás zmena percentuálneho zastúpenia jednotlivých populácií nádor-infiltrujúcich imunocytov a zmena relatívnej expresie vybraných génov exprimovaných v mikroprostredí počas terapie.

5. Literárny prehľad

5.1 Hypotéza o imunitnom dozore

Už v 19. storočí Rudolf Virchow poukázal na prítomnosť leukocytov v neoplazmatických tkanivách a spojitosť medzi zápalom a rakovinou. R. Virchow navrhol, že infiltrát leukocytov poukazuje na vznik a rozvoj rakoviny v oblastiach s chronickými zápalovými podmienkami (Virchow, 1863). Mikroprostredie rastúceho nádoru vytvára podmienky podobné chronickému zápalu, ktoré začínajú najprv ischémiou spojenou s intersticiálnym opuchom, objavením sa buniek imunitného systému. Nasleduje nárast krvných ciev a oprava tkaniva (Aller et al., 2004; Balkwill and Mantovani, 2001). Hypotézu, že existuje proces, pri ktorom sú nádorové bunky ničené bunkami imunitného systému (IS) organizmu predikoval v roku 1909 Paul Ehrlich a o približne 50 rokov neskôr vedci F. Macfarlane Burnet a Lewis Thomas tento proces pomenovali ako imunitný dozor. Ide o predpoklad, že rozpoznanie a zničenie klonov transformovaných buniek je fyziologickou funkciou imunitného systému, ktorá sa musí uplatniť skôr ako malígne bunky vytvoria životu nebezpečný nádor. Transformované bunky sú rozpoznávané prostredníctvom svojich povrchových antigénov a následne eliminované imunitným systémom (Dunn et al., 2002). Trvalo niekoľko dekád, kým mohol byť tento predpoklad podporený. Pomohli tomu nové poznatky o vrodenej a adaptívnej imunite a boli pripravené knock-out myši s kombinovanými imunodeficienciami (Shankaran et al., 2001; Shinkai et al., 1992).

Zistenie, že imunitný systém má svoju úlohu pri rozpoznaní, ale aj vzniku, rozvoji, úniku primárnych nádorov viedlo k vytvoreniu konceptu o imunoeditácii nádorov, ktorý obsérnejšie popisuje vzťahy medzi nádormi a imunitným systémom. Opisuje nielen obranné účinky IS organizmu pred rakovinovým bujnením, ale aj tie nežiaduce spôsobujúce prežívanie, či dokonca aj lepší rozvoj nádorov. Ide o dynamický proces, zložený z troch fáz – eliminácia, rovnováha a únik. Práve fáza úniku predstavuje rôzne stratégie ako sa nádory stávajú nedetegovateľnými pre IS. V niektorých prípadoch je IS donútený spolupracovať a spolupodieľať sa na rozvoji nádoru (Dunn et al., 2002). K daným stratégiám patrí strata nádorových antigénov, sekrécia inhibičných cytokínov alebo zníženie expresie molekúl MHC (Major Histocompatibility Complex). Takže nedostatočná prezentácia povrchových antigénov s nedostatočnou kostimuláciou navodzuje imunitnú toleranciu (Stewart and Abrams, 2008).

Nádorové bunky môžu uniknúť IS dvoma spôsobmi – imunoselekciou, čiže výberom neimunogénnych možností transformovaných buniek alebo imunosupresiou imunitnej odpovede (Hanahan and Weinberg, 2011; Swann and Smyth, 2007).

5.2 Mechanizmy úniku nádorov

Mikroprostredie nádorov predstavuje efektívnu bariéru pred funkciami imunitného systému. Je to z dôvodu, že nádory nie sú len pasívnym cieľom hostiteľského imunitného systému. Práve naopak, aktívne regulujú fázy protinádorových imunitných odpovedí, využívajúc pritom celé spektrum rôznych stratégií a mechanizmov. Bolo identifikovaných mnoho spôsobov zodpovedných za dysfunkciu imunocytov v mikroprostredí. Niektoré sú priamo mediované faktormi produkovanými nádormi, kým iné sú výsledkom zmien normálnych tkanív po objavení sa rakovinových buniek. Nižšie je uvedený prehľad daných mechanizmov. (Prehľad prevzatý z Whiteside, 2008) .

Prehľad mechanizmov podieľajúcich sa na úniku pred imunitným systémom

A: Zásah do indukcie protinádorovej odpovede

1. Znížená expresia kostimulačných molekúl na nádoroch alebo APC (antigen presenting cells)
2. Zmeny TCR (T cell receptor) signalizácie v TIL (tumor-infiltrating leukocytes)
3. Expresia receptoru smrti/ ligandu na nádorových bunkách
4. Dysfunkcia DC (dendritic cells) a neadekvátna krížová prezentácia TAA (tumor-associated antigens) T lymfocytom
5. Apoptóza DC v nádorom mikroprostredí

B: Neadekvátna funkcia efektorových buniek v mikroprostredí nádorov

1. Potlačenie T bunkovej odpovede vďaka Treg
2. Potlačenie imunitnej odpovede imunocytov vďaka MDSC
3. Apoptóza efektorových T buniek v nádoroch a na perifériách
4. Mikrovezikuly (MV, exozómy) uvoľňované ľudskými nádormi a indukcia apoptózy CD8⁺ buniek

C: Nedostatočné rozoznávajúce signály

1. Zníženie expresie povrchovej expresie molekúl MHC na nádorových bunkách
2. Zníženie expresie povrchových TAA na nádorových bunkách
3. Zmeny v expresii molekúl APM (antigen presenting machinery) komponent v nádorových bunkách alebo na APC
4. Potlačenie aktivity NK buniek (Natural Killer) buniek v mikroprostredí

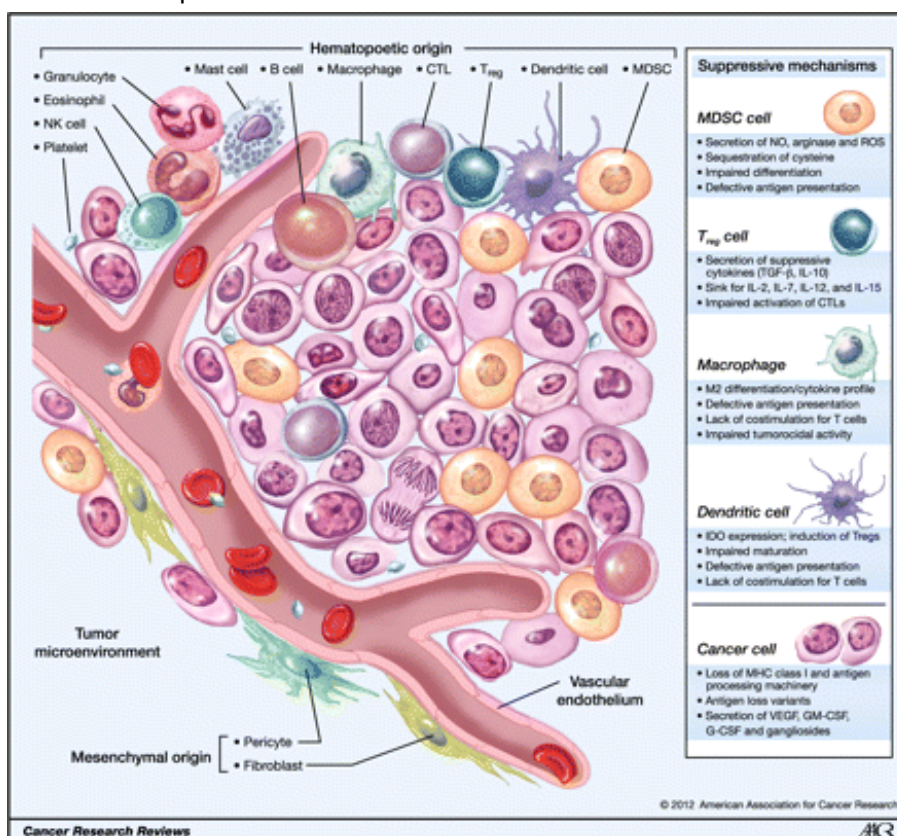
D: Rozvoj imunorezistencie nádoru

1. Nedostatočná citlivosť ku efektorovým bunkám
2. Výber rezistentných variant
3. Nádorové kmeňové bunky

5.3 Úloha mikroprostredia nádoru

Počas rastu nádoru sa vytvára mikroprostredie (Obr.1), ktoré infiltruje množstvo buniek s rôznymi funkciami. Nachádzame tu efektorové bunky, schopné eliminovať nádory. Prítomné sú aj bunky s regulačnými alebo supresorovými funkciami. MDSC, TAM, Treg a celá škála rozpustných faktorov a cytokínov predstavujú kľúčovú zložku v podpore vývoja nádorov. Záleží na vzájomnom pomere protinádorových a pronádorových účinkov (Zamarron and Chen, 2011).

Obr. 1: Nádorové mikroprostredie



Počas rastu nádoru sa ustanovuje mikroprostredie zložené zo širokej škály buniek vrátane buniek imunitného systému, ktoré spolupracujú spolu s nádorovou strómou na nádorovej progresii. Tieto bunky spolu formujú komplexnú regulačnú sieť interakcií, ktorá umožňuje nádoru vyhnúť sa eliminácii.

Obr. prevzatý z (Kerker and Restifo, 2012).

Nádorové mikroprostredie je vytvárané prevládajúcimi bunkami nádoru, ktoré vytvárajú špecifické interakcie so susednými bunkami, aby podporovali progresiu nádoru a metastázovanie. V stróme sa nachádzajú rôzne typy buniek – fibroblasty, vaskulárne bunky hladkého svalstva, endoteliálne bunky, epiteliálne bunky či bunky imunitného systému. Tieto bunky zahŕňajú efekторы oboch typov imunity, adaptívnej a to T- aj B-lymfocyty a imunity vrodenej, kde patria makrofágy (MF), dendritické bunky, polymorfonukleárne bunky a NK bunky. Je to miesto, kde si nádorové bunky prispôbujú podmienky k neoplazmatickým procesom, podpore proliferácie, prežívania či migrácie a vytvorená sieť bunkových a molekulárnych interakcií napomáha ich progresii (Whiteside, 2008).

Nielenže nádory prežívajú a rozširujú sa, ale dokážu aj napodobňovať niektoré signálne dráhy imunitného systému. Tým vytvárajú ďalšie podmienky, ktoré podporujú nádory v prežívaní a nastoľujú nádorovú imunitnú toleranciu a tak unikajú imunitnému systému (Zou, 2005).

Infiltráty imunitných buniek sa síce líšia vo veľkosti a zložení od nádora k nádoru, ale ich prítomnosť je dôkazom, že hostiteľský organizmus nie je nevnímový k vyvíjajúcemu sa nádoru. Práve naopak, snaží sa zasahovať do jeho progresie. Na jednej strane je prítomnosť týchto buniek považovaná za snahu hostiteľa o rozpoznanie týchto buniek, čo umožní ich následnú elimináciu (Zitvogel et al., 2006). Skutočne, mnoho prác potvrdzuje, že prítomnosť zápalových infiltrátov v nádoroch koreluje s lepšou prognózou stavu. Avšak spontánne vyliečenie je raritou (Baxevanis et al., 1994; Kornstein et al., 1983; Pages et al., 2005). Na strane druhej, porovnateľné množstvo prác uvádza nedostatok výrazných korelácií medzi lymfocytárnou infiltráciou a dobrou prognózou (Sheu et al., 1999; Stewart and Tsai, 1993). Tieto rozporuplné výsledky zostali nevysvetlené niekoľko rokov, až kým sa nezačali skúmať funkčné vlastnosti nádor-infiltrujúcich leukocytov (TIL) (Mihm et al., 1996). V takmer všetkých prípadoch, TIL získané z nádorového tkaniva vykazujú inhibovanú proliferáciu, zníženú úroveň signalizácie cez T-receptor a zníženú schopnosť cytotoxicity voči nádorom a schopnosť produkovať cytokíny typu Th1 (pomocné T lymfocyty 1. typu) po stimulácii (Kiessling et al., 1996; Kuss et al., 1999; Uzzo et al., 1999).

Z faktu, že funkčný status TIL výrazne koreluje s prognózou a prežívaním pacientov s rakovinou vyplýva, že porozumenie úlohe mikroprostredia pri vytváraní špecifických interakcií má význam a môže priniesť terapeutické benefity (Pages et al., 2005).

5.3.1 Imunocyty v mikroprostredí nádoru a ich úloha pri progresii nádorov

Nádorové mikroprostredie je v súčasnej dobe považované za jedného z kľúčových hráčov pri vývoji nádorov a úloha jednotlivých populácií starostlivo skúmaná. Porozumenie interakciám

v okolí nádorov by mohlo priniesť terapeutické využitie v budúcnosti (Benencia et al., 2012). Nižšie uvádzam prehľad jednotlivých populácií najčastejšie nachádzaných v mikroprostredí nádorov.

5.3.1.1 Myeloidné supresorové bunky (MDSC)

V 80-tych rokoch bola popísaná nová bunková línia, známa ako prirodzené supresorové bunky odlišné od T a NK buniek (Maier et al., 1989; Strober, 1984). Je to heterogénna populácia skladajúca sa z myeloidných prekursorov a nematurovaných myeloidných buniek (IMC). Neskôr boli definované ako myeloidné supresorové bunky (myeloid derived suppressor cells) kvôli ich schopnosti potláčať imunitnú odpoveď (Bronte et al., 2000; Bronte et al., 1998). U myši dochádza k ich akumulácii pri rozvoji patologických stavov ako sú infekcie (Marshall et al., 2001), chronický zápal, po podaní cyklofosfamidu, pri nádorovom bujnení, reakcie štepu proti hostiteľovi (Bobe et al., 1999; Highfill et al., 2010) alebo po stimulácii superantigénmi ako je napríklad stafylokokový endotoxín A (Cauley et al., 2000). U zdravých jedincov sú IMC produkované v kostnej dreni. Rýchlo diferencujú do zrelých granulocytov, makrofágov a DC. Naopak pri patologických podmienkach ako je napríklad prítomnosť nádoru dochádza k čiastočnému bloku v diferenciácii a k ich následnému rozšíreniu. MDSC tak môžeme nájsť v kostnej dreni, slezine a v mikroprostredí nádorov (Gabrilovich, 2009).

MDSC u myši sú charakterizované expresiou typických povrchových znakov myeloidných buniek ako sú Gr-1 (Ly6G a Ly6C) a CD11b (Bronte et al., 1998) a expresiou povrchových znakov nezrelých štádií – CD31 (Bronte et al., 2000). V prítomnosti vhodných rastových faktorov (IL-4, GM-CSF, TNF α + GM-CSF) môžu MDSC diferencovať na efektívne antigen- prezentujúce bunky. Pod vplyvom týchto cytokínov dochádza k zvýšeniu expresie kostimulačných molekúl a molekúl MHC II. triedy, takže môžu dozrievať na funkčné makrofágy alebo dendritické bunky (Bronte et al., 2000; Li et al., 2004).

Zápal navodzuje produkciu a akumuláciu MDSC, ktoré sú schopné blokovať CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocyty, tým blokovať imunitnú odpoveď a viesť k nádorovému bujneniu. Nádorové bunky sekretujú širokú škálu cytokínov, umožňujúcich prilákanie MDSC do lymfoidných orgánov a do periférnej krvi, čím usmerňujú ich špecializáciu na supresorové bunky (Kusmartsev et al., 2003). Príklad toho ako zápal dokáže kontrolovať MDSC príchod, je dobre ilustrovaný pri redukcii zápalového potenciálu v IL-1R^{-/-} myši, kde nedochádza ku akumulácii MDSC ani k následnej redukcii nádoru a šíreniu metastáz (Bunt et al., 2007).

Existujú dve podskupiny MDSC. Monocytická, s fenotypom CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C^{High} a granulocytická, ktorá má fenotyp CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{+/+} (Movahedi et al., 2008; Youn et al., 2008). Ďalšie povrchové znaky sú CD 80 (Mencacci et al., 2002), CD115 (Huang et al., 2006), CD16

(Marshall et al., 2001). Taktiež exprimujú molekuly MHC I. triedy, ale nie MHC II. triedy (Gabrilovich et al., 2001).

Ako už ich názov predpovedá, MDSC dokážu potláčať imunitnú odpoveď (Obr.2). Aktivované MDSC kontrolujú odpoveď T buniek dvoma enzýmami zapojenými v metabolizme L-arginínu a to inducibilnú NO syntázu (iNOS), ktorá ho metabolizuje na NO a L-citrulín (Kusmartsev et al., 2000) a arginázu (ARG-1), ktorá ochudobňuje prostredie o arginín tým, že ho premieňa na močovinu a L-ornitín (Mills et al., 1992). Následkom toho, že T bunky prídu o L-arginín z prostredia, dochádza k inhibícii ich proliferácie rôznymi mechanizmami. Patrí medzi ne zníženie expresie génu pre CD3 ζ reťazec TCR, čím je zabránené bunkám prenášať signály potrebné pre aktiváciu, inhibícia cyklinu D3 a zvýšená regulácia cyklin-dependentnej kinázy 4 (Highfill et al., 2010; Rodriguez et al., 2007). Ďalším významným následkom aktivity ARG-1 je indukcia a rozšírenie prirodzených T regulačných buniek (Serafini et al., 2008). Podstatný je aj mechanizmus, ktorý zahŕňa iNOS a NO produkciu. Tým dochádza k inhibícii STAT5 a JAK3 a tým následnej inhibícii expresie MHC II a indukcie apoptózy T buniek. Tieto enzýmy môžu spolupracovať. Keď ARG-1 odstráni z mikroprostredia L-arginín, iNOS generuje super oxidy a NO, ktoré reagujú za vznikli veľmi silných oxidantov, peroxynitrátov. Ich vysoké hladiny spôsobujú nitráciu TCR a CD8 molekúl na T bunkách a týmto nedokážu odpovedať na antigénnu stimuláciu (Gabrilovich and Nagaraj, 2009; Nagaraj et al., 2007). Tento spôsob supresie zdieľajú MDSC spolu so supresorovými makrofágmi (Harari and Liao, 2004; Jia et al., 2010). Expresia týchto dvoch enzýmov na vysokých úrovniach je spúšťaná vystavením MDSC špecifickým cytokínom, Th2 cytokínom TGF β a IL-10 pre ARG-1 a Th1 cytokíny IFN γ , IL-1 IFN α pre iNOS (Mazzoni et al., 2002; Ochoa et al., 2007).

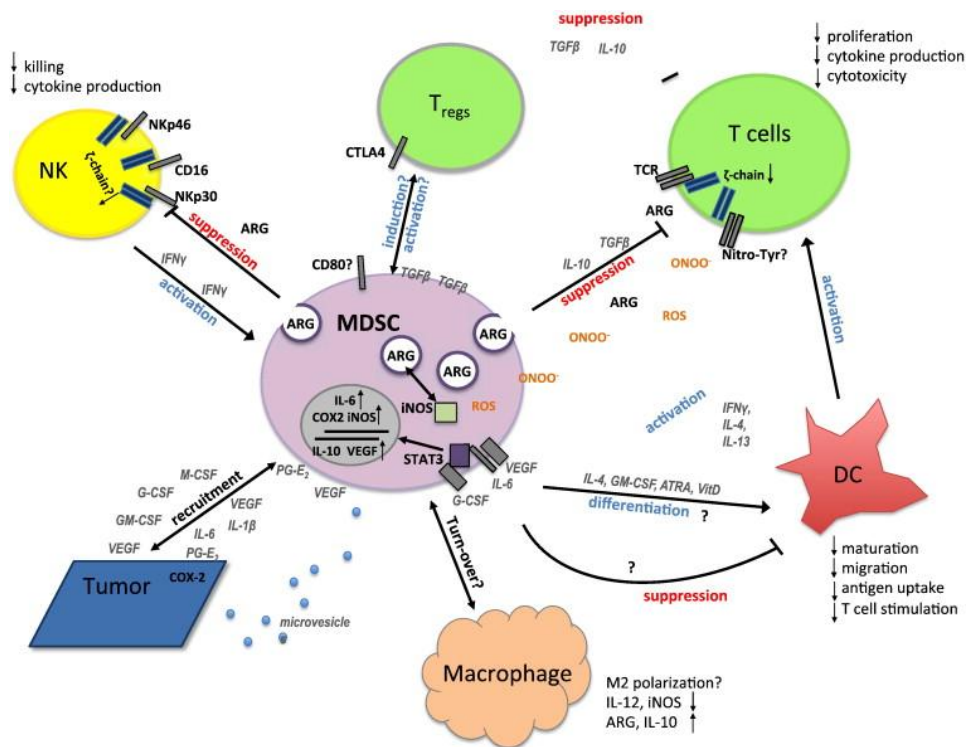
Ďalší mechanizmus potlačania imunitnej odpovede je nezávislý na L-arginíne. Ide o produkciu reaktívnych kyslíkových radikálov (ROS), TGF β (Transforming growth factor β) produkciu či cysteínovú depleciu (Ostrand-Rosenberg and Sinha, 2009). ROS sú produkované enzýmom NADPH oxidáza, ktorá je prítomná vo všetkých fagocytujúcich bunkách a nevyhnutná pre ich funkciu (Nefedova et al., 2007). ROS, podobne ako peroxynitráty tiež pôsobia ako katalyzátor nitrácie TCR a tým zabraňujú rozoznávať príslušné molekuly MHC (Nagaraj et al., 2007). TGF β , ktorý je produkovaný aj MDSC sa spolupodieľa na zvýšenej produkcii ROS týmito bunkami (Sauer et al., 2001). ROS sú vo fagocytujúcich bunkách produkované NADPH oxidázou. Transmembránová časť tohto enzýmu je označovaná ako cytochróm b-245 (CYBB) (<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/CYBB>). V našej práci sa venujeme relatívnej expresii tejto podjednotky, ktorú uvádzam pod názvom ROS.

Podobne ako L-arginín, MDSC odstraňujú z prostredia aj cysteín, esenciálnu aminokyselinu pre aktiváciu T buniek, ktoré sú závislé na extracelulárnych zdrojoch, pretože nemajú dostatok enzýmov schopných konvertovať metionín na cysteín a zároveň nedisponujú membránovým transportérom, ktorý importuje cystín pre intracelulárnu redukciu na cysteín. Ani

MDSC nie sú schopné generovať cysteín z metionínu, čiže je vyžadovaný transport cystínu pre intracelulárnu premenu na cysteín. APC, hlavne DC a makrofágy, slúžia ako rezervoár cysteínu pre T bunky. Syntetizujú ho z metionínu a exportujú počas antigénnej prezentácie T lymfocytom pre ich výživu. Ibaže prítomnosť MDSC vo vysokých koncentráciách, spôsobí import väčšinu voľného cystínu, čím dochádza k jeho nedostupnosti pre APC. Výsledkom je zastavenie exportu cysteínu, kvôli čomu T bunky nemôžu syntetizovať proteíny potrebné pre ich aktiváciu (Srivastava et al., 2010).

Imunoregulačný enzým indolamín-2,3-dioxygenáza (IDO) je enzým, ktorý degraduje tryptofán a tým ho odstraňuje z lokálneho prostredia. Táto strata tryptofánu reguluje proliferáciu a prežívanie T lymfocytov *in vitro* a *in vivo*, čo je dôležitý mechanizmus nastoľovania tolerance (Mellor and Munn, 1999; Munn et al., 1999). Nadprodukcia IDO môže byť silne imunosupresorová. Spomínaný tryptofán-degradujúci proteín je produkovaný nádorovými bunkami samotnými a zároveň aj infiltrujúcimi bunkami ako odpoveď na prítomnosť nádorov. Medzi ne patria DC, makrofágy či eosinofily (Mellor and Munn, 2004; Odemuyiwa et al., 2004). Expresia imunitnými bunkami je regulovaná a indukovaná rozličnými stimulmi ako sú cytokíny (IFN γ , IFN α), bakteriálne antigény a kostimulačné molekuly (Munn, 2006).

Obr.2: Mechanizmus účinkov MDSC



Model funkcie MDSC u pacientov s rakovinou. Podstatné mechanizmy, ktoré ešte boli potvrdené zatiaľ len na myšiacich modeloch, ale nie na ľuďoch, sú označené otáznikom. Obr. prevzatý z (Poschke and Kiessling, 2012).

Medzi imunosupresorové účinky sprostredkované MDSC, ktoré majú vplyv na adaptívnu nádorovú imunitu patrí aj polarizácia T lymfocytov smerom k Th2 fenotypu, ktorá prispieva k rozvoji nádorov. MDSC konajú prostredníctvom produkcie IL-10 a zníženou reguláciou cytokínu typu Th1 IL-12, ktorý produkujú makrofágy. Ide o cyklus pozitívnej spätnej väzby, kde takto ovplyvnené makrofágy navodzujú produkciu IL-10 v MDSC (Sinha et al., 2007).

Supresorové účinky MDSC sa vzťahujú aj na iné bunky. Asi najlepšie opísaný mechanizmus je indukcia de novo Treg. Táto indukcia nastáva po priamom kontakte bunka-bunka alebo cez produkciu špecifických solubilných faktorov ako IL-10, TGF β či arginázy (Huang et al., 2006; Li et al., 2009). Štúdie na zvieratách ukázali expresiu CTLA-4 (Cytotoxic T-lymfocyte-associated protein 4) na MDSC ako prerekvizitu pre indukciu Treg (Yang et al., 2006).

MDSC tiež potláčajú aktivitu členov vrodeneho imunitného systému. Inhibujú aktiváciu, cytotoxicitu a expanziu protinádorových NK buniek tým, že zabraňujú produkcii IFN γ týmito bunkami cez bunkový kontakt (Elkabets et al., 2010; Li et al., 2009; Liu et al., 2007).

Medzi účinky MDSC sú zahrnuté aj neimunitné supresorové mechanizmy, ktoré sú priamo potrebné pre samotný vývin a rast nádorov ako je napríklad cievtvorba. MDSC sú aktívne privolávané do nádorového prostredia, kde nielenže uvoľňujú faktory podporujúce formovanie krvného riečiska, ale aj diferencujú do CD31⁺ buniek, ktoré sa inkorporujú do nanovo sformovaného endotelu (Yang et al., 2004). Keď sú nádorové bunky injektované spolu s MDSC, nádory rastú rýchlejšie a majú zvýšenú denzitu ciev a naopak, keď je inhibovaná ich infiltrácia do nádorov, angiogenézia je redukovaná (Yang et al., 2008).

5.3.1.2 Makrofágy (MF)

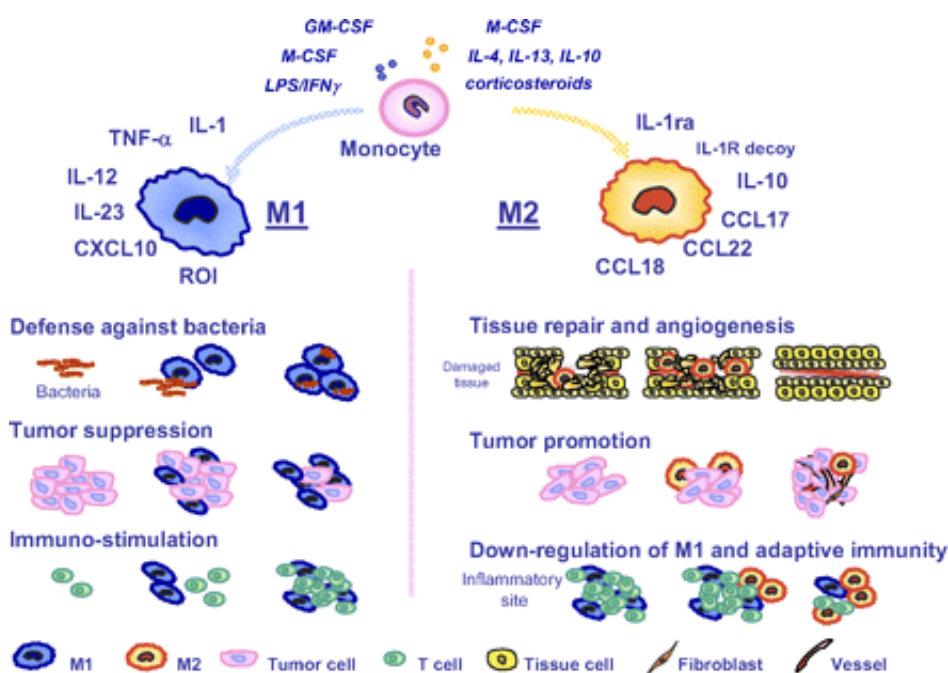
MF sa diferencujú z periférnych krvných monocytov, ktoré sa vyvíjajú z myeloidných progenitórnych buniek. Typická je pre ne heterogénnosť. Majú mnoho subtypov. Záleží na prostredí, v ktorom sa nachádzajú (Obr.3). Zjednodušene sa delia na klasicky aktivované (M1) makrofágy, ktoré diferencujú po stimulácii Th1 cytokínmi a to hlavne IFN γ alebo po vystavení bakteriálnym antigénom. Na druhej strane alternatívne aktivované M2 makrofágy sú stimulované rôznymi stimulmi. Th2 cytokínmi IL-4 alebo IL-23 (M2a), imunokomplexami, LPS, TLR (M2b), IL-10, TGF β alebo glukokortikoidmi (M2c) (Martinez et al., 2009).

M1 sekretujú veľké množstvo prozápalových a imunostimulačných cytokínov (TNF α , IL-1, IL-6, IL-12, IL-23) (Sindrilaru et al., 2011). Taktiež môžu uvoľňovať veľké množstvo enzýmu iNOS, ktorý metabolizuje arginín na NO a citrulín. NO sa môže spolupodieľať na protinádorovej obrane ako jeden z prostriedkov, ktoré MF používajú v boji s parazitmi (Modolell et al., 1995). Produkujú reaktívne kyslíkové radikály (Sauer et al.), dusíkaté intermediáty a môžu mať cytotoxické účinky voči transformovaným bunkám (Gordon and Martinez, 2010). K typickým znakom expresie M2

makrofágov patrí expresia IL-10, ktorá má svoj význam pri nádorovej progresii (Sindrilaru et al., 2011). M2 indukujú expresiu arginázy I, ktorá metabolizuje arginín na L-ornitín a močovinu. Polyamíny odvodené z L-ornitínu sú z jedným výživovým faktorom pre proliferáciu nádorových buniek (Auvinen et al., 1992; Odegaard and Chawla, 2008).

TAM (tumor-associated macrophages), ako dominantná zložka infiltrujúcich leukocytov, majú úlohu v nádorovom raste (Balkwill et al., 2005). Ich úloha je stále kontroverzná. Bolo zistené, že u kolorektálnych karcinómov sú TAMy prozápalové, majú protinádorovú úlohu a ich prítomnosť znamená dobrú prognózu. Exprimujú celý rad prozápalových cytokínov ako sú IFN γ , IL-1, IL-6, ktoré aktivujú Th1 odpoveď (Ong et al., 2012). Na druhej strane u mnohých nádorov sú TAMy považované ako protizápalové a korelujú so horšou prognózou. Epidemiologické štúdie naznačujú, že mikroprostredie bohaté na makrofágy vyvinie agresívny nádor s vysokým potenciálom metastázovať (Nardin and Abastado, 2008).

Obr.3: Polarizácia makrofágov a ich funkcie



MF ako veľmi heterogénna populácia môžu byť schematicky rozdelené na dve hlavné triedy – M1 a M2. Monocyty diferencujú na M1 (klasicky aktivované MF). Produkujú vysoké hladiny IL-12, IL-1, IL-23, TNF α a sú charakteristické cytotoxickou aktivitou. Bojujú proti mikroorganizmom a transformovaným bunkám. Na strane druhej sú M2 MF (alternatívne aktivované), ktoré diferencujú tiež z krvných monocytov za iných podmienok. Uvoľňujú veľké množstvo látok okrem iných cytokín IL-10. M2 zbierajú vzniknutý odpad, sú zapojené v cievtvorbe, remodelácii a oprave zničeného tkaniva. Keď sa nahromadia v nádorovom mikroprostredí, vykonávajú rovnaké funkcie a tým napomáhajú samotnému nádoru. M2 makrofágy kontrolujú zápal, ktorý započínajú M1 makrofágy. Obr. prevzatý z (Solinas et al., 2009).

Makrofágy infiltrujú neoplastické lézie už od skorých štádií tumorigenézy. Bunky nádoru a strómy sekretujú množstvo chemoatraktantov, ktoré prilákajú cirkulujúce monocyty. Na mieste monocyty diferencujú na MF hlavne vďaka prítomnosti M-CSF (macrophage-colony stimulating factor), produkovaného nádorovými bunkami. Tieto MF nadobudnú vlastnosti imunosupresorových, pronádorových efektorov (Smith et al., 1995).

TAM limitujú cytotoxicitu v prostredí okolo nádorov, čo napomáha samotnému nádoru. TAM sú typu M2, ktoré sekretujú veľké množstvo IL-10, ktorý suprimuje cytotoxickú aktivitu T buniek inhibovaním Th1 buniek simultánne s NK bunkami (Guruvayoorappan, 2008). Ďalej IL-10 pôsobí aj autokrinne a suprimuje produkciu IL-12, potenciálneho protinádorového cytokínu (Matsuda et al., 1994). Liečba týmto cytokínom redukuje uvoľňovanie M2-asociované chemokíny a spôsobuje nárast tvorby M1-indukovaných chemokínov (Watkins et al., 2007; Watkins et al., 2009). IL-10 dokáže zároveň inhibovať uvoľnenie IFN γ , cytotoxického faktoru stimulujúceho diferenciáciu T buniek (Wyckoff et al., 2004).

Pôsobenie TAM na mikroprostredie môže spôsobiť aj zvýšenie invazivity buniek. Makrofágy sú pravdepodobne najaktívnejším členom pri remodelácii matrix v okolí nádorov vďaka svojej produkcii MMP (matrix metaloproteinázy) a iných proteolytických enzýmov (Mason and Joyce, 2011). Hagemann a kol. demonštrovali kultiváciou TAM a nádorových buniek zvýšenú expresiu MMP, ktoré degradujú proteíny extracelulárnej matrix a tým napomáhajú metastázovaniu (Hagemann et al., 2004).

TAMy produkujú veľké množstvo rastových a aktivačných faktorov pre nádorové a stromálne bunky ako sú EGF (Epidermal growth factor), FGF (Fibroblast growth factor), VEGF (Vascular endothelial growth factor) a TGF β . Tieto faktory priamo ovplyvňujú proliferáciu nádorových buniek a zvyšujú rezistenciu voči apoptotickým stimulom (Kalluri and Zeisberg, 2006; Mantovani et al., 2008). Taktiež sú zdrojom IL-6, ktorý poskytuje signály pre prežívanie a proliferáciu maligných buniek nádorov epiteliálneho a hematopoetického pôvodu (Grivennikov et al., 2009; Ribatti and Vacca, 2009). IL-6 aktivuje STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) signálnu dráhu. V nádorových bunkách STAT3 indukuje expresiu génov potrebných pre postup bunkovým cyklom (cyklín D) a potlačenie apoptózy (Bcl-XL, Bcl-2) (Liu et al., 2010).

Výrazným spôsobom sa podieľajú na cievtvorbe. TAM sa akumulujú v hypoxických oblastiach nádorov. Keď sa adaptujú na hypoxické mikroprostredie, začnú produkovať rôzne proangiogénne faktory ako sú VEGF, bFGF a glykolytické enzýmy, ktoré sú pod kontrolou transkripčných faktorov HIF-1 a HIF-2 (Guruvayoorappan, 2008).

V závislosti od stupňa aktivácie a od tkáňovej lokalizácie sa líšia expresné znaky na povrchu TAM, preto je náročné ich identifikovať (Hashimoto et al., 2011). Všeobecne môžu byť ľudské aj myšie TAM identifikované prietokovou cytometriou vďaka vysokej expresii CD11b, CD14

a klasických antigénov pre leukocyty a to CD45. Myšacie TAMy sa bežne identifikujú expresiou F4/80, čo je transmembránová molekula neznámej funkcie (Joyce and Pollard, 2009).

Makrofágy sú dobrým cieľom pre biologickú protinádorovú terapiu. V súčasnej dobe sa uvažuje nad odstránením TAM z mikroprostredia, inhibíciou putovania monocytov do nádorov, antianigenéziou či konverziou M2 typu na M1 (Hao et al., 2012).

5.3.1.3 CD8⁺ T lymfocyty

Cytotoxické T bunky predstavujú jeden z najdôležitejších efektorových mechanizmov v protinádorovej obrane (Titu et al., 2002). Rozoznávajú povrchové antigény, ktoré sú na povrchu prezentované pomocou molekúl MHC I. triedy. Po rozpoznaní Ag klonálne proliferujú a diferencujú. Súčasťou diferenciačných procesov je vytvorenie veľkého množstva modifikovaných lyzozómov naplnených perforínom a niekoľkými typmi granzýmov (Loose and Van de Wiele, 2009). Takto aktivované cytotoxické bunky môžu sprostredkovať špecifickú deštrukciu rozpoznaných buniek vypustením lýtických komponentov. Tieto komponenty porušia membránu cieľovej bunky a aktivujú apoptotickú dráhu (Atkinson and Bleackley, 1995).

Aktivita CD8⁺ buniek je obmedzená na prítomnosť molekúl MHC I. triedy, a preto strata expresie týchto molekúl je nepochybne hlavnou únikovou cestou nádorových buniek, vďaka ktorej sa mnoho MHC I. triedy deficientných karcinómov stáva agresívnejšími a invazívnejšími (Levin et al., 1991).

5.3.1.4 CD4⁺ T lymfocyty

Zložka adaptívnej imunity, ktorá má úlohu pri imunitnom dozore. Tieto bunky rozoznávajú ag prezentované na molekulách MHC II. triedy, prítomných na APC. V závislosti na cytokínovom profile sa tieto bunky rozdeľujú na dve podskupiny a to pomocné T bunky 1. typu (Th1) alebo pomocné T bunky 2. typu (Th2). Th1 bunky sú podstatnou podmienkou pre proliferáciu cytotoxických T lymfocytov, nakoľko sú producentmi IL-2, ktorý je nenahraditeľný pre ich aktiváciu. (Loose and Van de Wiele, 2009).

Medzi mnohými faktormi, ktoré produkujú Th1 a CD8⁺ bunky sa javí, že IFN γ je jedným z najvýznamnejších cytokínov, ktoré ochraňujú pred vznikom a brania vývoju rakoviny (Zamarron and Chen, 2011).

5.3.1.5 Natural Killer bunky (NK)

Aktivácia CD8⁺ cytotoxických buniek vyžaduje čas, ktorý poskytuje nádorovým bunkám výhodu a možnosť uniknú tak pred elimináciou. Preto sa uplatňuje zložka vrodenej imunity a to NK

bunky. Tieto bunky nie sú obmedzené na prítomnosť molekúl MHC, čiže ich veľkou prednosťou je fakt, že dokážu eliminovať nádory, ktoré neexprimujú molekúly MHC na svojom povrchu. Tieto molekuly interagujú s ich inhibičnými receptormi, killer cell imunoglobulin-like receptor (KIR) a inaktivujú ich (Lanier, 1997). NK bunky exprimujú na svojom povrchu niekoľko ligandov rodiny TNF (Tumor necrosis factor), vďaka ktorým dokážu indukovať apoptózu v malígnych bunkách, ktoré sú fagocytované dendritickými bunkami a makrofágmi a spracované pre prezentáciu antigénov. Na svojom povrchu konštitutívne exprimujú aj receptor pre IL-2 a preto sú schopné reagovať na stimuláciu prostredníctvom IL-2 zvýšenou cytotoxicitou (Loose and Van de Wiele, 2009).

Strata alebo zníženie expresie molekúl MHC I. triedy prináša karcinómom výhodu v podobe odolnosti voči CD8⁺ bunkám, zároveň sa však stávajú cieľom NK buniek (Gati et al., 2004).

Stále nie je úplne jasné, ako sa darí nádorovým bunkám prežívať selekciu CD8⁺ lymfocytov a NK buniek. Zdá sa, že karcinómové bunky dokážu nájsť rovnováhu medzi prítomnosťou molekúl MHC, tak aby sa vyhli NK cytotoxicite a stratou expresie MHC, čím sa stanú neviditeľnými pre CD8⁺ bunky. Kompletná strata molekúl MHC na svojom povrchu je raritou, čo sa vysvetľuje práve potrebou nádorových buniek inhibovať aktivitu NK buniek (Passlick et al., 1996; Redondo et al., 1991).

5.3.1.6 T regulačné lymfocyty (Treg)

Imunosupresorové CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ dokážu inaktivovať efektorové, pomocné T bunky a B lymfocyty. Pre svoju aktiváciu, Treg produkujú protizápalové cytokíny IL-10 a TGFβ, taktiež exprimujú povrchové molekuly CTLA-4, ktoré viažu molekuly rodiny B7 na APC, čoho výsledkom je inhibícia T aj B lymfocytov. Mnoho štúdií poskytuje informácie o zvýšenej prítomnosti Treg buniek v krvi onkologických pacientov v porovnaní so zdravými darcami a tiež o ich prítomnosti priamo v nádorových léziách, kde okrem iného produkujú veľké množstvo imunosupresorového cytokínu TGFβ (Woo et al., 2001). Práve zvýšené množstvo Treg v mikroprostredí môže hrať jednu z hlavných úloh pri navodení imunotolerancie voči nádorovým bunkám, ktoré ich môžu následne využívať ako efektívnu stratégiu na únik pred imunitným systémom (Esendagli et al., 2008; Griffiths et al., 2007; Liyanage et al., 2002).

Prítomnosť Treg v mikroprostredí je spojená s nezrelými DC, Th2 typickým cytokínovým profilom, prostaglandínom E2 a aktivitou indolamín-2,3-dioxygenázy (Witkiewicz et al.), ktorá spôsobuje lokálne odstránenie tryptofánu (Kaporis et al., 2007; Sharma et al., 2003; Sharma et al., 2005; Witkiewicz et al., 2008).

5.3.1.7 Th17 lymfocyty

Sú to T bunky produkujúce množstvo IL-17. Naivné CD4⁺ T lymfocyty preferenčne diferencujú na Th17 ako odpoveď na prítomnosť TGFβ a IL-6, sprostredkované cez Stat3 aktiváciu. Ďalším významným faktorom je IL-23, nedávno identifikovaný prokarcinogénny cytokín (Kortylewski et al., 2009), podporujúci zápal, angiogénu a v mikroprostredí redukuje infiltráciu CD8⁺ buniek (Langowski et al., 2006). Prítomnosť Th17 v mikroprostredí môže mať opačný účinok ako Th1 CD4⁺ lymfocyty, ktoré produkujú IFNγ (Littman and Rudensky, 2010).

Prítomné a aktivované Th17 bunky vytvárajú chronické prostredie so zápalovými faktormi, ktoré aktivujú TAM a podporujú samé seba a prežívanie nádorových buniek (Zamarron and Chen, 2011).

5.3.1.8 Dendritické bunky (DC)

Špecializované antigén prezentujúce bunky, ktoré pohlcujú, spracovávajú a prezentujú antigény typické pre nádory T bunkám. Rozoznávame dve odlišné skupiny DC a to myeloidné (MDC) – CD33⁺ CD11c⁺ a plazmacytoidné (PDC)- CD123⁺CD45R⁺CD11c⁻. Vznikajú v kostnej dreni ako nezrelé iDC a dozrievajú po tom, čo pohltili cudzí Ag. Putujú do lymfatických uzlín a tam prezentujú pohltené Ag T bunkám a tým iniciujú ich aktiváciu (Gottfried et al., 2008).

DC sú prítomné aj v mikroprostredí nádorov (TA-DC ,tumor-associated dendritic cells). Pod vplyvom IL-10, VEGF a prostadlandínu E2 majú imunosupresorové účinky, sú neschopné indukovať špecifickú imunitnú odpoveď a dokonca majú svoj podiel pri rozšírení Treg. Na svojom povrchu vykazujú nízku expresiu kostimulačných molekúl. Okrem imunitnej „paralýzy“, sú tiež schopné produkovať angiogénne faktory a tým podporiť cievtvorné procesy v mikroprostredí (Curiel et al., 2004; Fainaru et al., 2010). Keď sú kultivované v prítomnosti nádorových faktorov, tak prechádzajú procesom endotelializácie (Conejo-Garcia et al., 2004).

Bola vyvinutá značná snaha k využitiu DC, tak aby indukovali nádor-špecifickú imunitu (Ridgway, 2003). Zámerom vakcín založených na DC pre protinádorovú terapiu je urobiť z DC účinne APC a tým stimulovať antigén špecifickú CD4⁺ a CD8⁺ T bunkovú odpoveď. Aj keď sú vakcíny založené na DC schopné indukovať imunitnú odpoveď u pacientov, tak len zriedkavo majú pozitívne klinické výsledky. Hlavným dôvodom je pravdepodobne inhibičný efekt nádorového mikroprostredia, ktoré pôsobí svojimi imunoregulačnými aj imunosupresorovými bunkami a rozpustnými faktormi. Preto jednou z najnovších stratégií ako pripraviť účinnú vakcínu je preprogramovanie supresorového mikroprostredia nádorov (Gilboa, 2007).

5.3 Nádorová terapia a mikroprostredie nádorov

Bežne používané terapie, rádio- a chemoterapie, nie sú nádorovo špecifické s majú nežiaduce účinky na normálne tkanivá. Preto sa v súčasnej dobe uvažuje nad viac špecifickými možnosťami. Náš imunitný systém je schopný rozoznať nádorové bunky a má dôležitú úlohu ich kontrole, no zároveň aj progresii. T lymfocyty, protilátky špecifické na TAA a zložky nešpecifickej imunity bežne nachádzame u pacientov s rakovinou (Bindea et al., 2010; Knutson and Disis, 2005).

Ako bolo spomínané v predchádzajúcej časti, nádory vytvárajú vo svojom okolí špecifické prostredie, kde často dochádza k vytvoreniu imunosupresorových podmienok. A práve tieto podmienky, ktoré umožňujú nádorovú progresiu, spôsobujú zníženie efektívnosti imunoterapie. Preto má význam porozumieť mechanizmom a interakciám, spôsobujúce potlačenie imunitnej odpovede. Pretože ich pochopenie môže priniesť nové stratégie, ktoré by mohli oslabiť túto navodenú toleranciu (Whiteside, 2010).

Je čím ďalej, tým viac jasné, že k vyvinutiu úspešnej protinádorovej terapie sa bude pravdepodobne zakomponovať mnoho rôznych protinádorových mechanizmov, aby dokázali prekonať imunosupresorové mikroprostredie. Medzi hlavné stratégie patrí ochrana efektorových buniek pred regulačnými bunkami Treg a MDSC a pred cytokínmi, ktoré produkujú. Inhibíciou metabolických intermediátov dosiahnuť čo najdlhšiu aktiváciu a prežívanie efektorových buniek. Zároveň sa môžu rôzne imunosupresorové mechanizmy líšiť od nádora k nádoru alebo sa meniť v priebehu progresie. Preto načasovanie a „ušitie na mieru“ stratégie imunoterapie bude vyžadovať presný prieskum kedy a ako dané mechanizmy účinkujú (Stewart and Smyth, 2011).

Ďalej sa venujem popisu chemoterapeutík, ich účinku a vplyvu na mikroprostredie, ktoré boli použité v pokusoch.

5.4.1 Použitá chemoterapia

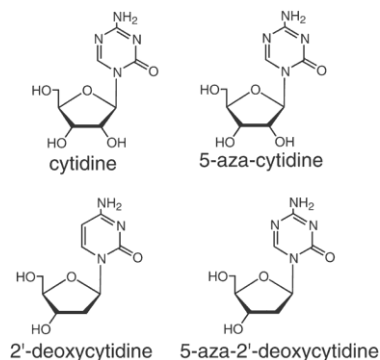
5.4.1.1 5-azacytidín (5AC)

Karcinogenéza môže tiež vzniknúť ako následok rôznych aberácií týkajúcich sa metylácie DNA a to v zmysle hypermetylácie promótorov alebo prvých exónov génov zapojených v rakovinovom bujení a tie môžu mimikovať účinky mutácií nádor-supresorových génov či protoonkogénov a globálnej hypometylácie (Motoyama and Naka, 2004).

5AC (Obr. 4) bol prvýkrát syntetizovaný v roku 1964 a testovaný ako pyrimidinový analóg s klinickou špecifitou pre akútnu myelogénnu leukémiu (Sorm et al., 1964). Momentálne je schválený Úradom pre kontrolu potravín a liečiv (FDA) ako liečivo na myelodysplastický syndróm.

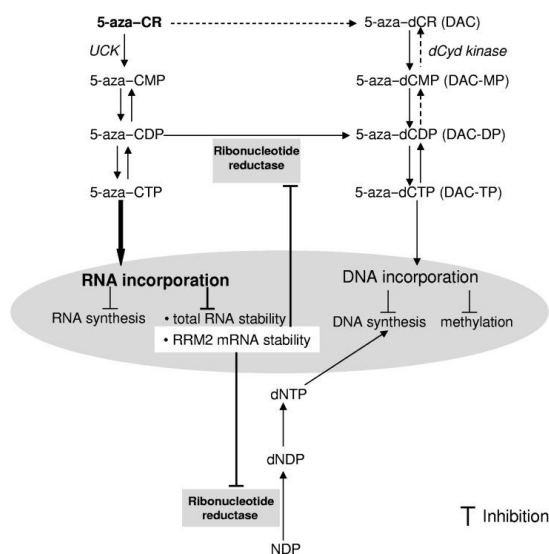
Napriek desaťročiam snahy je stále mechanizmus jeho účinku a jeho interferencií s RNA a DNA metabolizmom nejasný (Kiziltepe et al., 2007).

Obr. 4: Štruktúra cytidínu a 2'-deoxy-cytidínu a ich analógy 2'-deoxy-5-azacytidín a 5-azacytidín
 Obr. prevzatý z (Sampath et al., 2003)



Približne 80-90% 5AC je inkorporovaných do RNA pozdĺž celej sekvencie, čo nakoniec vedie k rozpadu polyribozómov, poruchám metylácie a akceptorových funkcií tRNA, inhibícii translácie, rozvráteniu mRNA a proteínov a následne k apoptóze. Malá frakcia 10-20% 5-azacytidínu monofosfátu (5AC-CMP) je cez intermediát 5AC difosfát (5AC-CDP) je premenená na 5-aza-dCDP enzýmom ribonukleotidová reduktáza (RR), následovaná fosforyláciou na 5AC dCTP (-5-aza-2'-deoxycytidín trifosfát DAC). Ten sa inkorporuje do DNA a kovalentne viaže DNA metyltransferázy (DNMT) a tým inhibuje ich aktivitu (Obr.5). DNMT pridávajú metylové skupiny na cytozín v rámci CpG dinukleotidov v promótorových oblastiach, čím ho hypermetylujú a spôsobia epigenetické umlčanie expresie génov. 5AC je hypometylačné činidlo (Kiziltepe et al., 2007; Kuykendall, 2005).

Obr.5: Navrhovaný mechanizmus 5AC pri AML



5AC je fosforylovaný na 5AC-CTP a inkorporovaný do RNA. Časť frakcie 5AC je cez medziprodukt 5AC-CDP konvertovaná na 5AC-dCDP enzýmom RR, fosforylovaný na 5AC-dCTP (DAC), ktorý sa podľa predpokladu inkorporuje do DNA. Obr. prevzatý z (Aimiwu et al., 2012)

Dalo by sa očakávať, že po ovplyvnení DAC, bude jednoducho dochádzať k redukcii metylácie DNA. Ibaže spôsob demetylácie 5AC sa zdá byť zložitejší, pretože sa ukázalo, že jeho účinky majú duálny charakter. Okamžitý cytotoxický účinok je nasledovaný indukciou hypometylácie DNA. Ktorý účinok bude prevládať závisí na podanej dávke (Gowher and Jeltsch, 2004). Keď sú k bunkám pridané tieto látky, tvorba kovalentných formácií DNMT zastavuje replikáciu a transkripciu a indukuje DNA opravy s vysokým stupňom homologných rekombinácií. V závislosti na množstve podanej látky, bunky buď prežijú túto fázu alebo umierajú, čo vysvetľuje cytotoxicitu závislú na dávke. Prežívajúce bunky majú nedostatok účinných DNMT a to spôsobuje globálnu hypometyláciu novo syntetizovanej DNA (Juttermann et al., 1994).

Epigenetické činidlá ako je práve 5AC sú sľubným cytostatickým liečivom nielen kvôli ich vplyvu na nádorové bunky. Ich ďalším účinkom je znižovanie množstva MDSC v rastúcich nádoroch či v nádoroch po liečbe cyklofosfamidom (CY) ako ukazujú naše predbežné výsledky. Mechanizmus, prečo je tomu tak ostáva stále neobjasnený. 5AC spôsobuje významnú zníženie reguláciu JAK (Janus kinase)/STAT3/STAT5 signálnej dráhy. Proteíny rodiny STAT majú dvojakú úlohu. Niektoré, ako napríklad STAT1 sa podieľajú na zvýšenej protinádorovej imunite. Ostatné majú svoj podiel pri rozvoji nádorova okrem iného aj na expanzii MDSC, a to práve STAT3, STAT5 a iné (Xiong et al., 2009).

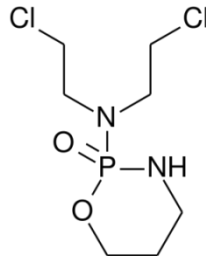
Bol preukázaný vplyv 5-azacytidínu na interakcie nádorových buniek s bunkami imunitného systému a jeho účinky na imunocyty (Tomasi et al., 2006). Liečba 5AC obnovila expresiu molekúl MHC I. triedy na MHC I.-deficientných nádorových bunkách a učinila ich týmto prístupnými pre cytotoxické T-lymfocyty (Manning et al., 2008; Simova et al., 2011) a mala vplyv aj na maturáciu DC (Stepanek et al., 2011). Tiež sa ukázalo, že liečba 5AC spôsobuje diferenciáciu nezrelých CD11b⁺ myeloidných buniek na zrelé bunky, schopné antigénnej prezentácie (Daurkin et al., 2010).

K inkorporácii a inhibícii DNMT dochádza počas replikácie. Preto sú tieto činidlá potencionálnymi protinádorovými liečivami, keďže sú účinné v bunkách, ktoré sa aktívne delia (Constantinides et al., 1977). V súčasnosti je využívaná epigenetická manipulácia genómu nielen ako nádorová terapia ale aj pre iné ochorenia. Jedným z prístupov je práve inhibícia DNMT k dosiahnutiu demetylácie DNA z dôvodu reaktívácie aberantne umlčaných génov, čo sa dá dosiahnuť použitím týchto analógov. Ibaže sú cytotoxické a mutagénne, čo obmedzuje ich aplikáciu. Ďalšou zjavnou nevýhodou je fakt, že nepôsobia na určité vybrané gény, ale spôsobujú globálnu demetyláciu genómu. Je to tolerovateľné u rakovinovej terapie, kde je jedným z cieľov napríklad indukcia apoptózy reexpresiou umlčaných génov, no nie u menej závažných ochorení (Gowher and Jeltsch, 2004).

5.4.1.2 Cyklofosfamid (CY)

Alkylačné činidlo CY (Obr.6) sa rozšírene používa ako protinádorové liečivo a to buď samotné alebo v kombinácii s inými liečivami (Emadi et al., 2009). Alkylačné činidlá spôsobujú prekríženie oboch DNA reťazcov, čo vedie k ich zlomu a tým k smrti bunky (Colvin, 1999).

Obr.6: Štruktúra cyklofosfamidu



Tiež sa používa pred transplantáciou kostnej drene. Liečenie CY spôsobuje vážne poškodenia hematopoetických a lymfoidných tkanív, čo vedie k závažným leukopéniám. Keď je CY aplikovaný samostatne, hematopoetická obnova nastane vždy, dokonca aj pri najvyšších aplikovateľných dávkach, čo poukazuje na relatívnu rezistenciu kmeňových buniek na cytotoxické efekty cyklofosfamidu (Botnick et al., 1976).

Keď sa podá menšia dávka CY ako sa rutinne podáva v klinickej liečbe, tak sa môže zvýšiť protinádorová odpoveď, napríklad odstránením Treg (Machiels et al., 2001) či zvýšenou expresiou maturačných markerov DC (Wada et al., 2009).

Po aplikácii CY narastá hladina IFN γ a ďalších prozápalových cytokínov v sére a zvyšuje množstvo CD11b⁺ myeloidných supresorových buniek *in vivo* (Curiel et al., 2004; Shimizu et al., 1999; Shimizu et al., 2002). Hromadenie MDSC nastáva aj po aplikácii vyššej dávky CY, ale výsledky o ich funkcii sú kontroverzné. Myeloidné bunky zo slezín myši, ktoré sa hromadili po ovplyvnení CY mali nádor-inhibičný efekt u myšieho modelu prsného karcinómu (Pelaez et al., 2001). No na druhej strane, bolo tiež publikované, že cyklofosfamidom indukované nezrelé myeloidné bunky sú schopné potláčať delenie T lymfocytov (Angulo et al., 2000).

MDSC akumulované po podaní CY (CY-MDSC) sa fenotypovo aj funkčne líšia od tých, ktoré sa akumulujú počas rastu nádoru (TU-MDSC). MDSC nahromadené po CY obsahovali vyššie percento monocytárnych myeloidných supresorových buniek (MO-MDSC), ktoré vykazujú CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{hi} IL-4R α ⁺ fenotyp. TU-MDSC sa skladali najmä z polymorfonukleárnych MDSC (PMN-MDSC), ktoré majú CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{lo} IL-4R α ⁺ fenotyp (Youn and Gabrilovich, 2010) a tiež z populácie MO-MDSC. Rozdiel medzi danými MO-MDSC populáciami nebol veľmi dramatický, ale predpokladá sa, že má to svoj biologický význam vzhľadom k faktu, že PMN-MDSC majú vyššiu expresiu imunosupresorových génov v porovnaní s MO-MDSC. Napriek rozdielu v expresii týchto génov aj TU- aj CY-MDSC urýchlňovali rast nádoru (Mikyskova et al., 2012; Movahedi et al., 2008).

6. Ciele práce

Progresia nádorov a ich chemo- či imunoterapia je spojená so zmenami v zastúpení a aktivite jednotlivých bunkových populácií v mikroprostredí nádoru, čo je spojené so zmenami v expresii génov charakteristických pre tieto populácie, prípadne kódujúcich proteíny, ktoré sprostredkovávajú imunosupresiu. Cieľom tejto práce bolo na myšacích modeloch TRAMP-C2 a TC-1/A9 charakterizovať zmeny v zastúpení vybraných populácií imunocytov a ďalej zmeny v celkovej expresii vybraných génov kódujúcich proteíny dôležité pre imunosupresiu v priebehu rastu alebo chemoterapie nádorov.

Jednotlivé ciele boli:

1. Zistiť zmenu expresiu vybraných imunosupresorových génov v mikroprostredí počas rastu nádorov TRAMP-C2 a TC-1/A9
2. Zistiť percentuálne zastúpenie jednotlivých TIL v mikroprostredí nádorov TRAMP-C2 a TC-1/A9 po terapii 5AC
3. Zistiť zmenu relatívnej expresie vybraných imunosupresorových génov a génov kódujúcich znaky typické pre lymfocytárnu líniu po terapii 5AC
4. Zistiť percentuálne zastúpenie jednotlivých TIL v mikroprostredí nádorov TRAMP-C2 a TC-1/A9 po terapii CY a po kombinovanej terapii CY + 5AC
5. Zistiť zmenu relatívnej expresie vybraných imunosupresorových génov a génov kódujúce znaky typické pre lymfocytárnu líniu v mikroprostredí nádorov po terapii CY a po kombinovanej terapii CY+5AC

7. Materiál a metódy

7.1 Myši

Pre *in vivo* experimenty boli využívané samce kmeňa C57BL/6 (B6), staré osem až desať týždňov (Anlab Co.). Všetky experimenty boli schválené Komisiou ÚMG pre ochranu zvierat.

7.2 Bunkové línie

Línia TC-1/A9 bola získaná z nádorov vyrastených po podaní buniek TC-1 myšiam, ktoré boli opakovane imunizované DNA vakcínou proti HPV 16 E7 onkoproteínu (Smahel et al., 2001). Na rozdiel od parientálnej línie TC1 je znížená expresia molekúl MHC I. triedy na povrchu buniek TC-1/A9 detekovateľná prietokovou cytometriou.

TRAMP-C2 línia je odvodená od heterogénneho adenokarcinómu prostaty transgénnych myší Pb-T ag C57BL/6 (TRAMP). Myší model vznikol vnesením konštruktu zloženého z potkanieho promotora pre proteín probasin, časti neprekladanej sekvencie a génu pre T antigén SV40 do genómu myší C57BL/6. Majú zhodný klinicko-patologický priebeh nádorovej progresie s karcinómom prostaty u ľudí (Foster et al., 1997).

7.3 Práca s bunkovými líniami

7.3.1 Kultivácia buniek

Bunkové línie boli pestované v príslušnom médiu. Pre TC-1/A9 to bolo RPMI 1640 doplnené s 10% FCS, 2mM L-glutamínom a antibiotikami (Sigma). Pre TRAMP-C2 líniu bolo používané D-MEM doplnené s 5%FCS, Nu-Serum IV (BD Biosciences, Bedford, MA, USA), 0,005 mg/ml, hovädzí inzulín (Sigma), 10nM dehydroizoandrosteron (Sigma) a antibiotiká. Kultivácia prebiehala v plastových kultivačných fľašiach (75 cm², výrobca Corning) v CO₂ inkubátore (37°C, 5% CO₂). Pasážovanie bolo robené priemerne trikrát týždenne v sterilnom prostredí Biohazard boxu. Po zliatí média boli bunky najprv opláchnuté PBS a potom boli uvoľnené z dna nádoby pomocou trypsínu (0,5% v PBS u TC-1/A9 a 2% v PBS a 10% EDTA pre TRAMP-C2). Jeho aktivita sa zastavuje pridaním dvojnásobného množstva média s FBS. Po homogenizácii bola suspenzia centrifugovaná (1100 rpm, 10 min.), pelet buniek bol resuspendovaný v médiu a počet buniek v 1 ml stanovený pomocou Bürkerovej komôrky. Do kultivačnej fľaše s 35 ml média bolo nasadených asi 3,5 mil buniek.

7.3.2 Počítanie buniek

Počet buniek v 1 ml bol stanovený tak, že 0,1 ml bunkovej suspenzie bol zmiešaný s 0,1 ml trypanovej modrej, časť zmesi bola prenesená do Bürkerovej komôrky a živé bunky pod mikroskopom počítané. Trypanová modrá farbí domodra mŕtve bunky.

7.3.3 Zamrazovanie buniek

Pre potrebu dlhodobiejšieho uchovávanie bol pelet buniek vzniknutý po centrifugácii pomaly resuspendovaný v zmrazovacom roztoku 10% DMSO v FBS. Do 1 ml roztoku bolo pridaných najviac 20 mil buniek, suspenzia bola prenesená do zmrazovacích ampuliek (2 ml, výrobca Corning), ktoré boli umiestnené do -70°C na 24 hod v špeciálnej polystyrénovej krabičke, aby sa postupne zamrazili a potom boli odtiaľ vybrané a prenesené do kontajnera s tekutým dusíkom (-196°C) v prípade dlhodobého zamrzenia alebo ponechané v -70 pre krátkodobé mrazenie.

7.3.4 Rozmrazovanie buniek

Ampulu so zamrznutými bunkami bola vložená do zohriatej vody (cca 30°C). Rozmrazená bunková suspenzia bola zo zmrazovacej ampule pomaly nakvapkávaná do kyvety s predhriatym médiom. Potom bola suspenzia centrifugovaná (1100 rpm, 10 min), pelet buniek resuspendovaný v médiu a vzniknutá suspenzia prenesená do kultivačnej fľaše s médiom dopredu vytemperovaným na 37°C.

7.4 *In vivo* experimenty

7.4.1 Transplantácia nádorových buniek

Pri transplantácii nádorových buniek bolo použitých 5×10^4 TC-1/A9 buniek v 0,3 ml média alebo 10^6 TRAMP-C2 buniek v 0,3 ml média. Bunky boli myšiam injektované subkutánne na chrbát, miesto vpichu bolo vopred dezinfikované etanolom.

7.4.2 Chemoterapia

Keď experimentálne nádory dosiahli veľkosť cca 0,5 cm², boli myšiam podané chemoterapeutiká:

- ^{1.} cyklofosamid (Endoxan, Baxter Oncology GmbH, Halle, Germany) v dávke 200mg/kg intraperitoneálne a po siedmich dňoch bol nádor odobraný

2. 5-azacytidín (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Germany) v dávke 100 µg/myš intra/peritumorálne (6-9 dávok každý druhý deň v priebehu 14-21 dní v závislosti na experimente)
3. Kombinácia CY + 5AC:
 1. deň: 200mg/kg CY;
 2. ,4., 6. deň: 100µg/myš 5AC
 7. deň: odobranie nádoru

5AC (3x týždenne 100µg/myš peritumorálne). Dva dni po poslednej liečbe 5AC (alebo 7 dní po CY), boli myši usmrtené a nádory odobrané pre ďalšiu analýzu.

7.4.3 Meranie veľkosti nádorov

Pri sledovaní *in vivo* účinku chemoterapeutík bola četnosť (počet myší s nádorom v skupine) a veľkosť meraná dvakrát týždenne. Ako veľkosť nádoru bola považovaná plocha v cm² na priereze najväčším miestom nádoru, meranou ako súčin najdlhšieho rozmeru a rozmeru naň kolmého. Výsledky boli štatisticky vyhodnotené. Bol použitý Studentov t-test. Pre vyhodnotenie *in vivo* experimentov bola využitá Analýza variancií (ANOVA) Turkey-Kramer test od NCSS, Number Cruncher Statistical System (Kaysville, Utah, USA).

7.4.4 Odstránenie nádorov

Keď nádory dosiahli požadovanú veľkosť, myši boli usmrtené (cervikálnou dislokáciou) a nádor odobraný z tela. Po očistení bol rozstrihaný na malé kúsky, odvážený a použitý na prietokovú cytometriu, izoláciu RNA.

7.4.5 Homogenizácia nádorov pre prietokovú cytometriu

Vzorka nádorového tkaniva bola homogenizovaná podľa Tumor Dissociation Kit od MACS Milteyi Biotec. Kombináciou mechanickej disociácie s enzymatickou degradáciou bola získaná jednobunková suspenzia. Do gentleMACS C túb bol pridaný mix enzýmov a nastrihaný nádor na malé kúsky. Tesne uzavreté C tuby boli prenesené na gentle MACS Dissociator a bol použitý program m_impTumor_02. Po skončení programu sa vzorky nechali inkubovať na 40 min pri 37°C pri stálej rotácii v inkubátore. Po inkubácii boli vzorky v C tubách prenesené na gentle MACS Dissociator a program m_impTumor_03 bol zapnutý. Po skončení programu boli vzorky krátko centrifugované. Resuspendované vzorky boli prefiltrované do 15 ml skúmaviek a bunky boli premyté s 10 ml média. Suspenzia bola centrifugovaná (300 rpm, 7 min), resuspendovaná, spočítaná a pripravená na separáciu na MACS a prietokovú cytometriu.

7.4.6 Magnetická separácia

Pre separáciu CD45⁺ pozitívnych buniek bola využitá magnetická separácia na MACS (magnetic-activated cell sorter). K bunkám bol najprv pridaný 10 ml MACS pufor a boli stočené (1100 rpm, 10 min). Po zliatí média k nim bolo pridaných 400 µl pufru a 50 µl Macs protilátky proti CD45, ktorá je naviazaná na kovové guľičky. Zmes bola pretrepaná a ponechaná k inkubácii 15 min v chladničke. Po inkubácii bola zmes premytá nadbytkom MACS pufru (cca 20 ml) a stočená (1100 rpm, 10 min). Po zliatí supernatantu bol pridaný 2-2,5 ml pufru a prefiltrovaný cez filter a výslednú zmes bola vzatá na separáciu na magnetický separátor AutoMACS Pro (Miltenyi Biotec), kde bola vo výsledku získaná pozitívna frakcia so separovanými CD45⁺ bunkami a negatívna frakcia, kde boli zvyšné bunky.

7.4.7 Prietoková cytometria

Percentuálne zastúpenie CD4⁺, CD8⁺, CD11c⁺, CD11b⁺, F4/80⁺ bunkových populácií medzi izolovanými CD45⁺ leukocytmi boli analyzované prietokovou cytometriou. Vybrané povrchové molekuly boli označené monoklonálnymi protilátkami konjugovanými s flourochromami FITC, PE alebo APC, ktoré boli zvolené tak, aby jedna vzorka obsahovala protilátky vždy značené rôznymi flourochromami.

Suspensia buniek (5x10⁶ buniek) bola najprv premytá RIA pufrom a po centrifugácii (1100 rpm, 10 min) boli bunky resuspendované v RIA pufri na koncentráciu 1 mil/0,1 ml.

Pre minimalizáciu nešpecifickej väzby na Fc receptory bola k bunkám pridaná protilátka anti- CD16/CD32 v množstve 1 µl/0,5 mil buniek. Bunky boli prenesené na 96-jamkovú platničku. Do každej jamky bolo daných 50 µl bunkovej suspenzie, tj. 5x10⁵ buniek.

Do každej jamky boli pridané príslušné protilátky v množstve 2 µl na jamku. Jedna vzorka každej skupiny bola označená relevantnými protilátkami izotypovej kontroly konjugovanými s príslušnými flourochromami (IgG_{2a} κ konjugovaná s PE). Ostatné vzorky boli označené následnou kombináciou protilátok:

Gr-1 (PE) + CD11b (FITC) + CD45 (APC)

CD4 (PE) + CD8 (FITC) + CD45 (APC)

CD11c (APC) + CD45 (PE)

F4/80 (PE) + CD45 (APC)

96-jamková platnička bola potom inkubovaná 30 min v tme a na ľade a následne bolo ku vzorkám pridaných 150 µl RIA pufru a doštička bola scentrifugovaná (1100 rpm, 5 min) a supernatant bol odstránený. Takto boli vzorky premyté trikrát a nakoniec bol pelet buniek rozsuspendovaný v 150 µl FACS pufri a takto pripravené vzorky boli analyzované na prietokovom

cytometri BD LSR II (Becton Dickinson, USA). Výsledky získané zmeraním 10 000 buniek z každej vzorky boli vyhodnotené pomocou programu WinMDI 2.8 (USA) a vyjadrené ako priemerná intenzita fluorescence (MFI) negatívnej kontroly a vzorky.

7.4.8 Homogenizácia tkaniva pre RNA izoláciu

K celkovej homogenizácii nádorov pre izoláciu RNA bol používaný protokol od MACS Milteyi Biotec. Po odvážení $0,1 \pm 0,02$ g nastrihaného nádoru bol prenesený do M túb a boli pridané 3 ml lyzačného pufru temperovaného na izbovú teplotu. Pevne uzavreté M tuby boli prenesené na gentle MACS Dissociator a program RNA_01 bol použitý. Po ukončení programu boli M tuby centrifugované (2000 rpm, 1 min). Následne bol homogenát premiestnený do 15 ml skúmaviek a z neho izolovali RNA.

7.4.9 Izolácia a purifikácia RNA

Ku vzorkám po homogenizácii bolo pridané ekvivalentné množstvo 70% etanolu ako lyzačného roztoku (3 ml). Ďalej sa pokračovalo podľa PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen).

7.4.10 Reverzná transkripcia

RNA bola prepísaná do komplementárnej cDNA pomocou kitu GeneAmp RNA PCR (Applied biosystems). Reakcia prebiehala v celkovom objeme 20 μ l, ktorý vznikol zmiešaním 11 μ l Master Mixu (MMix+), 1 μ g RNA a doplnením objem PCR vodou. Pre každú vzorku bola pripravená negatívna kontrola a to pripravením Master Mixu (MMix-), v ktorom bola reverzná transkriptáza nahradená PCR H₂O. Touto negatívnou kontrolou bola vylúčená kontaminácia genómovou či inou DNA.

Master Mixy:

	MMix+	MMix-
25mM MgCl ₂	4 μ l	4 μ l
10x PCR pufor II	2 μ l	2 μ l
dNTP (10nM)	2 μ l	2 μ l
Inhibítor Rnáz (20U/ μ l)	1 μ l	1 μ l
MuLV reverzná transkriptáza (50U/ μ l)	1 μ l	0 μ l
Oligo d(T) ₁₆ (50 μ M)	0,5 μ l	0,5 μ l
Náhodné hexamery (50 μ M)	0,5 μ l	0,5 μ l
PCR H ₂ O	0 μ l	1 μ l

Reverzná transkripcia prebiehala v termocykle GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) podľa teplotného profilu:

42°C	45 min
99°C	5 min
10°C	5 min - ∞

Po prebehnutej reakcii bola každá vzorka nariedená PCR vodou 4- 8x.

7.4.11 Kvantitatívna PCR (qPCR)

Pre qPCR bola využitá komerčná zmes iQ SYBR Green Super mix (Bio-Rad). Jej súčasťou je interkalačné farbivo Sybr Green I, ktoré po väzbe na dvojreťazcovú DNA mnohonásobne zvyšuje svoju fluorescenciu, a to úmerne množstvu produktu vznikajúceho behom reakcie. Vlastná PCR prebieha v celkovom objeme 10 µl. Reakčné zmesi boli pripravené pre každý gén zvlášť, rozpipetované do PCR doštičky a potom každá jamka doplnená 4 µl príslušnej cDNA. Pre kontrolu čistoty reakcie bola v negatívnej kontrole cDNA nahradená 4 µl PCR H₂O.

Reakčná zmes:

iQ SYBR Green Super Mix (Bio-Rad)	5 µl
Forward primer	0,05 µl
Reverse primer	0,05 µl
PCR H ₂ O	0,9 µl
+cDNA	4 µl

Zoznam sekvencií použitých primerov:

PRIMER	SEKVENCIE (5'→3'); Forward, Reverse
β-aktín	CCAGAGCAAGAGAGGTATCC
	GAGTCCATCACAATGCCTGT
ARG-1	CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG
	AGGAGCTGTCATTAGGGACATC
iNOS2	GTTCTCAGCCCAACAATAACAAGA
	GTGGACGGGTCGATGTCAC
CYBB	GGTTGGGGCTGAACATTTTTC
	TCGACACACAGGAATCAGGAT
IDO	CAGGCCAGAGCAGCATCTTC
	GCCAGCCTCGTGTTTTATTCC
CD4	GGTGGAGTTGTGGGTGTTCAA

	CAGGCTCTGCCCTTGCAA
CD8	CCTACCACAGGAGCCGAAAG
	TGGGCTTGCCTTCCTGTCT
FOX P3	CCC AGG AAA GAC AGC AAC CTT
	TTC TCA CAA CCA GGC CAC TTG

Vlastná amplifikačná reakcia prebiehla na 384 – jamkovej doštičke na prístroji LC 480 (Roche) so softwarom LCS480 1.5.0.39.

Relatívna expresia vybraných génov bola posudzovaná na základe získaných C_T hodnôt (threshold cycle), ktoré označujú cyklus v priebehu reakcie, v ktorom dochádza k akumulácii amplifikovaného produktu a jeho fluorescencia dosahuje nastavenú hranicu detekovateľnosti signálu. Hodnoty sú zbierané v priebehu exponenciálnej fázy PCR. Génová expresia bola normalizovaná vzhľadom k referenčnému génu, a to β -aktínu. Relatívna expresia konkrétneho génu bola vyjadrená z nameraných C_T pre β -aktín a cieľový gén pomocou vzorca $2^{(CT(\beta\text{-aktín})-CT(\text{cieľový gén}))}$, hodnoty boli štatisticky vyhodnotené (Studentov t-test, SD) a graficky spracované.

Produkty reakcie boli skontrolované pomocou kriviek topenia, ktoré na základe charakteristických teplôt topenia (T_m) odlišia reakčné produkty od nešpecifických.

Teplotný profil qRT-PCR:

Denaturácia 1x	95°C	6 min
Cyklus 45x	95°C	30 s
	60°C	1 min
	72°C	1 min
Krivka topenia 1x	95°C	30 s
	60°C	1 min
	55 – 95°C	Meranie každých 0,5°C
Chladienie 1x	40°C	10s

7.5 Zloženie médií a roztokov

PBS (1x s fenolovou červenou)

NaCl 8 g/l; KCl 0,2 g/l; KH_2PO_4 0,2 g/l; Na_2HPO_4 1,15 g/l; 2 ml/l fenol. červené ,4%

Roztok pre zamrazenie buniek

10% dimethylsulfoxid (DMSO, Serva) ve fetálnim teľacom sére(PAN Biotech)

Trypsin (0,5% v PBS)

NaCl 8 g/l; KCl 0,2 g/l; KH_2PO_4 0,2 g/l; Na_2HPO_4 1,15 g/l; trypsin 5 g/l

Nárazníkové systémy

RIA pufo: PBS, Azid(0,01%), 4% FBS/albumin

Kultivačné médium pre TRAMP-C2 DMEM (Sigma-Aldrich)

5% tepelne inaktivované fetálne teľacie sérum (PAN Biotech)

5% tepelne inaktivované Nu-sérum (Nu-Serum IV Culture Supplement, BD Bioscience)

0,005 mg/ml hovedzí inzulín (Sigma-Aldrich)

10nM dihydroepiandrosteron (DHEA, Sigma-Aldrich)

gentamicin 40 µg/ml (Sigma-Aldrich)

amphotericin B 0,5 µg/ml (Sigma-Aldrich)

Kultivačné médium pre TC-1/A9 RPMI 1640 (Sigma-Aldrich)

10% tepelne inaktivované fetálne teľacie sérum (PAN Biotech)

gentamicin 40 µg/ml (Sigma-Aldrich)

amphotericin B 0,5 µg/ml (Sigma-Aldrich)

Protilátky

Na MACS: CD45: Milteyi Biotec, MICRO BEADS, Mouse

Na FACS:

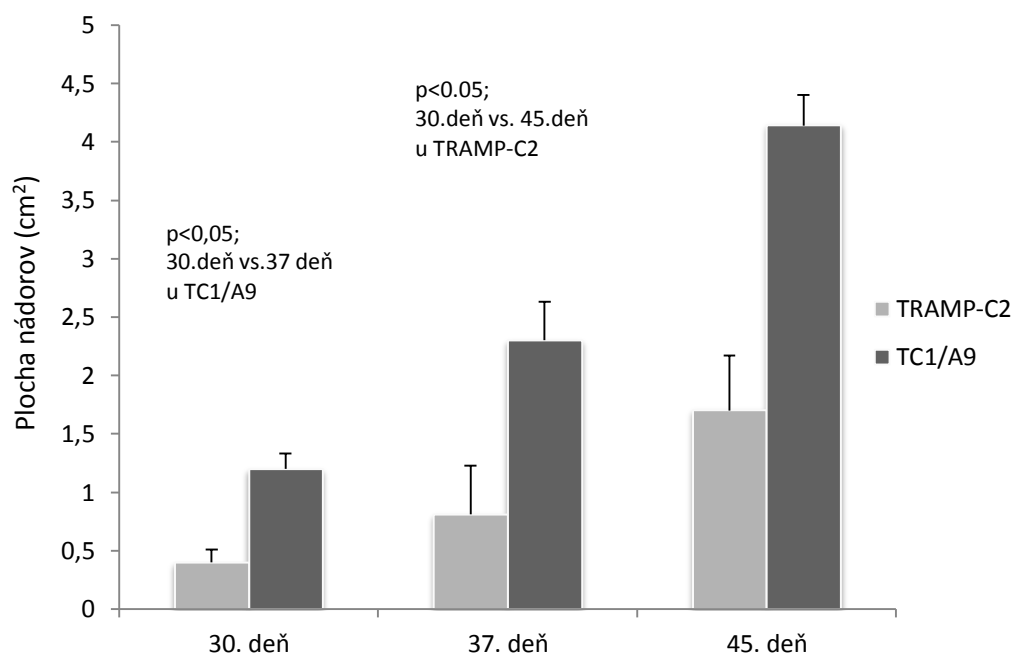
Gr-1 (PE)	BD Farmigen Rat Antimouse
CD11b (FITC)	BD Farmigen Rat Antimouse
CD45 (APC)	BD Farmigen Rat Antimouse
CD4 (PE)	BD Farmigen Rat Antimouse
CD8 (FITC)	BD Farmigen Rat Antimouse
CD11c (APC)	BD Farmigen Hamster Antimouse
CD45 (PE)	BD Farmigen Rat Antimouse
F4/80 (PE)	Biologend Antimouse
CD16/CD32	BD Farmigen Rat Antimouse

8. Výsledky

8.1 Zmena relatívnej expresie vybraných imunosupresorových génov počas rastu nádorov

Na Obr. 1 je znázornená veľkosť nádorov TRAMP-C2 (cm²) a TC-1/A9 (cm²) odobraných po 30, 37 a 45 dňoch rastu. Na týchto grafoch sa dá pozorovať, že TC-1/A9 rastú rýchlejšie v porovnaní s TRAMP-C2 nádormi. Preto v rámci experimentov sú TC-1/A9 odoberané skôr ako TRAMP-C2. Nádory boli odoberané v daný deň z troch myší. Výnimku tvorí 30. deň u TC-1/A9 nádorov, keď ich bolo odobraných 5.

Obr. 1: Veľkosť nádorov odobraných v 30., 37., a v 45. deň



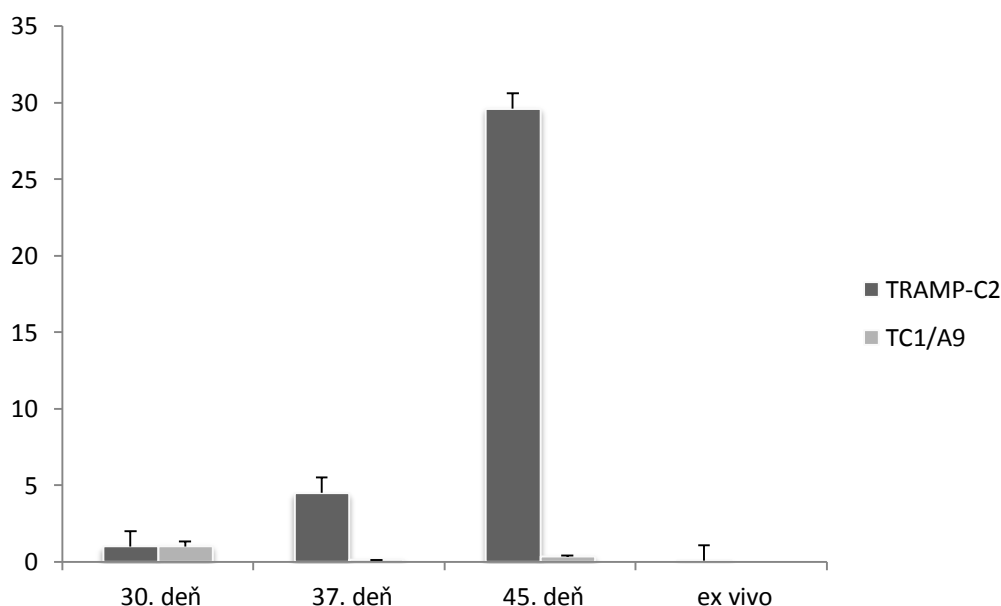
Na Obr. 2 je porovnaná relatívna expresia génu v mikroprostredí nádorov pre ARG-1 pri rôznych veľkostiach nádorov TRAMP-C2 a TC-1/A9. Produkt tohto génu potláča imunitné reakcie odstránením lokálneho zdroju L-arginínu. Z grafu vyplýva, že relatívna expresia génu pre ARG-1 sa zvyšovala pravidelne so zväčšujúcou sa veľkosťou u nádorov typu TRAMP-C2, ale nie u TC-1/A9. Označenie *ex vivo* označuje RNA z nádorových buniek explantovaných z myši do tkáňovej kultúry, čiže už neobsahujú infiltrujúce bunky. Bola skúmaná aj relatívna expresia génu pre ARG-1 u nádorových buniek TRAMP-C2 kultivovaných *ex vivo* podmienkach a porovnávali ju s relatívnou expresiou v mikroprostredí nádorov. Výsledkom bolo, že relatívna expresia génu pre ARG-1 sa približovala nulovej hodnote.

Na Obr. 3 je porovnaná relatívna expresia génu pre iNOS pri rôznych veľkostiach nádorov TRAMP-C2 a TC-1/A9. Produkt tohto génu potláča imunitné reakcie obdobným spôsobom ako argináza a to odstránením lokálneho zdroju L-arginínu. Z grafu vyplýva, že expresia génu pre iNOS sa zvyšovala pravidelne so zväčšujúcou sa veľkosťou u nádorov typu TRAMP-C2. Kým u TC-1/A9 sa korelácia s veľkosťou nenašla. Expresia v 37. deň sa dokonca znížila. Relatívna expresia génu pre iNOS nádorových buniek TRAMP-C2 kultivovaných *ex vivo* sa približovala nulovej hodnote.

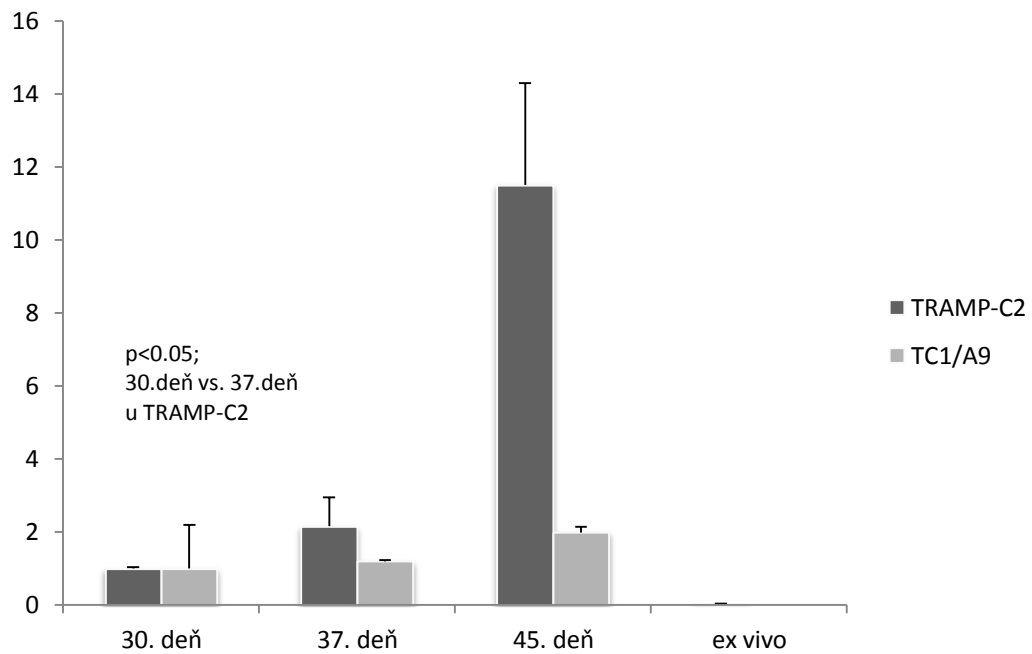
Voľné kyslíkové radikály sú tvorené NADPH oxidázou. Bola sledovaná expresia podjednotky tohto enzýmu CYBB. Pre lepší prehľad v grafoch aj v texte je uvedený názov ROS. Gén tohto proteínu je produkovaný v mikroprostredí oboch nádorových typov. U TRAMP-C2 jeho miera expresie koreluje so zväčšujúcou sa veľkosťou. U TC-1/A9 je jeho produkcia zvýšená, no nie je tu zachovaný trend podobný ako u TRAMP-C2 nádorov. Pokusy *ex vivo* ukázali, že ROS je produkovaný v tkáňovej kultúre nádorovými bunkami TRAMP-C2 (Obr. 4).

Pokusy boli robené na biologických tripletoch.

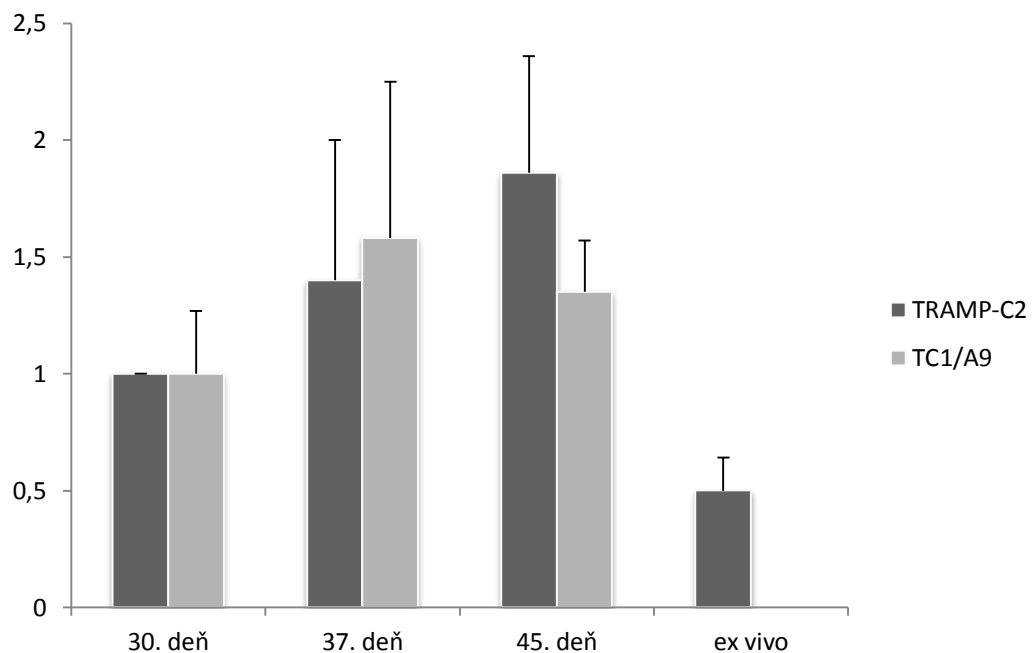
Obr. 2: Relatívna expresia génu pre ARG-1 v mikroprostredí TRAMP-C2 a TC-1/A9 nádorov s rôznou veľkosťou



Obr. 3: Relatívna expresia génu pre iNOS v mikroprostredí TRAMP-C2 a TC-1/A9 nádorov s rôznou veľkosťou



Obr. 4: Relatívna expresia ROS v mikroprostredí TRAMP-C2 a TC-1/A9 nádorov s rôznou veľkosťou



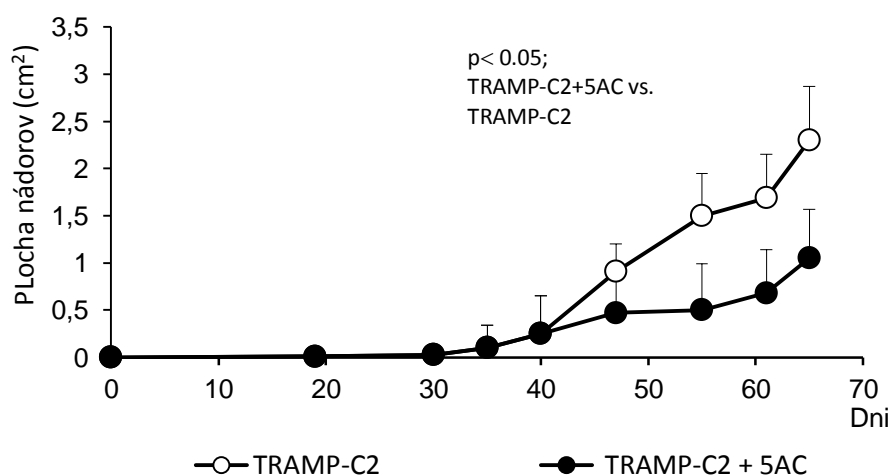
8.2 Vplyv epigenetickej liečby 5-azacytidínom na mikroprostredie nádorov

8.2.1 Vplyv epigenetickej liečby 5-azacytidínom na mikroprostredie nádorov TRAMP-C2

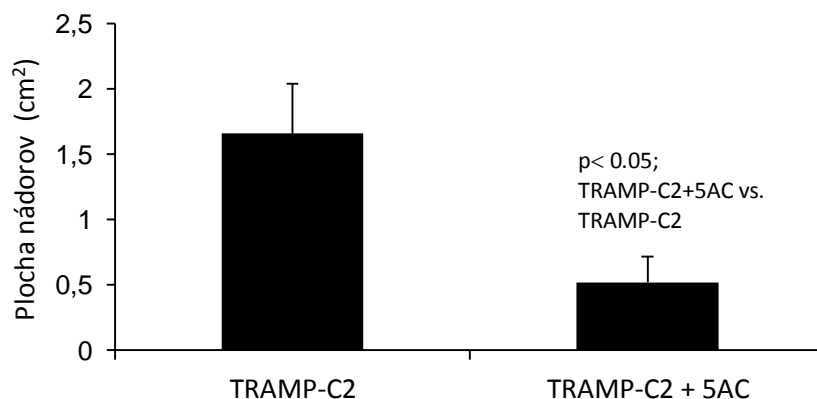
5-azacytidín je cytostatikum s epigenetickým efektom na metyláciu DNA. Na Obr. 5 je zobrazený jeho vplyv na veľkosť nádorov počas ich rastu. 5AC bol podávaný peritumorálne trikrát týždenne v dávke 100 μ g/myš. Prvá dávka bola podaná myšiam s hmatateľným nádorom (priemer cca 0,5cm², 35 deň). Výsledkom bolo signifikantné ($p < 0,05$) spomalenie rastu oproti neliečeným kontrolným nádorom TRAMP-C2.

Po zmeraní plochy odobraných nádorov po ukončení terapie, bola plocha liečených nádorov TRAMP-C2 signifikantne menšia ($p < 0,05$) v porovnaní s neliečenými nádormi (Obr. 6). V každej skupine boli minimálne tri nádory. Nádory boli odstránené v 65.deň.

Obr. 5: Veľkosť nádorov TRAMP-C2 počas terapie 5AC



Obr. 6: Plocha nádorov TRAMP-C2 po ich odobraní z myší po terapii 5AC

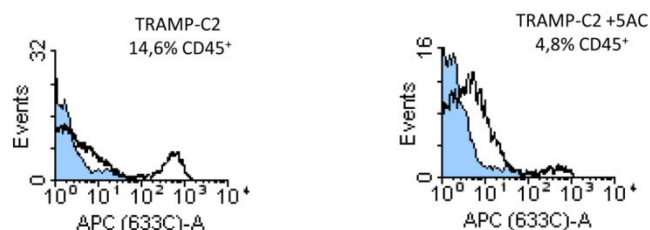


Pri liečbe 5AC dochádzalo k spomaleniu rastu nádorov (Obr. 5 a Obr. 6), no 5AC vplýval aj na zloženie mikroprostredia. Neličené TRAMP-C2 nádory boli infiltrované približne 14,5% CD45⁺ bunkami. U liečenej skupiny došlo k zníženiu týchto buniek na cca 5% (Obr. 7).

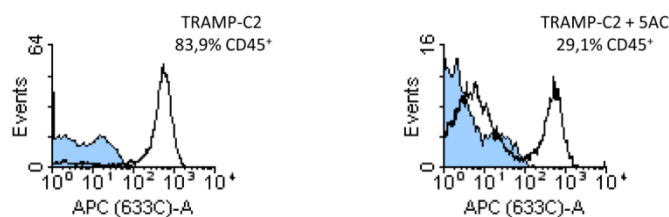
Následne boli pomocou magnetickej separácie oddelené CD45⁺ bunky (TIL) (Obr. 8) a z tejto frakcie robená analýza jednotlivých populácií. Gr-1 a CD11b sú charakteristické znaky pre MDSC (Obr. 9). Zo všetkých CD45⁺ buniek ich bolo cca 26% u kontrolných nádorov. Epigenetická liečba 5AC spôsobila ich úbytok takmer na polovicu a to na 12,5%.

Neličené nádory boli infiltrované CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocytmi (Obr. 11 a Obr. 12). Pri analýze nádorov liečených 5AC bolo ich percentuálne zastúpenie pod hranicu 1%. Rovnaký prípad nastal aj u CD11c⁺ bunky, čo je znak pre dendritické bunky (Obr. 10). Pokusy boli robené z troch nádorov spojených do jednej vzorky.

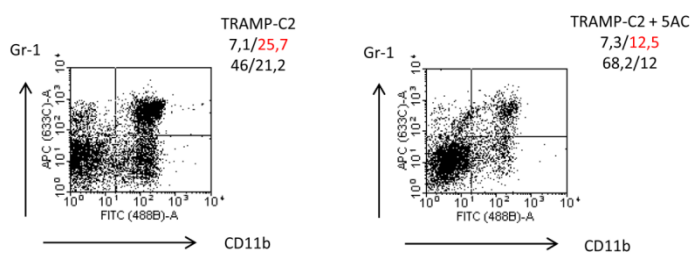
Obr. 7: Percentuálne zastúpenie infiltrujúcich CD45⁺ buniek v mikroprostredí nádorov TRAMP-C2



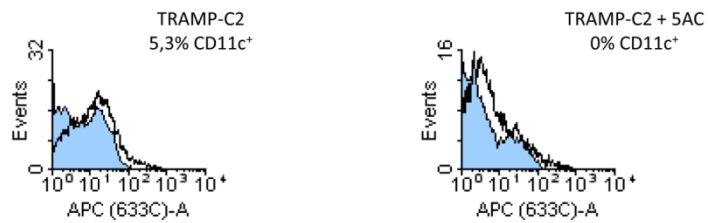
Obr. 8: Frakcia nádor-infiltrujúcich CD45⁺ buniek v mikroprostredí nádorov TRAMP-C2 po separácii na magnetickom separátore AutoMACS Pro



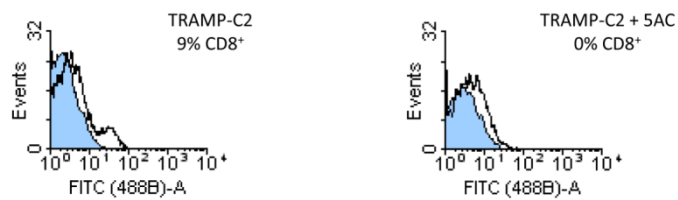
Obr. 9: Percentuálne zastúpenie Gr-1⁺/CD11b⁺ buniek v mikroprostredí nádorov TRAMP-C2 pred a po terapii 5AC



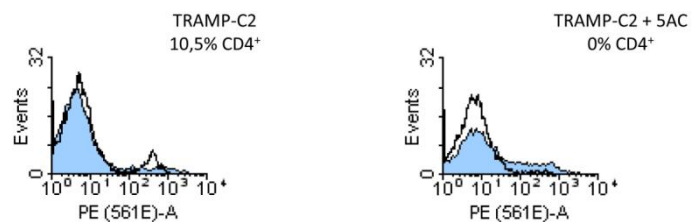
Obr. 10: Percentuálne zastúpenie CD11c⁺ buniek v mikroprostredí nádorov TRAMP-C2 pred a po terapii 5AC



Obr. 11: Percentuálne zastúpenie CD8⁺ buniek v mikroprostredí nádorov TRAMP-C2 pred a po terapii 5AC



Obr. 12: Percentuálne zastúpenie CD4⁺ buniek v mikroprostredí nádorov TRAMP-C2 pred a po terapii 5AC



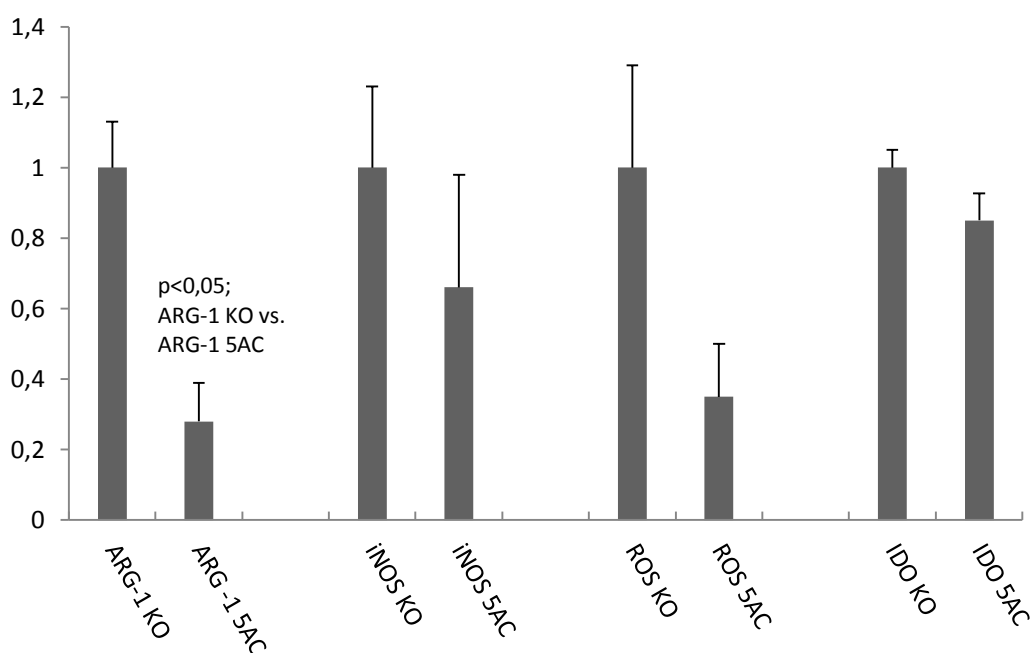
Epigenetická liečba nádorov znamenala signifikantný pokles ($p < 0,05$) relatívnej expresie génu pre ARG-1. Taktiež nastal nesignifikantný pokles relatívnej expresie génov pre iNOS, ROS a v menšej miere aj expresie génu pre IDO. Ide o imunosupresorové gény, ktoré majú významný podiel v potlačení aktivácie T lymfocytov. Na Obr. 13 je viditeľné, že epigenetická liečba zmiernila ich expresiu, čo korelovalo so zníženým percentuálnym zastúpením MDSC v mikroprostredí nádorov TRAMP-C2.

Nasledujúci graf (Obr. 14) ukazuje, že epigenetická liečba 5AC nemala vplyv na zmenu expresie znakov typických pre T lymfocyty v mikroprostredí TRAMP-C2 nádorov. Ide o znaky jak cytotoxických ($CD8^+$), pomocných ($CD4^+$) a regulačných (Treg) lymfocytov, ktoré sú známe svojimi regulačnými účinkami a expresiou znaku FoxP3. Analýza z prietokovej cytometrie (Obr. 10 a Obr. 11) to vyvracia, pretože tieto bunky, síce v malom zastúpení boli nájdené v infiltráte u neliečených nádoroch, no po terapii 5AC nebola ich prítomnosť preukázaná.

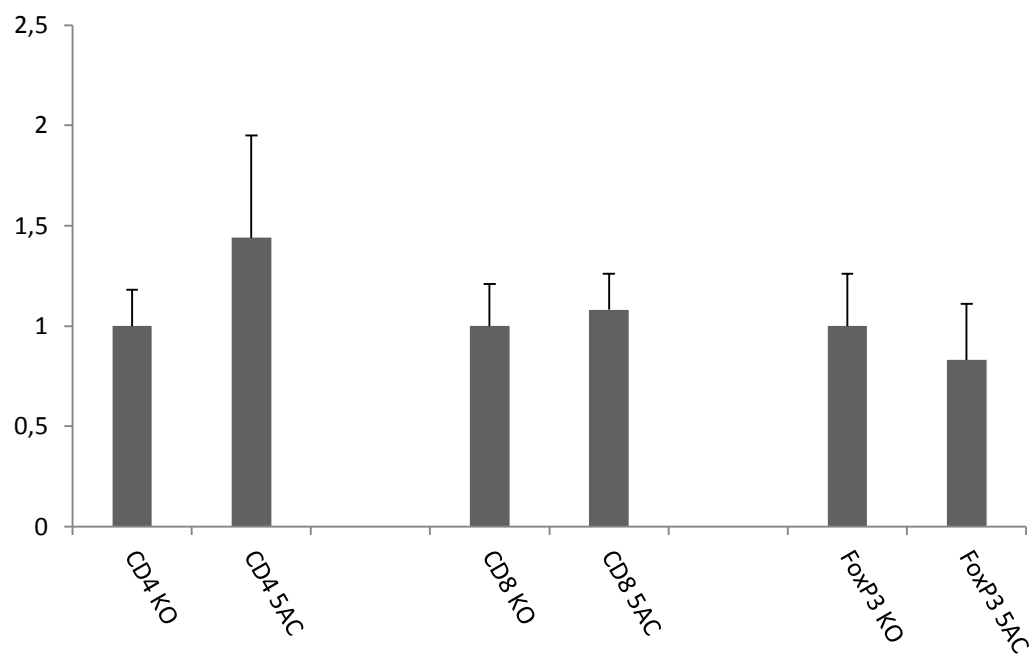
Z Obr. 15 vyplýva, že liečba 5AC nepôsobila na relatívnu zmenu expresiu génov pre cytokíny IL-4, IL-6, IL-12 a IFN γ . Nastalo zvýšenie expresie génu pre IL-10, cytokínu známeho svojimi supresorovými účinkami, uvoľňovaný najmä nádor-infiltrujúcimi makrofágmi. Vzhľadom k veľkému rozptylu hodnôt toto zvýšenie nebolo signifikantné.

Celková mRNA bola získaná z troch nádorov v každej skupine.

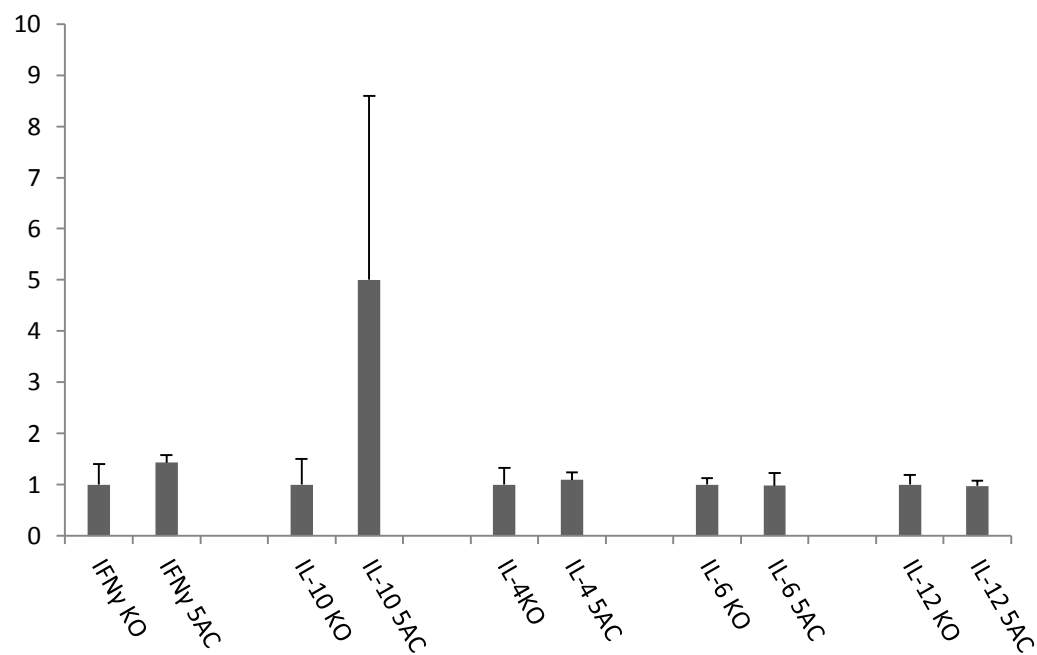
Obr.13: Relatívna zmena expresia imunosupresorových génov v mikroprostredí nádorov TRAMP-C2 po liečbe 5AC



Obr.14: Relatívna zmena expresie génov určujúcich bunkové populácie lymfoidnej rady v mikroprostredí TRAMP-C2 po liečbe 5AC



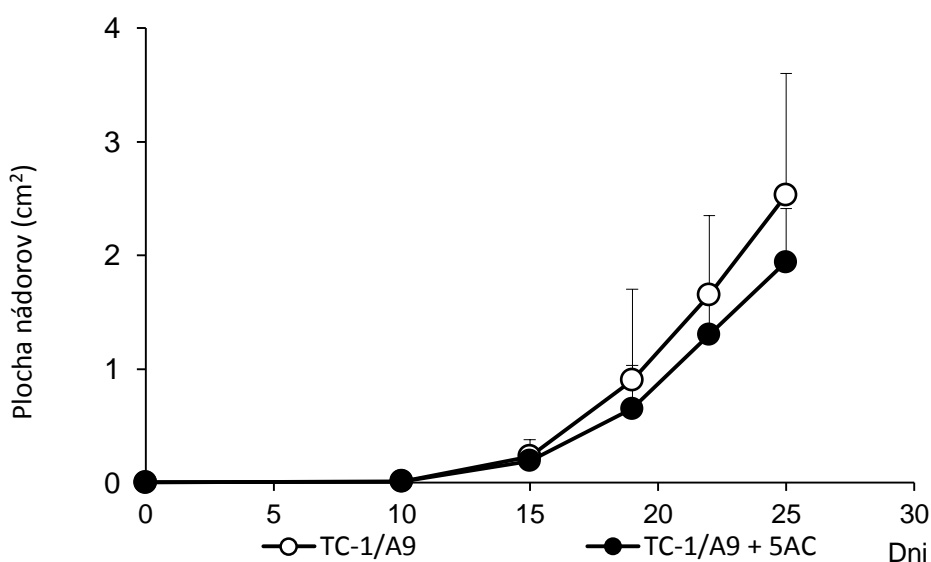
Obr.15: Relatívna zmena expresie imunoregulačných génov v mikroprostredí TRAMP-C2 po liečbe 5AC



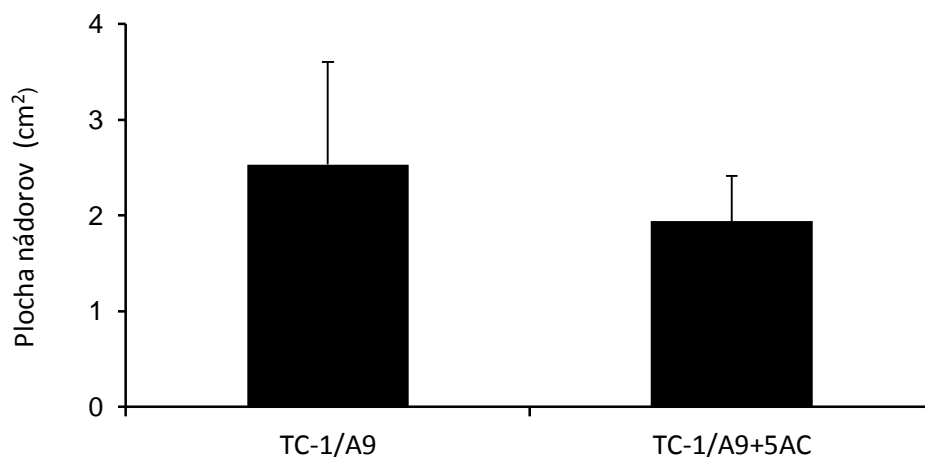
8.2.2 Vplyv epigenetickej liečby 5-azacytidínom na mikroprostredie nádorov TC-1/A9

Na Obr. 16 je znázornená rastová krivka kontrolných nádorov TC-1/A9 a nádorov liečených 5AC. Ukazuje účinok 5AC, ktorý bol v sérii pokusov podávaný rovnako ako u TRAMP-C2 nádorov a to k hmatateľným nádorom subkutánne, peritumorálne trikrát týždenne v dávke 100 $\mu\text{g}/\text{myš}$. Dané krivky ukazujú vplyv 5AC, ktorý spôsobuje nesignifikantnú inhibíciu rastu. Na Obr. 17 je zobrazená ich plocha po odobraní z myší, ktorá ukazuje, že 5AC nemal signifikantný vplyv na spomalenie rastu nádorov TC-1/A9 v porovnaní s nádormi TRAMP-C2 (Obr. 6 a Obr. 7). Experimenty boli robené na troch nádoroch v každej skupine. S liečbou sa začalo v 12. deň a nádory boli odstránené v 25. deň.

Obr. 16: Veľkosť nádorov TC-1/A9 po terapii 5AC

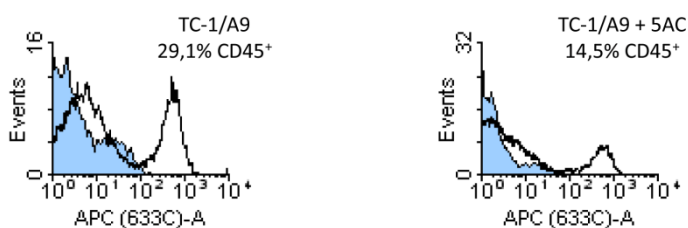


Obr. 17: Plocha nádorov TC-1/A9 po ich odobraní z myší po terapii 5AC

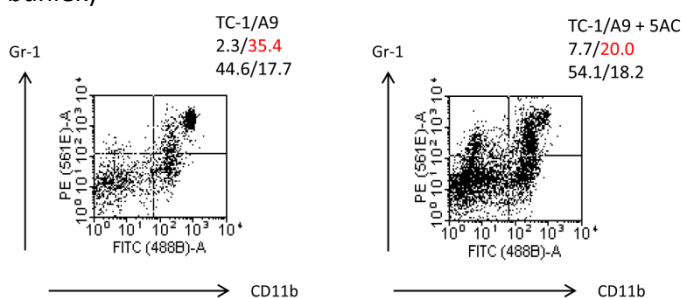


Analýza nádor-infiltrujúcich buniek u TC-1/A9 nádorov potvrdila účinok 5AC na TIL, ktorý bol pozorovaný u TRAMP-C2. Nastalo zníženie ich percentuálneho zastúpenia aj keď nedochádza k spomaleniu rastu počas terapie. Po jeho aplikácii došlo k zníženiu CD45⁺ buniek z 29,1% na 14,5% infiltrujúcich imunocytov, čo je približne polovica (Obr. 18). Z frakcie separovaných CD45⁺ buniek kleslo percentuálne zastúpenie Gr-1⁺/CD11b⁺ buniek z 35% na 20% v priebehu terapie 5AC (Obr. 19). Analýza CD4⁺ a CD8⁺ buniek sa nerobila, vzhľadom k množstvu pod 1%. 5AC spôsobil mierne zvýšenie percentuálneho zastúpenia CD11c⁺ buniek zo 6,8% v mikroprostredí neliečených nádorov na 8,3% CD11c⁺ buniek v mikroprostredí TC-1/A9 nádoroch liečených 5AC (Obr.20). Výsledky sú získané z troch nádorov v každej skupine. Pre analýzu na prietokovej cytometrii boli nádory z každej skupiny spojené do jednej vzorky.

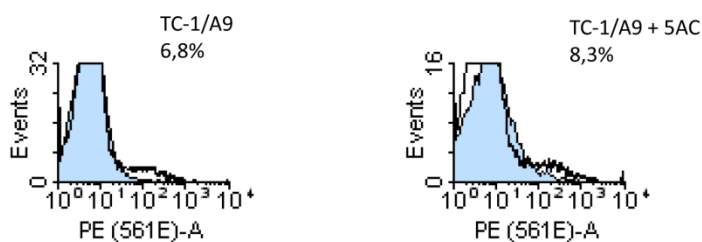
Obr. 18: Percentuálne zastúpenie CD45⁺ buniek v mikroprostredí nádorov TC1/A9 pred a po liečbe 5AC



Obr. 19: Percentuálne zastúpenie Gr-1⁺/CD11b⁺ buniek v mikroprostredí nádorov TC1/A9 pred a po liečbe 5AC (z CD45⁺ buniek)



Obr. 20: Percentuálne zastúpenie CD11c⁺ buniek v mikroprostredí nádorov TC1/A9 pred a po liečbe 5AC (z CD45⁺ buniek)



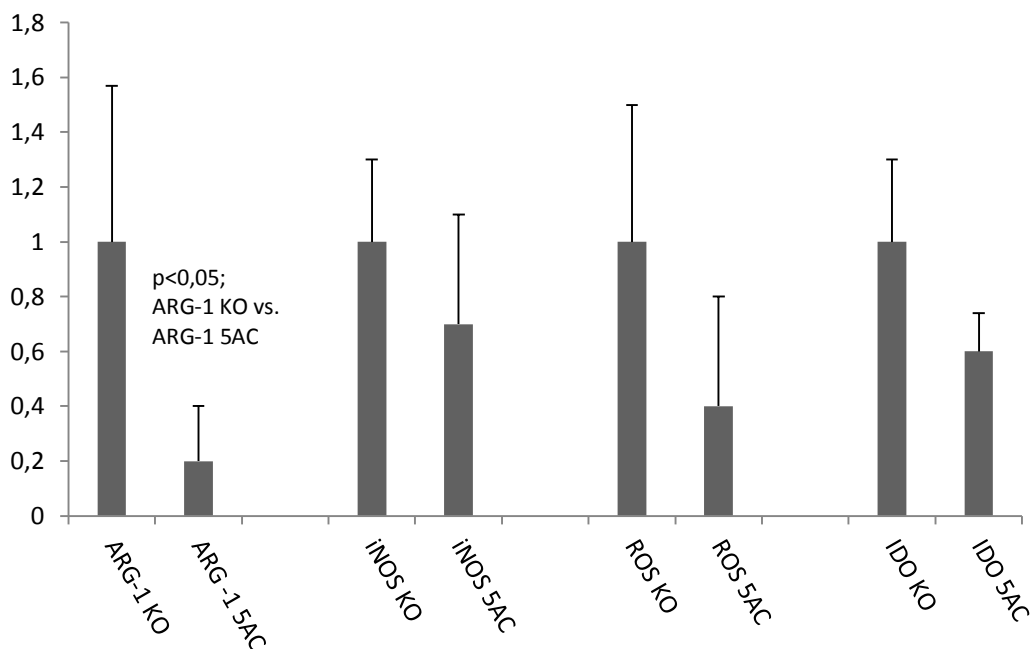
Terapia 5AC priniesla podobne ako u TRAMP-C2 aj u nádorov TC-1/A9 signifikantné zníženie ($p < 0,05$) relatívnej expresie génu pre ARG-1. Zníženie expresie ďalších vybraných supresorových génov pre iNOS, ROS, IDO nebolo signifikantné (Obr. 21). Výsledky ukazujú imunostimulačný efekt 5AC. Zníženie expresie týchto génov koreluje so zníženou infiltráciou MDSC.

Ani v prípade týchto nádorov, nemal 5AC vplyv na expresiu génov typických pre T lymfocyty. Nedochádzalo k zmene relatívnej expresie génov pre CD4, CD8 a ani FoxP3 (Obr. 22), čo aj potvrdzovali výsledky z prietokovej cytometrie, ktoré poukazovali na fakt, že v mikroprostredí bola infiltrácia pomocnými a cytotoxickými T lymfocyty len približne okolo 1% (data nezobrazené).

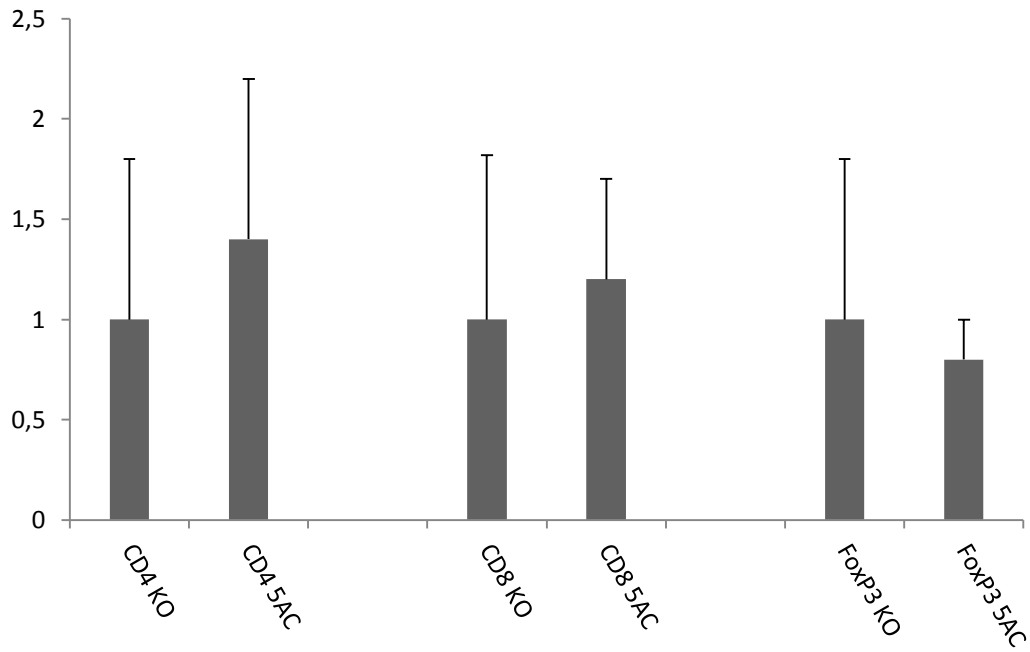
Dalo by sa povedať, že epigenetická liečba 5AC spôsobila mierne zvýšenie expresie imunoregulačných génov pre cytokíny IL-4 a IL-12 (Obr. 23), čo sú cytokíny významné svojimi stimulačnými účinkami pre imunitný systém a protinádorovú odpoveď. Tiež došlo k zvýšeniu expresie IFN γ . No vzhľadom k veľkým odchýlkam, tieto výsledky neboli signifikantné.

Pokusy boli robené na biologických tripletoch.

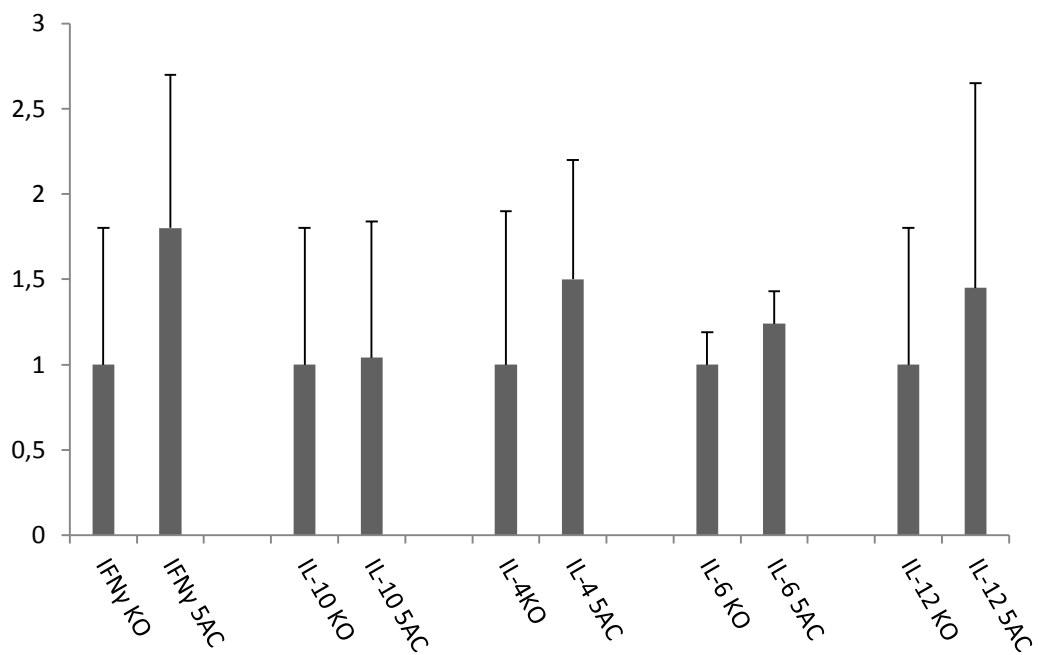
Obr. 21: Relatívna zmena expresie imunosupresorových génov v mikroprostredí nádorov TC-1/A9 po liečbe 5AC



Obr. 22: Relatívna zmena expresie génov určujúcich bunkové populácie lymfoidnej rady v mikroprostredí TRAMP-C2 po liečbe 5AC



Obr. 23: Relatívna zmena expresie imunoregulačných génov v mikroprostredí TC-1/A9 po liečbe 5AC



8.3 Vplyv CY a kombinovanej terapie na mikroprostredie

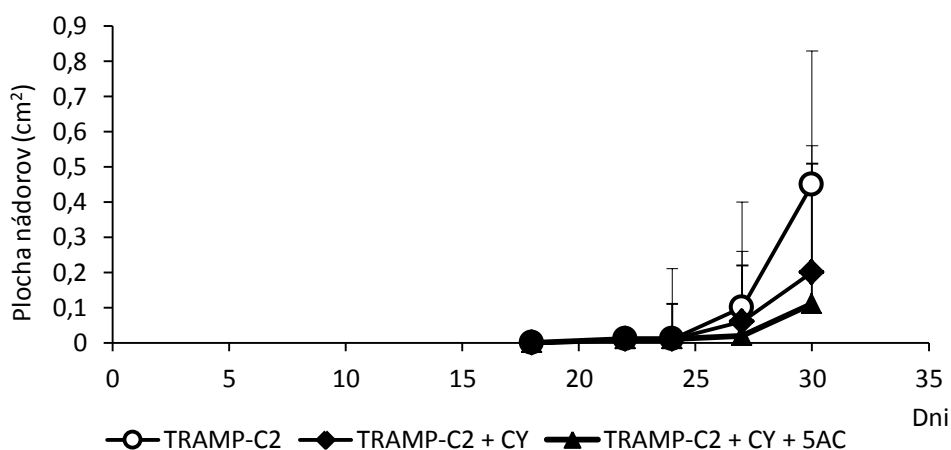
nádorov

8.3.1 Vplyv CY a kombinovanej terapie CY+5AC na mikroprostredie

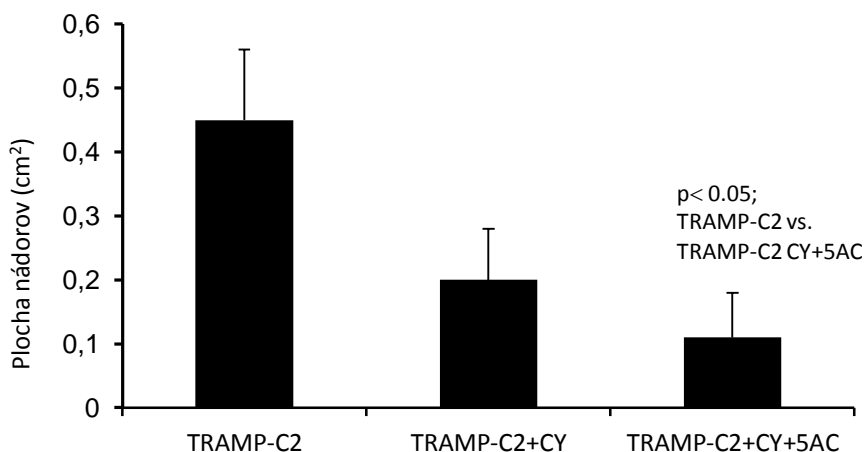
TRAMP-C2 nádorov

Rastová krivka kontrolných nádorov TRAMP-C2, nádorov liečených CY a nádorov liečených CY+5AC ukazuje na fakt, že pri kombinovanej terapii hmatateľných rastúcich nádorov pomocou CY+5AC došlo k ešte väčšiemu spomaleniu rastu v porovnaní s monoterapiou (Obr. 24) a že veľkosť odobraných liečených nádorov bola signifikantne ($p < 0,05$) menšia ako neliečené nádory TRAMP-C2 (Obr. 25). Myšiam nesúce nádory bola podaná peritoneálne jednorazová dávka cyklofosfamidu (200mg/kg, 22. deň) a potom trikrát týždenne im bol podávaný 5-azacytidín intratumorálne (od 27 dňa, 100 μ g/myš). Pokusy boli robené na biologických tripletoch, odobrané v 30. deň po injektovaní.

Obr. 24: Veľkosť nádorov TRAMP-C2 počas terapie CY a kombinovanej terapie CY+5AC



Obr.25: Plocha nádorov TRAMP-C2 po odobraní z myší po terapii CY a kombinovanej terapii CY + 5AC



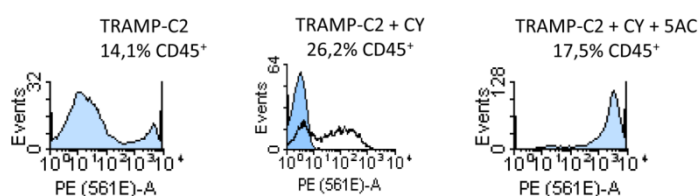
Percentuálne zastúpenie CD45⁺ (Obr. 26) buniek preukazuje účinok CY, ktorý vo vyššej dávke má imunosupresorové účinky (200mg/kg) a spôsobuje vyššiu akumuláciu imunocytov v mikroprostredí nádorov. Neliečené nádory boli infiltrované 14,1% CD45⁺ bunkami po terapii cyklofosamidom ich percentuálne zastúpenie stúplo na 26,2% a po kombinovanej terapii ich bolo 17,5%. CD45⁺ bunky boli oddelené na magnetickom separátore AutoMACS Pro a následne analyzované ďalšie bunkové populácie. Vplyv cyklofosfamidu je viditeľný najmä u MDSC. Ich percentuálne zastúpenie stúplo z 25,7% na 42,8% z celkového množstva CD45⁺ TIL po liečbe CY. Po kombinovanej terapii sa ich percentuálne zastúpenie znížilo na 29,6% (Obr. 28). Ich percentuálne zastúpenie poukazuje na fakt, že aj keď je k nádorom liečeným CY pridávaný 5AC, tak stále prevládajú účinky CY, ale nie v takej miere ako keď bol aplikovaný samotný.

Pri kombinovaných terapiách bola robená analýza aj F4/80⁺ bunky, čo je jedným zo znakov pre makrofágy (Obr. 30). Mono- aj kombinovaná terapia spôsobili len mierne zníženie ich percentuálneho zastúpenia.

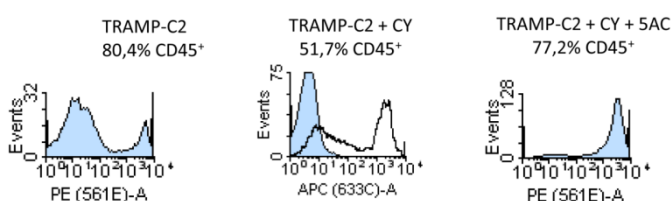
CY pôsobil aj na CD11⁺ bunky (Obr. 29). Po jeho samostatnej aplikácii sa ich infiltrácia zvýšila a po kombinácii s 5AC došlo k zníženiu ich percentuálneho zastúpenia. U neliečených nádoroch bol ich množstvo 10,8%. Po liečení CY stúplo ich percentuálne zastúpenie na 17,1% a kombinovaná terapia spôsobila ich zvýšenie oproti kontrolným nádorom na 14,3%.

V mikroprostredí sa opäť nenašli takmer žiadne CD4⁺ bunky (Obr. 32). Bolo prítomných približne 10% CD8⁺ T lymfocytov (Obr. 31). Terapia spôsobila zníženie ich počtu na cca 2%. Analýza bola robená z troch nádorov v každej skupine spojených do jednej vzorky.

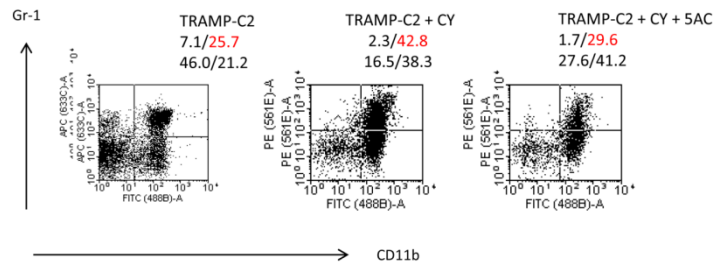
Obr.26: : Percentuálne zastúpenie CD45⁺ buniek v mikroprostredí nádorov TRAMP-C2 pred a po liečbe monoterapiou CY a kombinovanou terapiou CY+ 5AC



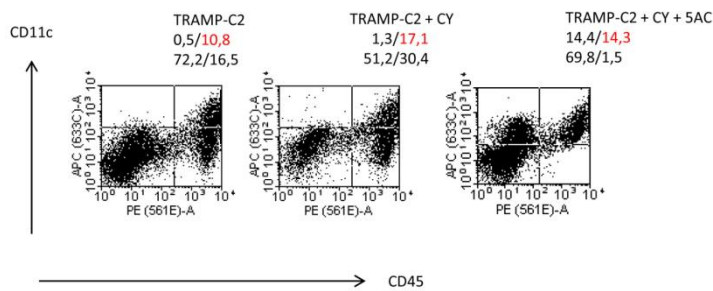
Obr. 27: Frakcia CD45⁺ buniek v mikroprostredí nádorov TRAMP-C2 pred a po liečbe monoterapiou CY a kombinovanou terapiou CY+ 5AC po separácii na magnetickom separátore AutoMACS Pro



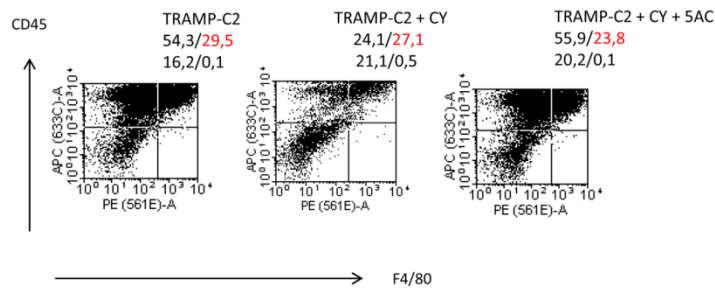
Obr. 28: Percentuálne zastúpenie CD45⁺/CD11b⁺ buniek v mikroprostredí nádorov TRAMP-C2 pred a po liečbe monoterapiou CY a kombinovanou terapiou CY+5AC



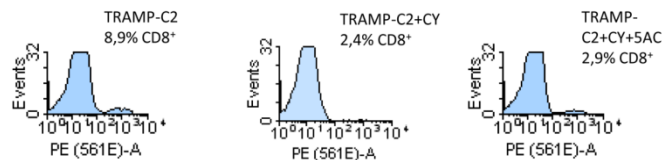
Obr. 29: Percentuálne zastúpenie CD45⁺/CD11c⁺ buniek v mikroprostredí nádorov TRAMP-C2 pred a po liečbe monoterapiou CY a kombinovanou terapiou CY+ 5AC



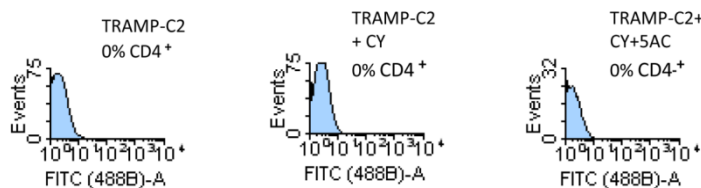
Obr. 30: Percentuálne zastúpenie CD45⁺/F4/80⁺ buniek v mikroprostredí nádorov TRAMP-C2 pred a po liečbe monoterapiou CY a kombinovanou terapiou CY+ 5AC



Obr. 31: Percentuálne zastúpenie CD8⁺ buniek v mikroprostredí nádorov TRAMP-C2 pred a po liečbe monoterapiou CY a kombinovanou terapiou CY+ 5AC



Obr. 32: Percentuálne zastúpenie CD4⁺ buniek v mikroprostredí nádorov TRAMP-C2 pred a po liečbe monoterapiou CY a kombinovanou terapiou CY+ 5AC

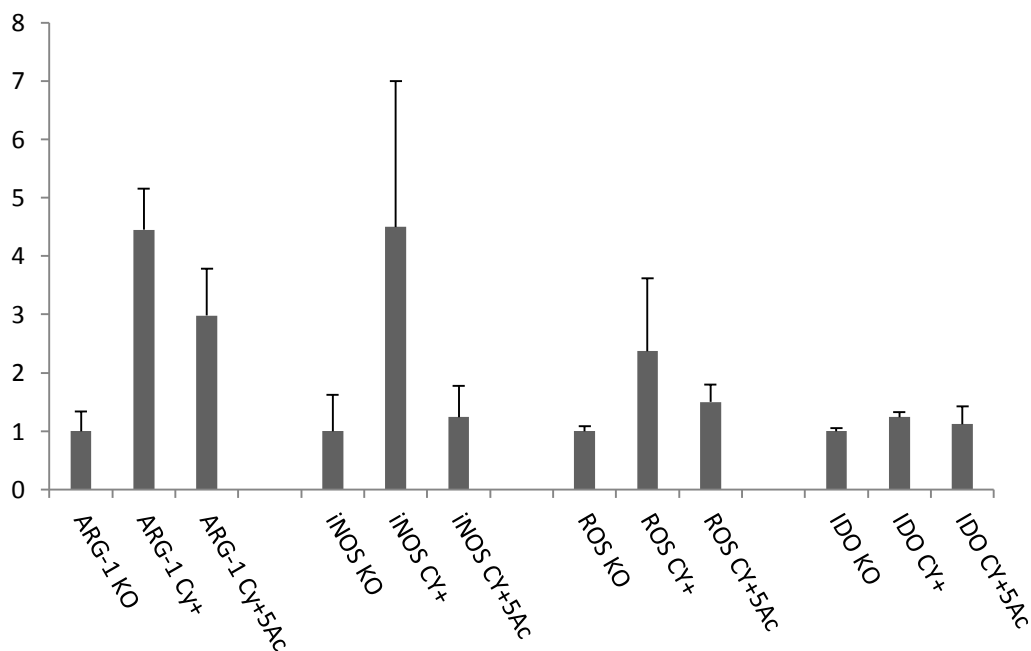


Terapia cyklofosfamidom spôsobuje akumuláciu MDSC a tým aj zvýšenú expresiu supresorových génov pre ARG-1, iNOS, ROS, IDO. Pridávaný 5AC zmiernil jeho účinky potláčajúce imunitu a spôsobil pokles expresie týchto génov, no stále bola hladina expresie týchto génov zvýšená oproti kontrolným nádorom (Obr. 33). Po aplikácii CY došlo k významnému zvýšeniu expresie ($p < 0,05$) u génov pre ARG-1 a iNOS. Zníženie po 5AC nebolo významné.

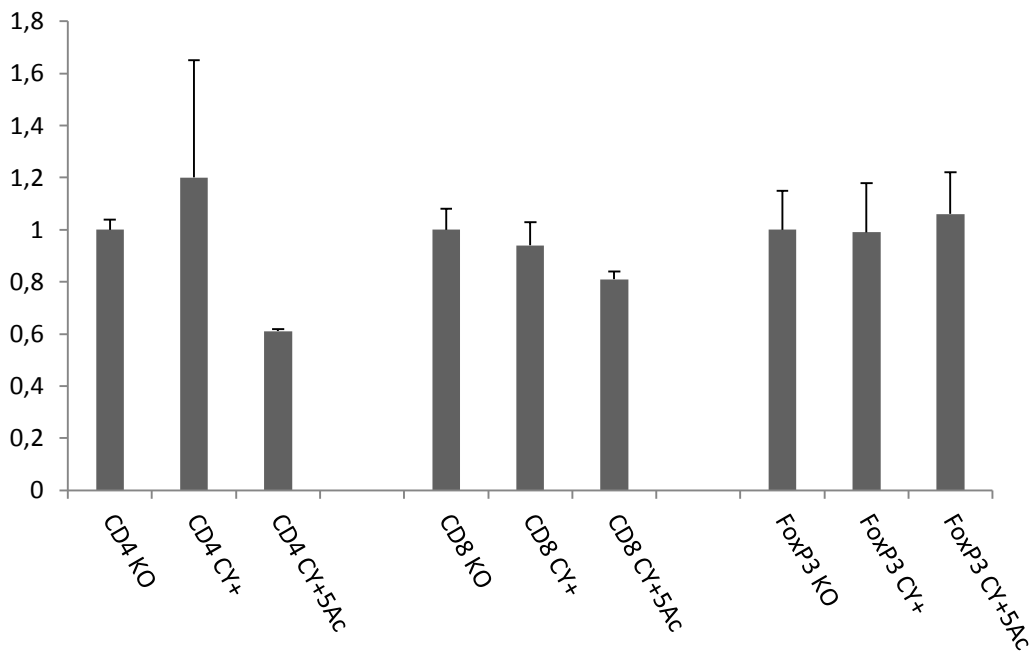
Ani chemoterapia pomocou CY nepriniesla žiadne zmeny v expresii génov pre povrchové znaky CD4, CD8 či FoxP3. Kombinovaná terapia mala vplyv akurát na expresiu typického povrchového znaku pre pomocné T bunky. Expresia génu pre CD4 sa znížila, no analýza na prietokovom cytometri nepreukázala, že $CD4^+$ boli vôbec prítomné v mikroprostredí (Obr. 34).

Monoterapia a ani kombinovaná terapia nepriniesla výraznú zmenu v expresii génov pre cytokíny IFN γ , IL-4 a IL-12. CY mal vplyv na expresiu génov pre supresorové cytokíny a to na IL-6 a IL-10. Nastalo ich nesignifikantné zvýšenie aj keď v prípade IL-10 veľmi výrazné zvýšenie. Na IL-6 pôsobila kombinovaná terapia znížením expresie, no na IL-10 nemala vplyv (Obr. 35). Celková RNA bola získaná z troch nádorov v každej skupine.

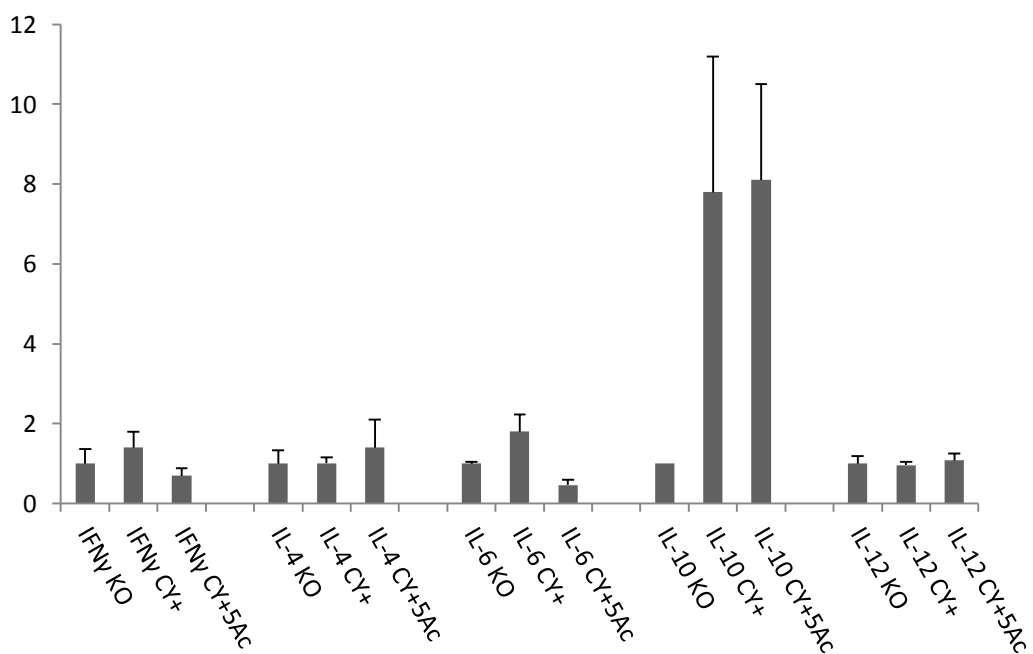
Obr. 33: Relatívna zmena expresia imunosupresorových génov v mikroprostredí nádorov TRAMP-C2 po liečbe monoterapiou CY a kombinovanou terapiou CY+ 5AC



Obr. 34: Relatívna zmena expresie génov určujúcich bunkové populácie lymfoidnej rady v mikroprostredí TRAMP-C2 po monoterapii CY a kombinovanej terapii CY+5AC



Obr. 35: Relatívna zmena expresie génov určujúcich bunkové populácie lymfoidnej rady v mikroprostredí TRAMP-C2 po monoterapii CY a kombinovanej terapii CY+5AC



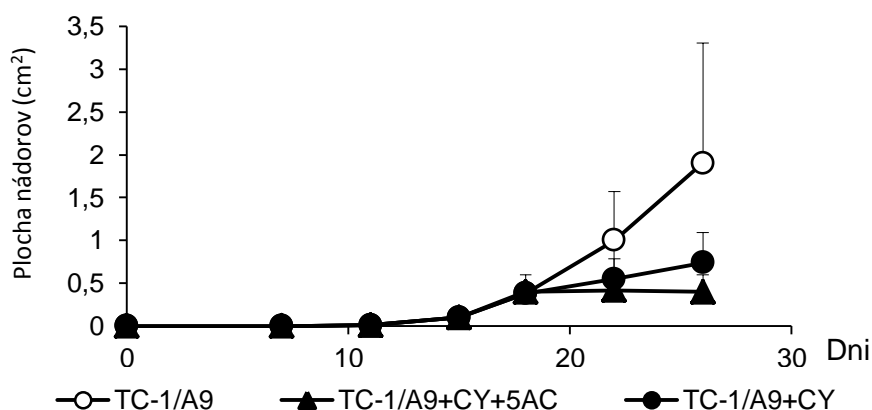
8.3.2 Vplyv CY a kombinovanej terapie CY+5AC na mikroprostredie

TC-1/A9 nádorov

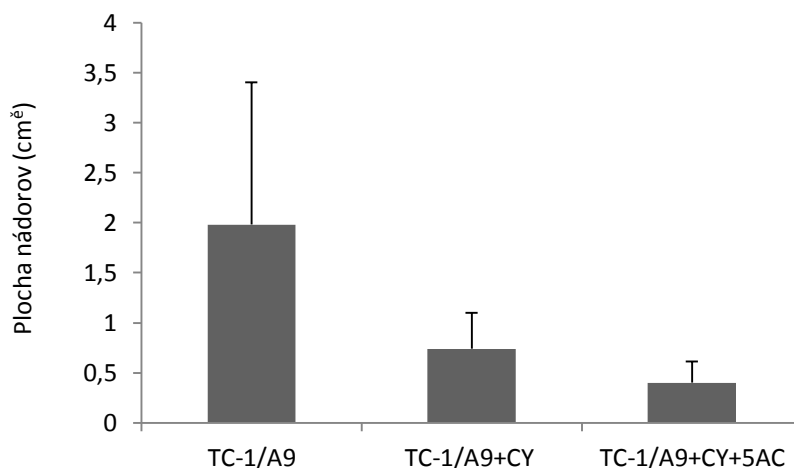
Na rastovej krivke kontrolných nádorov TC-1/A9, nádorov liečených CY a nádorov liečených CY+5AC je viditeľné, že pri kombinovanej terapii hmatateľných rastúcich nádorov pomocou CY+5AC došlo k výraznejšiemu spomaleniu rastu v porovnaní s monoterapiou (Obr. 36). Nádory boli liečené rovnakým spôsobom ako TRAMP-C2. Bola im podaná jednorazová dávka cyklofosfamidu (200mg/kg, 11 deň) a potom trikrát týždenne im bol podávaný 5-azacytidín (100µg/myš, začiatok terapie v 18.deň). Pokusy boli robené na biologických tripletoch a odoberané v 25. deň po injektovaní.

Na Obr. 37 je zobrazená plocha nádorov po odoberaní. Je viditeľné, že nádory TC-1/A9 liečené kombinovanou terapiou sú výrazne menšie ako nádory neliečené. Nádory liečené CY dosiahli veľkosti nachádzajúcej sa medzi nádormi neliečenými a nádormi liečenými kombinovanou terapiou.

Obr. 36: Veľkosť nádorov TC-1/A9 počas liečby monoterapiou CY a kombinovanou terapiou CY+5AC



Obr.37: Plocha nádorov TC-1/A9 po odoberaní z myší po terapii CY a kombinovanej terapii CY + 5AC

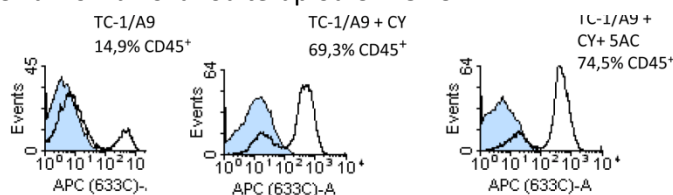


CY zvýšil infiltráciu CD45⁺ buniek zo 14,9% na 69,3% v mikroprostredí TC-1/A9 nádoroch a kombinovaná terapia ich percentuálne zastúpenie ešte dokonca zvýšila na 74,5% (Obr. 38). Okrem cytostatického účinku má CY vo vyšších dávkach (200mg/kg) imunosupresorové účinky a spôsobuje vyššiu akumuláciu niektorých populácií CD45⁺ buniek. Viditeľné je to najmä u MDSC, keď sa ich infiltrácia zvýšila zo 6,2% na 35,9%. Kombinovaná terapia priniesla zníženie ich infiltrácie na 19,5% v porovnaní s nádormi liečenými CY (Obr. 40). Ukázalo sa, že aj keď je k TC-1/A9 nádorom liečeným CY pridávaný 5AC, tak stále prevládajú účinky CY, v prípade MDSC došlo k zmierneniu týchto akumulačných účinkov MDSC (Obr. 40) oproti nádorom liečeným monoterapiou.

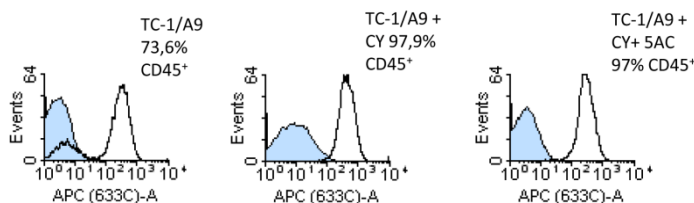
Analýza expresie znaku F4/80 ukázala, že aj terapia CY aj kombinácia CY s 5AC zvýšila expresiu daného znaku (Obr. 42). CY pôsobil aj na DC (Obr. 41). Ich počet sa zvýšil jak po monoterapii, tak aj po kombinovanej terapii.

Bola robená aj analýza prítomnosti CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocytov v mikroprostredí. CD4⁺ neboli prítomné a CD8⁺ len v množstve 1,5% a po terapii neboli prítomné takmer vôbec (data nezobrazené). Analýza bola robená na troch spojených nádoroch do jednej vzorky.

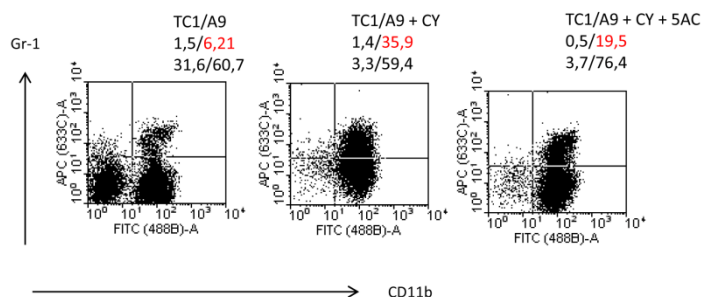
Obr. 38: Percentuálne zastúpenie CD45⁺ buniek v mikroprostredí nádorov TC1/A9 pred a po liečbe monoterapiou CY a kombinovanou terapiou CY+ 5AC



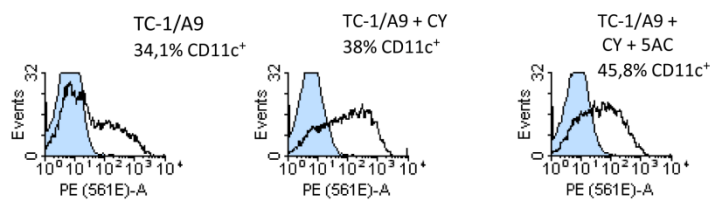
Obr. 39: Frakcia CD45⁺ buniek v mikroprostredí nádorov TC1/A9 pred a po liečbe monoterapiou CY a kombinovanou terapiou CY+ 5AC po separácii na magnetickom separátore AutoMACS



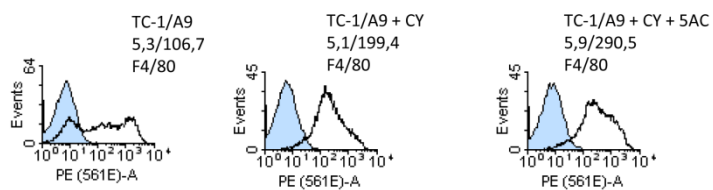
Obr.40: Percentuálne zastúpenie Gr-1⁺/CD11b⁺ buniek v mikroprostredí nádorov TC1/A9 pred a po liečbe monoterapiou CY a kombinovanou terapiou CY+ 5AC



Obr. 41: Percentuálne zastúpenie CD11c⁺ buniek v mikroprostredí nádorov TC1/A9 pred a po liečbe monoterapiou CY a kombinovanou terapiou CY+ 5AC



Obr. 42: : Expresia F4/80 znaku v mikroprostredí nádorov TC1/A9 pred a po liečbe monoterapiou CY a kombinovanou terapiou CY+ 5AC

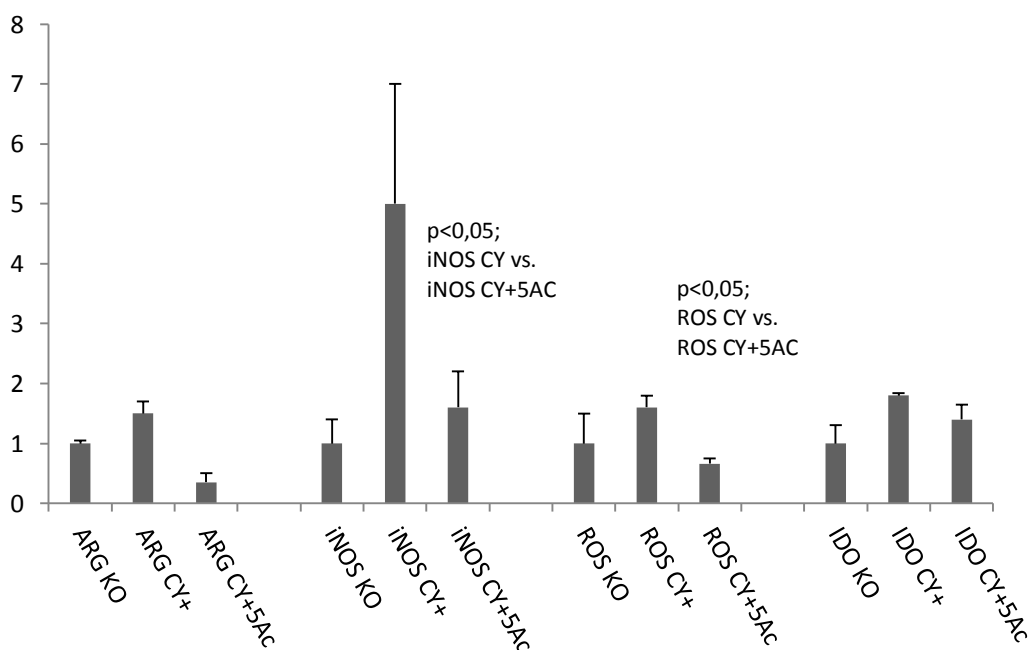


Terapia cyklofosfamidom spôsobuje akumuláciu MDSC a TAM a tým aj zvýšenú expresiu supresorových génov. Pridávaný 5AC zmiernil jeho supresorové účinky a táto kombinácia spôsobila pokles expresie týchto génov. Po kombinovanej terapii nastala významná zmena ($p < 0,05$) v expresii génov pre iNOS a ROS (Obr. 43).

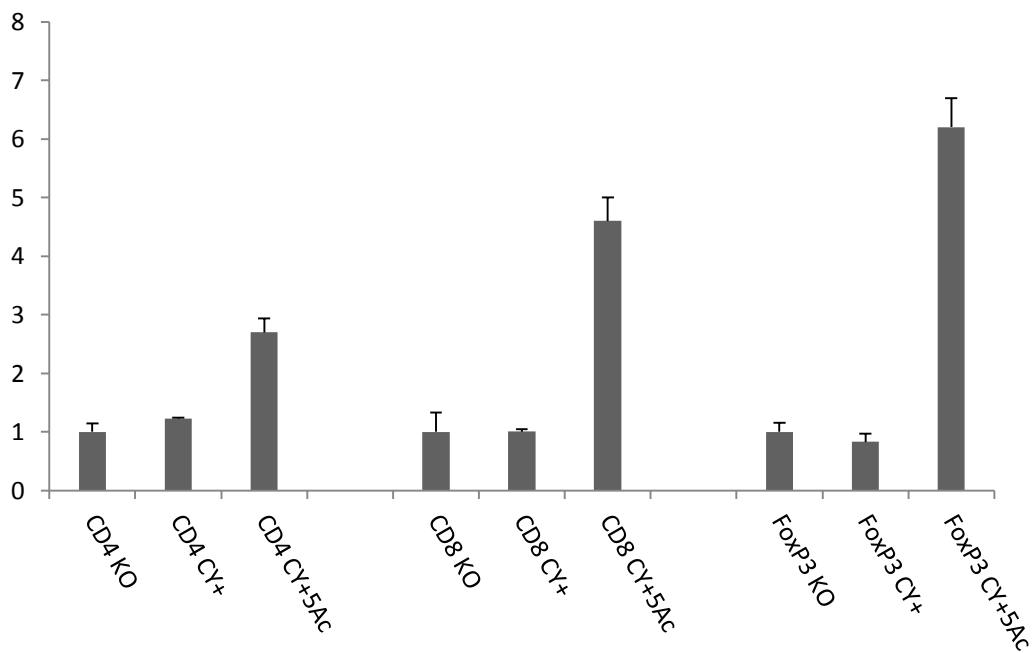
Obr. 44 ukazuje, že monoterapia nepriniesla takmer žiadne zmeny v expresii génov pre znaky charakteristické pre T lymfocyty (CD4, CD8, FoxP3), no kombinácia 5AC a CY priniesla jej zvýšenie, čo nekoreluje s výsledkami z prietokovej cytometrie, kde nebola zaznamenaná prítomnosť pomocných T lymfocytov. Ani cytotoxické lymfocyty neboli prítomné v mikroprostredí nádorov TC-1/A9 po terapii.

Na Obr. 45 je graf, ktorý zobrazuje vplyv terapie na zmenu expresie imunoregulačných génov. Monoterapia pomocou CY priniesla veľmi malú, takmer zmenu expresie. Kdežto kombinovaná terapia spôsobila nesignifikantné zvýšenie expresie génov pre cytokíny IFN γ , IL-4 a IL-12. V prípade cytokínu IL-12 veľmi výrazne. Pri porovnaní s grafom na Obr. 23, kde je sledovaná zmena expresie po samotnom 5AC, môžeme vidieť, že zmena expresie nastala v tých istých génoch pre cytokíny. Analýza bola robená z celkovej RNA izolovanej z troch nádorov v každej skupine.

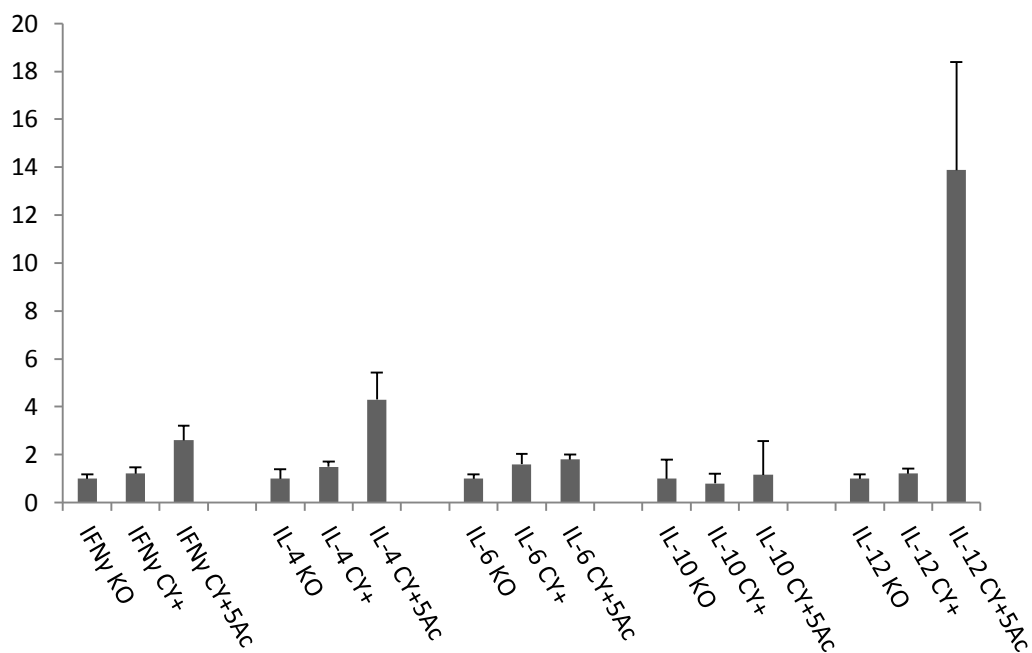
Obr. 43: Relatívna zmena expresie imunosupresorových génov v mikroprostredí TC-1/A9 po monoterapii CY a kombinovanej terapii CY+5AC



Obr. 44: Relatívna zmena expresie génov určujúcich bunkové populácie lymfoidnej rady v mikroprostredí TC-1/A9 po monoterapii CY a kombinovanej terapii CY+5AC



Obr. 45: Relatívna zmena expresie imunoregulačných génov v mikroprostredí TC-1/A9 po monoterapii CY a kombinovanej terapii CY+5AC



9. Diskusia

V priebehu progresie nádorov a ich chemo- alebo imunoterapie dochádza k zmenám v aktivite jednotlivých bunkových populácií infiltrujúcich nádory. To je spojené so zmenami v expresii génov charakteristických pre tieto populácie, prípadne kódujúce proteíny, ktoré sprostredkovávajú imunosupresiu alebo naopak efektívnu protinádorovú odpoveď.

Cieľom našej práce bolo vypracovať na dvoch myšiacich modeloch metodiku monitoringu rastu a terapie experimentálnych nádorov z hľadiska sledovania dôležitých imunologických parametrov.

Boli využité dva prístupy, fenotypová analýza bunkových populácií TIL na základe ich charakteristických povrchových znakov a ďalej analýza expresie vybraných génov, kódujúcich proteíny dôležité pre imunosupresiu (ARG-1, iNOS, ROS,IDO) alebo charakterizáciu bunkových populácií s regulačnou funkciou (FoxP3, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IFN γ). Cieľom bolo ohodnotiť vplyv chemoterapie 5-azacytidínom, cyklofosfamidom a rastu na mikroprostredie nádorov TRAMP-C2 a TC-1/A9. K tomu bola použitá celková RNA izolovaná z nádorov, zahŕňajúca RNA z nádorových buniek aj z buniek strómy, vrátane TIL.

Počas rastu nádoru TRAMP-C2 dochádzalo k zvýšenej relatívnej expresii génov pre ARG-1, iNOS a ROS, no tento trend nebol pozorovaný u TC-1/A9 nádorov. ARG-1, iNOS aj ROS sú produkované v mikroprostredí nádorov a nie je jednoduché určiť z ktorého zdroja sú produkované. Preto bola pre kontrolu porovnávaná expresia týchto génov v mikroprostredí nádorov s expresiou nádorových buniek TRAMP-C2 kultivovaných *ex vivo*. Relatívna expresia génov pre ARG-1 a iNOS kultivovaných nádorových buniek TRAMP-C2 bola v porovnaní s expresiou týchto génov v *in vivo* podmienkach takmer nulová. Bolo zistené, že bunky nádoru prostaty môžu produkovať ARG-1 (Gannon et al., 2010) aj iNOS (Aaltomaa et al., 2001). V našej práci sa tieto poznatky nepotvrdili. Gén *CYBB* kóduje proteín s názvom cytochróm b-245. Ide o transmembránovú podjednotku komplexu NADPH oxidázy, dôležitého enzýmu fagocytujúcich buniek, ktoré produkujú reaktívne kyslíkové radikály ako odpoveď na prítomnosť patogénov (<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/CYBB>). Fakt, že nádory produkujú veľké množstvo ROS je známe (Szatrowski and Nathan, 1991). Bolo to pozorované aj na ľudských nádoroch prostaty (Brar et al., 2003). Naše výsledky potvrdzujú tento poznatok. Nádorové bunky kultivované *ex vivo* exprimovali podjednotku enzýmu zapojeného v produkcii ROS, ale v menšej miere ako nádory rastúce v myšiach.

5AC má veľký potenciál ako protinádorové chemoterapeutikum aj vďaka jeho vplyvu na zvýšenie imunogenicity nádorov, čím sa stávajú cieľom cytotoxických T lymfocytov (Manning et al., 2008). Keď je 5AC pridaný k malým, ešte nehmatateľným nádorom TC-1/A9, tak dochádza

k signifikantnému spomaleniu rastu oproti neliečeným kontrolám (Simova et al., 2011). Nás zaujímal jeho vplyv po liečení už hmatateľných nádorov. Došlo k výraznému spomaleniu rastu u TRAMP-C2, ale nie u TC-1/A9 nádorov. Kombinovaná terapia 5AC s cyklofosfamidom priniesla signifikantné spomalenie rastu oboch typov nádorov. Aj monoterapia CY priniesla spomalenie rastu oboch typov nádorov.

Epigenetická liečba mala vplyv na percentuálne zastúpenie CD45⁺ buniek. Došlo k ich zníženiu ako u TRAMP-C2 nádorov, tak aj u TC-1/A9. Došlo k zníženiu počtu infiltrujúcich MDSC v oboch prípadoch. U TRAMP-C2 nebola zaznamenaná výrazná prítomnosť CD4⁺, CD8⁺ a ani CD11c⁺ buniek. U TC-1/A9 neboli detegované ani CD4⁺ a ani CD8⁺ T lymfocyty, no v menšej miere boli prítomné CD11c⁺ bunky. Bolo zdokumentované, že nádor-infiltrujúce MDSC môžu diferencovať v prítomnosti demetylačného činidla 5AC (Daurkin et al., 2010) aj keď naše pozorovania izolovaných MDSC ovplyvňovaných 5AC skôr zaznamenávali jeho cytotoxický efekt pred diferenciačným. Prítomnosť dendritických buniek v mikroprostredí TC-1/A9 ešte nemusí znamenať zvýšenú aktivitu imunitného systému, keďže neboli prítomné ani pomocné ani cytotoxické lymfocyty. Pre bližšie porozumenie v budúcnosti by bolo vhodné zistiť či exprimujú kostimulačné molekuly potrebné ku krížovej prezentácii.

Cyklofosfamid bol syntetizovaný pred viac ako päťdesiatimi rokmi a je v praxi bežne používané chemoterapeutikum. Je známy aj tým, že má vo vyšších koncentráciách imunosupresorové účinky (de Jonge et al., 2005). Nás zaujímal efekt 5AC na nádory liečené CY.

Monoterapia CY zvýšila percentuálne zastúpenie CD45⁺ buniek. Došlo aj k nárastu infiltrácie MDSC. Bolo popísané, že CY spôsobuje zvýšenú akumuláciu týchto buniek a tým prispieva k zvýšeniu imunosupresorových účinkov (Angulo et al., 2000; Mikyskova et al., 2012; Pelaez et al., 2001). Naša práca tento vplyv CY potvrdila. Kombinovaná terapia spôsobila zmiernenie tohto účinku. Expresia znaku F4/80, čo je znak pre makrofágy klesla len mierne u TRAMP-C2 nádorov po terapii CY a ešte viac po CY+5AC, no u TC-1/A9 nádorov nastal opačný efekt. Po terapii CY stúpla expresia tohto znaku a po kombinácii liečiv bola táto expresia ešte vyššia. Bolo zistené, že množstvo TAM po liečbe CY stúpa a spôsobujú regresiu nádorov (Evans et al., 1984). Množstvo TAM stúpalo len u TC-1/A9 nádorov a to hlavne po liečení spolu s 5AC. No to môže byť znakom, že MDSC pod vplyvom 5AC maturujú do zreých makrofágov. Dendritické bunky sa mierne hromadili v mikroprostredí po liečbe CY u oboch typov nádorov. Kombinovaná liečba spôsobila pokles ich percentuálneho zastúpenia u TRAMP-C2 v porovnaní s monoterapiou. U TC-1/A9 kombinácia liečiv spôsobila ešte väčšie percentuálne zastúpenie CD11c⁺ buniek. Bolo zdokumentované, že po liečbe CY nastáva zvýšenie počtu buniek exprimujúcich znak CD11c⁺ v mikroprostredí nádorov (Radojicic et al., 2010), čo naša práca potvrdila len u TC-1/A9. Nádory síce boli infiltrované CD8⁺ T lymfocytmi u oboch typov nádorov, no CY spôsobil zníženie ich percentuálneho zastúpenia. Medzi účinky

cyklofosfamidu patrí aj odstránenie Treg (Machiels et al., 2001), no práca Radojčica a spol., 2010 poukázala na fakt, že po tejto deplécii dochádza opäť k ich expanzii. To môže spôsobiť nedostatok CD8⁺ T lymfocytov aj napriek faktu, že došlo k zvýšenej infiltrácii DC.

Liečba 5AC bola sprevádzaná zníženou expresiou imunosupresorových génov. Najvýraznejšia zmena nastala u génu pre ARG-1 a CYBB, zapojeného v tvorbe ROS u oboch typov nádorov. ARG-1 a iNOS sú produkované najmä MDSC (Gabrilovich and Nagaraj, 2009), ale aj TAM (Mills et al., 1992). Došlo aj k nesignifikantnému poklesu relatívnej expisie génu preIDO u oboch typov. Tieto výsledky naznačujú imunostimulačný potenciál 5AC ako u TRAMP-C2, tak i u TC-1/A9, u ktorých síce nedošlo k spomaleniu rastu, ale 5AC mal vplyv na zníženie imunosupresorových podmienok v mikroprostredí týchto nádorov. Nárast percentuálneho zastúpenia imunosupresorových buniek pri liečbe CY bol sprevádzaný so zvýšenou expresiou imunosupresorových génov u oboch nádorových typoch. Kombinovaná terapia zmiernila imunosupresorový účinok cyklofosfamidu u TRAMP-C2 aj u TC-1/A9 nádorov.

Bola sledovaná aj zmena relatívnej expisie pre gény kódujúce znaky typické pre lymfoidnú líniu u TRAMP-C2 a aj TC-1/A9 nádorov. Po liečbe 5AC nedošlo ku žiadnym zmenám. Výsledky z prietokovej cytometrie poukazujú na fakt, že CD4⁺ a ani CD8⁺ lymfocyty boli prítomné v mikroprostredí TRAMP-C2 len v obmedzenom množstve do 1%. Pri analýze pomocou RT-PCR boli Ct hodnoty daných znakov nad hodnotou 37, čo poukazuje na fakt, že danej mRNA bolo prítomnej veľmi málo v oboch prípadoch, čo odpovedá tomuto zisteniu z prietokovej cytometrie.

U TC-1/A9 nastala zmena v relatívnej expresii génov kódujúce znaky niektorých bunkových populácií. Po kombinovanej terapii došlo k výraznému nárastu relatívnej expisie génu pre FoxP3, typického znaku T regulačných lymfocytov, ale nedošlo k zvýšeniu relatívnej expisie po CY. No zároveň stúpila aj relatívna expresia génov pre CD4 a CD8 po kombinovanej terapii, čo sa nezhoduje s výsledkami, ktoré boli získané z prietokovej cytometrie. Boli zdokumentovaný vplyv CY na CD8⁺ T lymfocyty. Aj keď zvyšuje citlivosť nádorov voči cytotoxickým bunkám, paradoxne zároveň znižuje ich množstvo (van der Most et al., 2009). Tomu naše výsledky neodpovedajú, pretože CY ich percentuálne zastúpenie nemenil. Dôvodom môže byť už spomínaný fakt, že koncentrácie mRNA pre tieto znaky boli veľmi nízke, čo odpovedá malému percentu prítomných CD4⁺ a CD8⁺ buniek na prietokovom cytometri. Pri kombinovanej liečbe však percentuálne zastúpenie stúplo, čo môže byť spôsobené stimulačným vplyvom 5AC. Na druhej strane 5AC spôsobuje aj nárast expisie FoxP3 znaku (Kim and Leonard, 2007). Kombinácia CY+5AC zvýšila danú expresiu podľa našich výsledkov.

Bola pozorovaná aj zmena relatívnej expisie imunoregulačných génov pre vybrané cytokíny u oboch typov nádorov. Išlo o cytokíny známe svojou aktivačnou aktivitou IL-4, IL-10 a IFN γ a aj o cytokíny so supresorovou funkciou IL-6 a IL-10. U TRAMP-C2 po terapii 5AC došlo ku zvýšeniu

relatívnej expresie pre IL-10, cytokín intenzívne produkovaný nádorovými bunkami, TAM, MDSC aj TA-DC (Martinez et al., 2008; Sindrilaru et al., 2011; Sinha et al., 2011). U tohto výsledku bola veľká smerodajná odchýlka, čo môže byť pravdepodobne z časti aj kvôli tomu, že boli použité biologické triplety a nádor nie sú homogénne systémy. V mikroprostredí nádorov TRAMP-C2 bola zaznamenaná zvýšená relatívna expresia génu pre IL-10, ako po CY, tak aj po kombinovanej terapii. Došlo aj k miernemu zvýšeniu relatívnej expresie génu pre cytokín IL-6 po liečbe CY. No pri kombinovanej liečbe, nastal pokles. U TC-1/A9 nenastala žiadna zmena pre cytokíny po liečbe 5AC.

Boli monitorované faktory nachádzajúce sa v mikroprostredí a neurčovali sa ktoré komponenty infiltrujúce mikroprostredie, čo produkovali. Tento výsledok však môže naznačovať zvýšenú produkciu inhibičných cytokínov myeloidnými supresorovými bunkami. Cytokín IL-10 spôsobuje vytvorenie M2 fenotypu u makrofágov (Sica et al., 2002) a aj keď nedošlo k zvýšeniu ich percentuálneho zastúpenia u nádorov TRAMP-C2, tak mohlo dôjsť k ich polarizácii smerom k M2 fenotypu a tým ešte k zvýšenej produkcii tohto cytokínu a cytokínu IL-6. Zistiť priamo úlohu cytokínov nie je jednoduché kvôli ich pleiotrofným účinkom. Vždy záleží na okolitých podmienkach, iných faktoroch a prítomnosti určitých buniek. IL-10 dokáže zároveň inhibovať uvoľnenie IFN γ , cytotoxického faktoru stimulujúceho diferenciáciu T buniek (Wyckoff et al., 2004). Naše výsledky na TRAMP-C2 nádoroch toto tvrdenie podporujú. Pretože nastalo mierne zníženie expresie IFN γ po kombinovanej terapii. Relatívna expresia génu pre IL-12 sa nemenila. Tiež bolo dokázané, že IL-10 nehrá len úlohu v pronádorových účinkoch, ale má aj protinádorový efekt (Zheng et al., 1996).

V mikroprostredí TC-1/A9 nádoroch došlo k výraznej zmene v relatívnej expresii génov pre IL-12 po kombinovanej terapii. Tiež bola zvýšená expresia IFN γ a IL-4. IFN γ vplýva na repolarizáciu makrofágov k M1, ktoré produkujú vo zvýšenej miere cytokín IL-12 (Krausgruber et al., 2011). Došlo aj k zvýšeniu relatívnej expresie génu pre IL-4, cytokínu, ktorý je produkovaný najmä CD4 T lymfocytmi a o ktorom pribúdajú informácie, že je zapojený pri repolarizácii k M2 typu (Wang and Joyce, 2010).

Analýza o imunoregulačných cytokínoch prítomných v mikroprostredí nádorov bola robená metódou kvantitatívnej PCR. V budúcnosti by bolo vhodné podporiť tieto výsledky inými vhodnými metódami ako je ELISA alebo ELISPOT (The Enzyme-linked immunosorbent spot).

Táto práca prispela k bližšiemu poznaniu zloženia mikroprostredia a mechanizmov regulácie imunitnej odpovede behom terapie myšacích nádorov TRAMP-C2 a TC-1/A9. Je viditeľné, že nejde o uniformný systém a dané modely sa od seba v niektorých aspektoch líšili. Získané poznatky budú využité pre monitorovanie účinnosti rôznych imunoterapeutických protokolov.

10. Záver

Progresiu nádorov neovplyvňujú len nádorové bunky samotné, ale aj ďalšie bunkové typy, tkanivá a molekuly v okolí samotných nádorov.

V tejto diplomovej práci nás zaujímal nás vplyv terapie epigenetickým činidlom a cytostatikom 5-azacytidínom a DNA alkylačným činidlom cyklofosfamidom na zloženie týchto populácií a zmenu relatívnej expresie vybraných génov. K monitoringu zmien boli používali dve metódy, prietoková cytometria a kvantitatívna PCR.

5-azacytidín dokáže potláčať imunosupresorové podmienky prevládajúce v mikroprostredí nádorov v podobe zníženia infiltrujúcich supresorových buniek spojené so zníženou relatívnou expresiou imunosupresorových génov. Tento imunostimulačný účinok bol pozorovaný aj v mikroprostredí nádorov liečených cyklofosfamidom.

Vybrané výsledky boli prezentované na 3rd Intl Conference „Cancer Immunotherapy and Immunomonitoring (CITIM)“ Krakow, 2013 (Príloha č. 1 a Príloha č.2) a sú súčasťou pripravovanej publikácie Mikyšková et al., *DNA demethylating agent inhibits myeloid-derived suppressor cells induced by tumor growth and cyclophosphamide treatment* (Príloha č.2).

11. Zoznam použitej literatúry

Aaltomaa, S. H., Lipponen, P. K., and Kosma, V. M. (2001). Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression and its prognostic value in prostate cancer. *Anticancer Research* 21, 3101-3106.

Aimiwu, J., Wang, H. Y., Chen, P., Xie, Z. L., Wang, J., Liu, S. J., Klisovic, R., Mims, A., Blum, W., Marcucci, G., and Chan, K. K. (2012). RNA-dependent inhibition of ribonucleotide reductase is a major pathway for 5-azacytidine activity in acute myeloid leukemia. *Blood* 119, 5229-5238.

Albini, A., and Sporn, M. B. (2007). The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. *Nature Reviews Cancer* 7, 139-147.

Aller, M. A., Arias, J. L., Nava, M. P., and Arias, J. (2004). Posttraumatic inflammation is a complex response based on the pathological expression of the nervous, immune, and endocrine functional systems. *Experimental Biology and Medicine* 229, 170-181.

Angulo, I., de las Heras, F. G., Garcia-Bustos, J. F., Gargallo, D., Munoz-Fernandez, M. A., and Fresno, M. (2000). Nitric oxide-producing CD11b(+)Ly-6G(Gr-1)(+)CD31(ER-MP12)(+) cells in the spleen of cyclophosphamide-treated mice: implications for T-cell responses in immunosuppressed mice. *Blood* 95, 212-220.

Atkinson, E. A., and Bleackley, R. C. (1995). Mechanisms of lysis by cytotoxic T cells. *Critical Reviews in Immunology* 15, 359-384.

Auvinen, M., Paasinen, A., Andersson, L. C., and Holtta, E. (1992). ORNITHINE DECARBOXYLASE ACTIVITY IS CRITICAL FOR CELL-TRANSFORMATION. *Nature* 360, 355-358.

Balkwill, F., Charles, K. A., and Mantovani, A. (2005). Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 7, 211-217.

Balkwill, F., and Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357, 539-545.

Baxevasis, C. N., Dedoussis, G. V. Z., Papadopoulos, N. G., Missitzis, I., Stathopoulos, G. P., and Papamichail, M. (1994). TUMOR-SPECIFIC CYTOLYSIS BY TUMOR-INFILTRATING LYMPHOCYTES IN BREAST-CANCER. *Cancer* 74, 1275-1282.

Benencia, F., Sprague, L., McGinty, J., Pate, M., and Muccioli, M. (2012). Dendritic Cells The Tumor Microenvironment and the Challenges for an Effective Antitumor Vaccination. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*.

Bindea, G., Mlecnik, B., Fridman, W. H., Pages, F., and Galon, J. (2010). Natural immunity to cancer in humans. *Current Opinion in Immunology* 22, 215-222.

Bobe, P., Benihoud, K., Grandjon, D., Opolon, P., Pritchard, L. L., and Huchet, R. (1999). Nitric oxide mediation of active immunosuppression associated with graft-versus-host reaction. *Blood* 94, 1028-1037.

Botnick, L. E., Hannon, E. C., and Hellman, S. (1976). LIMITED PROLIFERATION OF STEM-CELLS SURVIVING ALKYLATING-AGENTS. *Nature* 262, 68-70.

Brar, S. S., Corbin, Z., Kennedy, T. P., Hemendinger, R., Thornton, L., Bommarius, B., Arnold, R. S., Whorton, A. R., Sturrock, A. B., Huecksteadt, T. P., *et al.* (2003). NOX5 NAD(P)H oxidase regulates growth and apoptosis in DU 145 prostate cancer cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 285, C353-C369.

Bronte, V., Apolloni, E., Cabrelle, A., Ronca, R., Serafini, P., Zamboni, P., Restifo, N. P., and Zanovello, P. (2000). Identification of a CD11b(+)/Gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+) T cells. *Blood* 96, 3838-3846.

Bronte, V., Wang, M., Overwijk, W. W., Surman, D. R., Pericle, F., Rosenberg, S. A., and Restifo, N. P. (1998). Apoptotic death of CD8(+) T lymphocytes after immunization: Induction of a suppressive population of Mac-1(+)/Gr-1(+) cells. *Journal of Immunology* 161, 5313-5320.

Bunt, S. K., Yang, L., Sinha, P., Clements, V. K., Leips, J., and Ostrand-Rosenberg, S. (2007). Reduced inflammation in the tumor microenvironment delays the accumulation of myeloid-derived suppressor cells and limits tumor progression. *Cancer Research* 67, 10019-10026.

- Cauley, L. S., Miller, E. E., Yen, M., and Swain, S. L. (2000). Superantigen-induced CD4 T cell tolerance mediated by myeloid cells and IFN-gamma. *Journal of Immunology* *165*, 6056-6066.
- Colvin, O. M. (1999). An overview of cyclophosphamide development and clinical applications. *Current Pharmaceutical Design* *5*, 555-560.
- Conejo-Garcia, J. R., Benencia, F., Coureges, M. C., Kang, E., Mohamed-Hadley, A., Buckanovich, R. J., Holtz, D. O., Jenkins, A., Na, H. N., Zhang, L., *et al.* (2004). Tumor-infiltrating dendritic cell precursors recruited by a beta-defensin contribute to vasculogenesis under the influence of Vegf-A. *Nature Medicine* *10*, 950-958.
- Constantinides, P. G., Jones, P. A., and Gevers, W. (1977). FUNCTIONAL STRIATED-MUSCLE CELLS FROM NON-MYOBLAST PRECURSORS FOLLOWING 5-AZACYTIDINE TREATMENT. *Nature* *267*, 364-366.
- Curiel, T. J., Cheng, P., Mottram, P., Alvarez, X., Moons, L., Evdemon-Hogan, M., Wei, S., Zou, L. H., Kryczek, I., Hoyle, G., *et al.* (2004). Dendritic cell subsets differentially regulate angiogenesis in human ovarian cancer. *Cancer Research* *64*, 5535-5538.
- Daurkin, I., Eruslanov, E., Vieweg, J., and Kusmartsev, S. (2010). Generation of antigen-presenting cells from tumor-infiltrated CD11b myeloid cells with DNA demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Immunology Immunotherapy* *59*, 697-706.
- de Jonge, M. E., Huitema, A. D. R., Rodenhuis, S., and Beijnen, J. H. (2005). Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide. *Clinical Pharmacokinetics* *44*, 1135-1164.
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology* *3*, 991-998.
- Elkabetz, M., Ribeiro, V. S. G., Dinarello, C. A., Ostrand-Rosenberg, S., Di Santo, J. P., Apte, R. N., and Vosshenrich, C. A. J. (2010). IL-1 beta regulates a novel myeloid-derived suppressor cell subset that impairs NK cell development and function. *European Journal of Immunology* *40*, 3347-3357.
- Emadi, A., Jones, R. J., and Brodsky, R. A. (2009). Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nature Reviews Clinical Oncology* *6*, 638-647.
- Esendagli, G., Bruderek, K., Goldmann, T., Busche, A., Branscheid, D., Vollmer, E., and Brandau, S. (2008). Malignant and non-malignant lung tissue areas are differentially populated by natural killer cells and regulatory T cells in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* *59*, 32-40.
- Evans, R., Duffy, T., and Cullen, R. T. (1984). TUMOR-ASSOCIATED MACROPHAGES STIMULATE THE PROLIFERATION OF MURINE TUMOR-CELLS SURVIVING TREATMENT WITH THE ONCOLYTIC CYCLOPHOSPHAMIDE ANALOG ASTA Z-7557 - INVIVO IMPLICATIONS. *International Journal of Cancer* *34*, 883-890.
- Fainaru, O., Almog, N., Yung, C. W., Nakai, K., Montoya-Zavala, M., Abdollahi, A., D'Amato, R., and Ingber, D. E. (2010). Tumor growth and angiogenesis are dependent on the presence of immature dendritic cells. *Faseb Journal* *24*, 1411-1418.
- Foster, B. A., Gingrich, J. R., Kwon, E. D., Madias, C., and Greenberg, N. M. (1997). Characterization of prostatic epithelial cell lines derived from transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate (TRAMP) model. *Cancer Research* *57*, 3325-3330.
- Gabrilovich, D. I. (2009). Myeloid-derived Suppressor Cells and Tumor Microenvironment. *Journal of Immunotherapy* *32*, 987-988.
- Gabrilovich, D. I., and Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nature Reviews Immunology* *9*, 162-174.
- Gabrilovich, D. I., Velders, M. P., Sotomayor, E. M., and Kast, W. M. (2001). Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1(+) myeloid cells. *Journal of Immunology* *166*, 5398-5406.
- Gannon, P. O., Godin-Ethier, J., Hassler, M., Delvoe, N., Aversa, M., Poisson, A. O., Peant, B., Fahmy, M. A., Saad, F., Lapointe, R., and Mes-Masson, A. M. (2010). Androgen-Regulated Expression of Arginase 1, Arginase 2 and Interleukin-8 in Human Prostate Cancer. *Plos One* *5*.

- Gati, A., Da Rocha, S., Guerra, N., Escudier, B., Moretta, A., Chouaib, S., Angevin, E., and Caignard, A. (2004). Analysis of the natural killer mediated immune response in metastatic renal cell carcinoma patients. *International Journal of Cancer* *109*, 393-401.
- Gilboa, E. (2007). DC-based cancer vaccines. *Journal of Clinical Investigation* *117*, 1195-1203.
- Gordon, S., and Martinez, F. O. (2010). Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions. *Immunity* *32*, 593-604.
- Gottfried, E., Kreutz, M., and Mackensen, A. (2008). Tumor-induced modulation of dendritic cell function. *Cytokine & Growth Factor Reviews* *19*, 65-77.
- Gowher, H., and Jeltsch, A. (2004). Mechanism of inhibition of DNA methyltransferases by cytidine analogs in cancer therapy. *Cancer Biology & Therapy* *3*, 1062-1068.
- Griffiths, R. W., Elkord, E., Gilham, D. E., Ramani, V., Clarke, N., Stern, P. L., and Hawkins, R. E. (2007). Frequency of regulatory T cells in renal cell carcinoma patients and investigation of correlation with survival. *Cancer Immunology Immunotherapy* *56*, 1743-1753.
- Grivennikov, S., Karin, E., Terzic, J., Mucida, D., Yu, G. Y., Vallabhapurapu, S., Scheller, J., Rose-John, S., Cheroutre, H., Eckmann, L., and Karin, M. (2009). IL-6 and Stat3 Are Required for Survival of Intestinal Epithelial Cells and Development of Colitis-Associated Cancer. *Cancer Cell* *15*, 103-113.
- Guruvayoorappan, C. (2008). Tumor versus tumor-associated macrophages: How hot is the link? *Integrative Cancer Therapies* *7*, 90-95.
- Hagemann, T., Robinson, S. C., Schulz, M., Trumper, L., Balkwill, F. R., and Binder, C. (2004). Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF-alpha dependent up-regulation of matrix metalloproteases. *Carcinogenesis* *25*, 1543-1549.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* *144*, 646-674.
- Hao, N. B., Lu, M. H., Fan, Y. H., Cao, Y. L., Zhang, Z. R., and Yang, S. M. (2012). Macrophages in Tumor Microenvironments and the Progression of Tumors. *Clinical & Developmental Immunology*.
- Harari, O., and Liao, J. K. (2004). Inhibition of MHC II gene transcription by nitric oxide and antioxidants. *Current Pharmaceutical Design* *10*, 893-898.
- Hashimoto, D., Miller, J., and Merad, M. (2011). Dendritic Cell and Macrophage Heterogeneity In Vivo. *Immunity* *35*, 323-335.
- Highfill, S. L., Rodriguez, P. C., Zhou, Q., Goetz, C. A., Koehn, B. H., Veenstra, R., Taylor, P. A., Panoskaltsis-Mortari, A., Serody, J. S., Munn, D. H., *et al.* (2010). Bone marrow myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) inhibit graft-versus-host disease (GVHD) via an arginase-1-dependent mechanism that is up-regulated by interleukin-13. *Blood* *116*, 5738-5747.
- Huang, B., Pan, P. Y., Li, Q. S., Sato, A. I., Levy, D. E., Bromberg, J., Divino, C. M., and Chen, S. H. (2006). Gr-1(+)CD115(+) immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Research* *66*, 1123-1131.
- Jia, W. T., Jackson-Cook, C., and Graf, M. R. (2010). Tumor-infiltrating, myeloid-derived suppressor cells inhibit T cell activity by nitric oxide production in an intracranial rat glioma plus vaccination model. *Journal of Neuroimmunology* *223*, 20-30.
- Joyce, J. A., and Pollard, J. W. (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nature Reviews Cancer* *9*, 239-252.
- Juttermann, R., Li, E., and Jaenisch, R. (1994). TOXICITY OF 5-AZA-2'-DEOXYCYTIDINE TO MAMMALIAN-CELLS IS MEDIATED PRIMARILY BY COVALENT TRAPPING OF DNA METHYLTRANSFERASE RATHER THAN DNA DEMETHYLATION. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *91*, 11797-11801.
- Kalluri, R., and Zeisberg, M. (2006). Fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer* *6*, 392-401.

- Kaporis, H. G., Guttman-Yassky, E., Lowes, M. A., Haider, A. S., Fuentes-Duculan, J., Darabi, K., Whynot-Ertelt, J., Khatcherian, A., Cardinale, I., Novitskaya, I., *et al.* (2007). Human basal cell carcinoma is associated with Foxp3(+) T cells in a Th2 dominant microenvironment. *Journal of Investigative Dermatology* *127*, 2391-2398.
- Kerkar, S. P., and Restifo, N. P. (2012). Cellular Constituents of Immune Escape within the Tumor Microenvironment. *Cancer Research* *72*, 3125-3130.
- Kiessling, R., Kono, K., Petersson, M., and Wasserman, K. (1996). Immunosuppression in human tumor-host interaction: Role of cytokines and alterations in signal-transducing molecules. *Springer Seminars in Immunopathology* *18*, 227-242.
- Kim, H. P., and Leonard, W. J. (2007). CREB/ATF-dependent T cell receptor-induced FoxP3 gene expression: a role for DNA methylation. *Journal of Experimental Medicine* *204*, 1543-1551.
- Kiziltepe, T., Hideshima, T., Catley, L., Raje, N., Yasui, H., Shiraishi, N., Okawa, Y., Ikeda, H., Vallet, S., Pozzi, S., *et al.* (2007). 5-Azacytidine, a DNA methyltransferase inhibitor, induces ATR-mediated DNA double-strand break responses, apoptosis, and synergistic cytotoxicity with doxorubicin and bortezomib against multiple myeloma cells. *Molecular Cancer Therapeutics* *6*, 1718-1727.
- Knutson, K. L., and Disis, M. L. (2005). Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunology Immunotherapy* *54*, 721-728.
- Kornstein, M. J., Brooks, J. S. J., and Elder, D. E. (1983). IMMUNOPEROXIDASE LOCALIZATION OF LYMPHOCYTE SUBSETS IN THE HOST RESPONSE TO MELANOMA AND NEVI. *Cancer Research* *43*, 2749-2753.
- Kortylewski, M., Xin, H., Kujawski, M., Lee, H., Liu, Y., Harris, T., Drake, C., Pardoll, D., and Yu, H. (2009). Regulation of the IL-23 and IL-12 Balance by Stat3 Signaling in the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell* *15*, 114-123.
- Krausgruber, T., Blazek, K., Smallie, T., Alzabin, S., Lockstone, H., Sahgal, N., Hussell, T., Feldmann, M., and Udalova, I. A. (2011). IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and T(H)1-T(H)17 responses. *Nature Immunology* *12*, 231-U266.
- Kusmartsev, S., Cheng, F. D., Yu, B., Nefedova, Y., Sotomayor, E., Lush, R., and Gabrilovich, D. (2003). All-trans-retinoic acid eliminates immature myeloid cells from tumor-bearing mice and improves the effect of vaccination. *Cancer Research* *63*, 4441-4449.
- Kusmartsev, S. A., Li, Y., and Chen, S. B. (2000). Gr-1(+) myeloid cells derived from tumor-bearing mice inhibit primary T cell activation induced through CD3/CD28 costimulation. *Journal of Immunology* *165*, 779-785.
- Kuss, I., Saito, T., Johnson, J. T., and Whiteside, T. L. (1999). Clinical significance of decreased zeta chain expression in peripheral blood lymphocytes of patients with head and neck cancer. *Clinical Cancer Research* *5*, 329-334.
- Kuykendall, J. R. (2005). 5-Azacytidine and decitabine monotherapies of myelodysplastic disorders. *Annals of Pharmacotherapy* *39*, 1700-1709.
- Langowski, J. L., Zhang, X. Q., Wu, L. L., Mattson, J. D., Chen, T. Y., Smith, K., Basham, B., McClanahan, T., Kastelein, R. A., and Oft, M. (2006). IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature* *442*, 461-465.
- Lanier, L. L. (1997). Natural killer cells: From no receptors to too many. *Immunity* *6*, 371-378.
- Levin, I., Klein, T., Goldstein, J., Kuperman, O., Kanetti, J., and Klein, B. (1991). EXPRESSION OF CLASS-I HISTOCOMPATIBILITY ANTIGENS IN TRANSITIONAL CELL-CARCINOMA OF THE URINARY-BLADDER IN RELATION TO SURVIVAL. *Cancer* *68*, 2591-2594.
- Li, H. Q., Han, Y. M., Guo, Q. L., Zhang, M. G., and Cao, X. T. (2009). Cancer-Expanded Myeloid-Derived Suppressor Cells Induce Anergy of NK Cells through Membrane-Bound TGF-beta 1. *Journal of Immunology* *182*, 240-249.
- Li, Q. S., Pan, P. Y., Gu, P. D., Xu, D. P., and Chen, S. H. (2004). Role of immature myeloid Gr-1(+) cells in the development of antitumor immunity. *Cancer Research* *64*, 1130-1139.
- Littman, D. R., and Rudensky, A. Y. (2010). Th17 and Regulatory T Cells in Mediating and Restraining Inflammation. *Cell* *140*, 845-858.

- Liu, C. R., Yu, S. H., Kappes, J., Wang, J. H., Grizzle, W. E., Zinn, K. R., and Zhang, H. G. (2007). Expansion of spleen myeloid suppressor cells represses NK cell cytotoxicity in tumor-bearing host. *Blood* *109*, 4336-4342.
- Liu, Y., Li, P. K., Li, C. L., and Lin, J. Y. (2010). Inhibition of STAT3 Signaling Blocks the Anti-apoptotic Activity of IL-6 in Human Liver Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry* *285*, 27429-27439.
- Liyanage, U. K., Moore, T. T., Joo, H. G., Tanaka, Y., Herrmann, V., Doherty, G., Drebin, J. A., Strasberg, S. M., Eberlein, T. J., Goedegebuure, P. S., and Linehan, D. C. (2002). Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *Journal of Immunology* *169*, 2756-2761.
- Loose, D., and Van de Wiele, C. (2009). The Immune System and Cancer. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* *24*, 369-376.
- Machiels, J. P. H., Reilly, R. T., Emens, L. A., Ercolini, A., Lei, R. Y., Weintraub, D., Okoye, F. I., and Jaffee, E. M. (2001). Cyclophosphamide, doxorubicin, and paclitaxel enhance the antitumor immune response of granulocyte/macrophage-colony stimulating factor-secreting whole-cell vaccines in HER-2/neu tolerized mice. *Cancer Research* *61*, 3689-3697.
- Maier, T., Holda, J. H., and Claman, H. N. (1989). MURINE NATURAL SUPPRESSOR CELLS IN THE NEWBORN, IN BONE-MARROW, AND AFTER CYCLOPHOSPHAMIDE - GENETIC VARIATIONS AND DEPENDENCE ON IFN-GAMMA. *Journal of Immunology* *143*, 491-498.
- Manning, J., Indrova, M., Lubyova, B., Pribylova, H., Bieblova, J., Hejnar, J., Simova, J., Bubenik, J., and Reinis, M. (2008). Induction of MHC class I molecule cell surface expression and epigenetic activation of antigen-processing machinery components in a murine model for human papilloma virus 16-associated tumours. *Immunology* *123*, 218-227.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., and Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature* *454*, 436-444.
- Marshall, M. A., Jankovic, D., Maher, V. E., Sher, A., and Berzofsky, J. A. (2001). Mice infected with *Schistosoma mansoni* develop a novel non-T-lymphocyte suppressor population which inhibits virus-specific CTL induction via a soluble factor. *Microbes and Infection* *3*, 1051-1061.
- Martinez, F. O., Helming, L., and Gordon, S. (2009). Alternative Activation of Macrophages: An Immunologic Functional Perspective. *Annual Review of Immunology* *27*, 451-483.
- Martinez, F. O., Sica, A., Mantovani, A., and Locati, M. (2008). Macrophage activation and polarization. *Frontiers in Bioscience-Landmark* *13*, 453-461.
- Mason, S. D., and Joyce, J. A. (2011). Proteolytic networks in cancer. *Trends in Cell Biology* *21*, 228-237.
- Matsuda, M., Salazar, F., Petersson, M., Masucci, G., Hansson, J., Pisa, P., Zhang, Q. J., Masucci, M. G., and Kiessling, R. (1994). INTERLEUKIN-10 PRETREATMENT PROTECTS TARGET-CELLS FROM TUMOR-SPECIFIC AND ALLO-SPECIFIC CYTOTOXIC T-CELLS AND DOWN-REGULATES HLA CLASS-I EXPRESSION. *Journal of Experimental Medicine* *180*, 2371-2376.
- Mazzoni, A., Bronte, V., Visintin, A., Spitzer, J. H., Apolloni, E., Serafini, P., Zanovello, P., and Segal, D. M. (2002). Myeloid suppressor lines inhibit T cell responses by an NO-dependent mechanism. *Journal of Immunology* *168*, 689-695.
- Mellor, A. L., and Munn, D. H. (1999). Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation? *Immunology Today* *20*, 469-473.
- Mellor, A. L., and Munn, D. H. (2004). IDO expression by dendritic cells: Tolerance and tryptophan catabolism. *Nature Reviews Immunology* *4*, 762-774.
- Mencacci, A., Montagnoli, C., Bacci, A., Cenci, E., Pitzurra, L., Spreca, A., Kopf, M., Sharpe, A. H., and Romani, L. (2002). CD80(+)Gr-1(+) myeloid cells inhibit development of antifungal Th1 immunity in mice with candidiasis. *Journal of Immunology* *169*, 3180-3190.
- Mihm, M. C., Clemente, C. G., and Cascinelli, N. (1996). Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node melanoma metastases: A histopathologic prognostic indicator and an expression of local immune response. *Laboratory Investigation* *74*, 43-47.

- Mikyskova, R., Indrova, M., Pollakova, V., Bieblova, J., Simova, J., and Reinis, M. (2012). Cyclophosphamide-induced Myeloid-derived Suppressor Cell Population Is Immunosuppressive But Not Identical to Myeloid-derived Suppressor Cells Induced By Growing TC1 Tumors. *Journal of Immunotherapy* 35, 374-384.
- Mills, C. D., Shearer, J., Evans, R., and Caldwell, M. D. (1992). MACROPHAGE ARGININE METABOLISM AND THE INHIBITION OR STIMULATION OF CANCER. *Journal of Immunology* 149, 2709-2714.
- Modolell, M., Corraliza, I. M., Link, F., Soler, G., and Eichmann, K. (1995). RECIPROCAL REGULATION OF THE NITRIC-OXIDE SYNTHASE ARGINASE BALANCE IN MOUSE BONE-MARROW-DERIVED MACROPHAGES BY TH1 AND TH2 CYTOKINES. *European Journal of Immunology* 25, 1101-1104.
- Motoyama, N., and Naka, K. (2004). DNA damage tumor suppressor genes and genomic instability. *Current Opinion in Genetics & Development* 14, 11-16.
- Movahedi, K., Guillems, M., Van den Bossche, J., Van den Bergh, R., Gysemans, C., Beschin, A., De Baetselier, P., and Van Ginderachter, J. A. (2008). Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood* 111, 4233-4244.
- Munn, D. H. (2006). Indoleamine 2,3-dioxygenase, tumor-induced tolerance and counter-regulation. *Current Opinion in Immunology* 18, 220-225.
- Munn, D. H., Shafizadeh, E., Attwood, J. T., Bondarev, I., Pashine, A., and Mellor, A. L. (1999). Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *Journal of Experimental Medicine* 189, 1363-1372.
- Nagaraj, S., Gupta, K., Pisarev, V., Kinarsky, L., Sherman, S., Kang, L., Herber, D. L., Schneck, J., and Gabrilovich, D. I. (2007). Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8(+) T cell tolerance in cancer. *Nature Medicine* 13, 828-835.
- Nardin, A., and Abastado, J. P. (2008). Macrophages and cancer. *Frontiers in Bioscience-Landmark* 13, 3494-3505.
- Nefedova, Y., Fishman, M., Sherman, S., Wang, X., Beg, A. A., and Gabrilovich, D. I. (2007). Mechanism of all-trans retinoic acid effect on tumor-associated myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Research* 67, 11021-11028.
- Ochoa, A. C., Zea, A. H., Hernandez, C., and Rodriguez, P. C. (2007). Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma. *Clinical Cancer Research* 13, 721S-726S.
- Odegaard, J. I., and Chawla, A. (2008). Mechanisms of macrophage activation in obesity-induced insulin resistance. *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism* 4, 619-626.
- Odemuyiwa, S. O., Ghahary, A., Li, Y. Y., Puttagunta, L., Lee, J. E., Musat-Marcu, S., and Moqbel, R. (2004). Cutting edge: Human eosinophils regulate T cell subset selection through indoleamine 2,3-dioxygenase. *Journal of Immunology* 173, 5909-5913.
- Ong, S. M., Tan, Y. C., Beretta, O., Jiang, D. S., Yeap, W. H., Tai, J. J. Y., Wong, W. C., Yang, H., Schwarz, H., Lim, K. H., *et al.* (2012). Macrophages in human colorectal cancer are pro-inflammatory and prime T cells towards an anti-tumour type-1 inflammatory response. *European Journal of Immunology* 42, 89-100.
- Ostrand-Rosenberg, S., and Sinha, P. (2009). Myeloid-Derived Suppressor Cells: Linking Inflammation and Cancer. *Journal of Immunology* 182, 4499-4506.
- Pages, F., Berger, A., Camus, M., Sanchez-Cabo, F., Costes, A., Molidor, R., Mlecnik, B., Kirilovsky, A., Nilsson, M., Damotte, D., *et al.* (2005). Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *New England Journal of Medicine* 353, 2654-2666.
- Passlick, B., Pantel, K., Kubuschok, B., Angstwurm, M., Neher, A., Thetter, O., Schweiberer, L., and Izbicki, J. R. (1996). Expression of MHC molecules and ICAM-1 on non-small cell lung carcinomas: Association with early lymphatic spread of tumour cells. *European Journal of Cancer* 32A, 141-145.
- Pelaez, B., Campillo, J. A., Lopez-Asenjo, J. A., and Subiza, J. L. (2001). Cyclophosphamide induces the development of early myeloid cells suppressing tumor cell growth by a nitric oxide-dependent mechanism. *Journal of Immunology* 166, 6608-6615.

- Poschke, I., and Kiessling, R. (2012). On the armament and appearances of human myeloid-derived suppressor cells. *Clinical Immunology* *144*, 250-268.
- Radojicic, V., Bezak, K. B., Skarica, M., Pletneva, M. A., Yoshimura, K., Schulick, R. D., and Luznik, L. (2010). Cyclophosphamide resets dendritic cell homeostasis and enhances antitumor immunity through effects that extend beyond regulatory T cell elimination. *Cancer Immunology Immunotherapy* *59*, 137-148.
- Redondo, M., Concha, A., Oldiviela, R., Cueto, A., Gonzalez, A., Garrido, F., and Ruizcabello, F. (1991). EXPRESSION OF HLA CLASS-I AND CLASS-II ANTIGENS IN BRONCHOGENIC CARCINOMAS - ITS RELATIONSHIP TO CELLULAR DNA CONTENT AND CLINICAL-PATHOLOGICAL PARAMETERS. *Cancer Research* *51*, 4948-4954.
- Ribatti, D., and Vacca, A. (2009). The role of monocytes-macrophages in vasculogenesis in multiple myeloma. *Leukemia* *23*, 1535-1536.
- Ridgway, D. (2003). The first 1000 dendritic cell vaccinees. *Cancer Investigation* *21*, 873-886.
- Rodriguez, P. C., Quiceno, D. G., and Ochoa, A. C. (2007). L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood* *109*, 1568-1573.
- Sampath, D., Rao, V. A., and Plunkett, W. (2003). Mechanisms of apoptosis induction by nucleoside analogs. *Oncogene* *22*, 9063-9074.
- Sauer, H., Wartenberg, M., and Hescheler, J. (2001). Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cellular Physiology and Biochemistry* *11*, 173-186.
- Serafini, P., Borrello, I., and Bronte, V. (2006). Myeloid suppressor cells in cancer: Recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression. *Seminars in Cancer Biology* *16*, 53-65.
- Serafini, P., Mgebroff, S., Noonan, K., and Borrello, I. (2008). Myeloid-derived suppressor cells promote cross-tolerance in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells. *Cancer Research* *68*, 5439-5449.
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A. T., White, J. M., Swanson, P. E., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (2001). IFN gamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* *410*, 1107-1111.
- Sharma, G. D., He, J. C., and Bazan, H. E. P. (2003). p38 and ERK1/2 coordinate cellular migration and proliferation in epithelial wound healing - Evidence of cross-talk activation between MAP kinase cascades. *Journal of Biological Chemistry* *278*, 21989-21997.
- Sharma, S., Yang, S. C., Zhu, L., Reckamp, K., Gardner, B., Baratelli, F., Huang, M., Batra, R. K., and Dubinett, S. M. (2005). Tumor cyclooxygenase-2/prostaglandin E-2-dependent promotion of FOXP3 expression and CD4(+)CD25(+) T regulatory cell activities in lung cancer. *Cancer Research* *65*, 5211-5220.
- Sheu, B. C., Hsu, S. W., Ho, H. N., Lin, R. H., Tornig, P. L., and Huang, S. C. (1999). Reversed CD4/CD8 ratios of tumor-infiltrating lymphocytes are correlated with the progression of human cervical carcinoma. *Cancer* *86*, 1537-1543.
- Shimizu, J., Yamazaki, S., and Sakaguchi, S. (1999). Induction of tumor immunity by removing CD25(+)CD4(+) T cells: A common basis between tumor immunity and autoimmunity. *Journal of Immunology* *163*, 5211-5218.
- Shimizu, J., Yamazaki, S., Takahashi, T., Ishida, Y., and Sakaguchi, S. (2002). Stimulation of CD25+CD4+regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nature Immunology* *3*, 135-142.
- Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K. P., Oltz, E. M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., Stall, A. M., and Alt, F. W. (1992). RAG-2-DEFICIENT MICE LACK MATURE LYMPHOCYTES OWING TO INABILITY TO INITIATE V(D)J REARRANGEMENT. *Cell* *68*, 855-867.
- Sica, A., Sacconi, A., and Mantovani, A. (2002). Tumor-associated macrophages: a molecular perspective. *International Immunopharmacology* *2*, 1045-1054.
- Simova, J., Pollakova, V., Indrova, M., Mikyskova, R., Bieblova, J., Stepanek, I., Bubenik, J., and Reinis, M. (2011). Immunotherapy augments the effect of 5-azacytidine on HPV16-associated tumours with different MHC class I-expression status. *British Journal of Cancer* *105*, 1533-1541.

- Sindrilaru, A., Peters, T., Wieschalka, S., Baican, C., Baican, A., Peter, H., Hainzl, A., Schatz, S., Qi, Y., Schlecht, A., *et al.* (2011). An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice. *Journal of Clinical Investigation* *121*, 985-997.
- Sinha, P., Chornoguz, O., Clements, V. K., Artemenko, K. A., Zubarev, R. A., and Ostrand-Rosenberg, S. (2011). Myeloid-derived suppressor cells express the death receptor Fas and apoptose in response to T cell-expressed FasL. *Blood* *117*, 5381-5390.
- Sinha, P., Clements, V. K., Bunt, S. K., Albelda, S. M., and Ostrand-Rosenberg, S. (2007). Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response. *Journal of Immunology* *179*, 977-983.
- Smahel, M., Sobotkova, E., Bubenik, J., Simova, J., Zak, R., Ludvikova, V., Hajkova, R., Kovarik, J., Jelinek, F., Povysil, C., *et al.* (2001). Metastatic MHC class I-negative mouse cells derived by transformation with human papillomavirus type 16. *British Journal of Cancer* *84*, 374-380.
- Smith, H. O., Anderson, P. S., Kuo, D. Y. S., Goldberg, G. L., Devictoria, C. L., Boocock, C. A., Jones, J. G., Runowicz, C. D., Stanley, E. R., and Pollard, J. W. (1995). THE ROLE OF COLONY-STIMULATING FACTOR-1 AND ITS RECEPTOR IN THE ETIOPATHOGENESIS OF ENDOMETRIAL ADENOCARCINOMA. *Clinical Cancer Research* *1*, 313-325.
- Solinas, G., Germano, G., Mantovani, A., and Allavena, P. (2009). Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *Journal of Leukocyte Biology* *86*, 1065-1073.
- Sorm, F., Cihak, A., Vesely, J., and Piskala, A. (1964). 5-AZACYTIDINE NEW HIGHLY EFFECTIVE CANCEROSTATIC. *Experientia* *20*, 202-8.
- Srivastava, M. K., Sinha, P., Clements, V. K., Rodriguez, P., and Ostrand-Rosenberg, S. (2010). Myeloid-Derived Suppressor Cells Inhibit T-Cell Activation by Depleting Cystine and Cysteine. *Cancer Research* *70*, 68-77.
- Stepanek, I., Indrova, M., Bieblova, J., Fucikova, J., Spisek, R., Bubenik, J., and Reinis, M. (2011). EFFECTS OF 5-AZACYTIDINE AND TRICHOSTATIN A ON DENDRITIC CELL MATURATION. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents* *25*, 517-529.
- Stewart, T. H. M., and Tsai, S. C. J. (1993). THE POSSIBLE ROLE OF STROMAL CELL STIMULATION IN WORSENING THE PROGNOSIS OF A SUBSET OF PATIENTS WITH BREAST-CANCER. *Clinical & Experimental Metastasis* *11*, 295-305.
- Stewart, T. J., and Abrams, S. I. (2008). How tumours escape mass destruction. *Oncogene* *27*, 5894-5903.
- Stewart, T. J., and Smyth, M. J. (2011). Improving cancer immunotherapy by targeting tumor-induced immune suppression. *Cancer and Metastasis Reviews* *30*, 125-140.
- Strauss, L., Bergmann, C., Szczepanski, M., Gooding, W., Johnson, J. T., and Whiteside, T. L. (2007). A unique subset of CD4(+)CD25(high) Foxp3(+) T cells secreting interleukin-10 and transforming growth factor-beta 1 mediates suppression in the tumor microenvironment. *Clinical Cancer Research* *13*, 4345-4354.
- Strober, S. (1984). NATURAL SUPPRESSOR (NS) CELLS, NEONATAL TOLERANCE, AND TOTAL LYMPHOID IRRADIATION - EXPLORING OBSCURE RELATIONSHIPS. *Annual Review of Immunology* *2*, 219-237.
- Swann, J. B., and Smyth, M. J. (2007). Immune surveillance of tumors. *Journal of Clinical Investigation* *117*, 1137-1146.
- Szatrowski, T. P., and Nathan, C. F. (1991). PRODUCTION OF LARGE AMOUNTS OF HYDROGEN-PEROXIDE BY HUMAN TUMOR-CELLS. *Cancer Research* *51*, 794-798.
- Titu, L. V., Monson, J. R. T., and Greenman, J. (2002). The role of CD8(+) T cells in immune responses to colorectal cancer. *Cancer Immunology Immunotherapy* *51*, 235-247.
- Tomasi, T. B., Magner, W. J., and Khan, A. N. H. (2006). Epigenetic regulation of immune escape genes in cancer. *Cancer Immunology Immunotherapy* *55*, 1159-1184.
- Uzzo, R. G., Clark, P. E., Rayman, P., Bloom, T., Rybicki, L., Novick, A. C., Bukowski, R. M., and Finke, J. H. (1999). Alterations in NF kappa B activation in T lymphocytes of patients with renal cell carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* *91*, 718-721.

- van der Most, R. G., Currie, A. J., Cleaver, A. L., Salmons, J., Nowak, A. K., Mahendran, S., Larma, I., Prosser, A., Robinson, B. W. S., Smyth, M. J., *et al.* (2009). Cyclophosphamide Chemotherapy Sensitizes Tumor Cells to TRAIL-Dependent CD8 T Cell-Mediated Immune Attack Resulting in Suppression of Tumor Growth. *Plos One* 4.
- Wada, S., Yoshimura, K., Hipkiss, E. L., Harris, T. J., Yen, H. R., Goldberg, M. V., Grosso, J. F., Getnet, D., Demarzo, A. M., Netto, G. J., *et al.* (2009). Cyclophosphamide Augments Antitumor Immunity: Studies in an Autochthonous Prostate Cancer Model. *Cancer Research* 69, 4309-4318.
- Wang, H. W., and Joyce, J. A. (2010). Alternative activation of tumor-associated macrophages by IL-4 Priming for protumoral functions. *Cell Cycle* 9, 4824-4835.
- Watkins, S. K., Egilmez, N. K., Suttles, J., and Stout, R. D. (2007). IL-12 rapidly alters the functional profile of tumor-associated and tumor-infiltrating macrophages in vitro and in vivo. *Journal of Immunology* 178, 1357-1362.
- Watkins, S. K., Li, B., Richardson, K. S., Head, K., Egilmez, N. K., Zeng, Q., Suttles, J., and Stout, R. D. (2009). Rapid release of cytoplasmic IL-15 from tumor-associated macrophages is an initial and critical event in IL-12-initiated tumor regression. *European Journal of Immunology* 39, 2126-2135.
- Whiteside, T. L. (2008). The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene* 27, 5904-5912.
- Whiteside, T. L. (2010). Inhibiting the inhibitors: evaluating agents targeting cancer immunosuppression. *Expert Opinion on Biological Therapy* 10, 1019-1035.
- Witkiewicz, A., Williams, T. K., Cozzitorto, J., Durkan, B., Showalter, S. L., Yeo, C. J., and Brody, J. R. (2008). Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma recruits regulatory T cells to avoid immune detection. *Journal of the American College of Surgeons* 206, 849-856.
- Woo, E. Y., Chu, C. S., Goletz, T. J., Schlienger, K., Yeh, H., Coukos, G., Rubin, S. C., Kaiser, L. R., and June, C. H. (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.
- Wyckoff, J., Wang, W. G., Lin, E. Y., Wang, Y. R., Pixley, F., Stanley, E. R., Graf, T., Pollard, J. W., Segall, J., and Condeelis, J. (2004). A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer Research* 64, 7022-7029.
- Xiong, H., Chen, Z. F., Liang, Q. C., Du, W., Chen, H. M., Su, W. Y., Chen, G. Q., Han, Z. G., and Fang, J. Y. (2009). Inhibition of DNA methyltransferase induces G2 cell cycle arrest and apoptosis in human colorectal cancer cells via inhibition of JAK2/STAT3/STAT5 signalling. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 13, 3668-3679.
- Yang, L., DeBusk, L. M., Fukuda, K., Fingleton, B., Green-Jarvis, B., Shyr, Y., Matrisian, L. M., Carbone, D. P., and Lin, P. C. (2004). Expansion of myeloid immune suppressor Gr+CD11b+ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 6, 409-421.
- Yang, L., Huang, J. H., Ren, X. B., Gorska, A. E., Chytil, A., Aakre, M., Carbone, D. P., Matrisian, L. M., Richmond, A., Lin, P. C., and Moses, H. L. (2008). Abrogation of TGF beta signaling in mammary carcinomas recruits Gr-1+CD11b+ myeloid cells that promote metastasis. *Cancer Cell* 13, 23-35.
- Yang, R. C., Cai, Z., Zhang, Y., Yutzy, W. H., Roby, K. F., and Roden, R. B. S. (2006). CD80 in immune suppression by mouse ovarian carcinoma-associated Gr-1(+)CD11b(+) myeloid cells. *Cancer Research* 66, 6807-6815.
- Youn, J. I., and Gabrilovich, D. I. (2010). The biology of myeloid-derived suppressor cells: The blessing and the curse of morphological and functional heterogeneity. *European Journal of Immunology* 40, 2969-2975.
- Youn, J. I., Nagaraj, S., Collazo, M., and Gabrilovich, D. I. (2008). Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Journal of Immunology* 181, 5791-5802.
- Zamarron, B. F., and Chen, W. J. (2011). Dual Roles of Immune Cells and Their Factors in Cancer Development and Progression. *International Journal of Biological Sciences* 7, 651-658.
- Zheng, L. M., Ojcius, D. M., Garaud, F., Roth, C., Maxwell, E., Li, Z., Rong, H., Chen, J., Wang, X. Y., Catino, J. J., and King, I. (1996). Interleukin-10 inhibits tumor metastasis through an NK cell-dependent mechanism. *Journal of Experimental Medicine* 184, 579-584.

Zitvogel, L., Tesniere, A., and Kroemer, G. (2006). Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nature Reviews Immunology* 6, 715-727.

Zou, W. P. (2005). Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nature Reviews Cancer* 5, 263-274.

12. Prílohy

Príloha č. 1: Abstrakt použitý na na 3rd Intl Conference „Cancer Immunotherapy and Immunomonitoring (CITIM)“

3rd Intl Conference “Cancer Immunotherapy and Immunomonitoring (CITIM)” April 22-25, Krakow, Poland

Redefining Cancer Therapy www.CancerITIM.org 80

Myeloid-derived suppressor cell accumulation during tumour growth and its cyclophosphamide treatment is modulated by 5-azacytidine

Romana Mikyšková¹, Marie Indrová¹, Veronika Polláková¹, Jana Bieblová¹, Jana Šímová¹, Zuzana Paračková¹, Elzbieta Pajtasz-Piasecka², Joanna Rossowska² and Milan Reiniš¹

¹Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic, ²Ludwik Hirszfild Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, Wroclaw, Poland

Myeloid-derived suppressor cells (MDSC), defined in mice as Gr-1⁺/CD11b⁺ cells, represent one of the key players mediating immunosuppression owing to their ability to potently suppress T cell responses. They accumulate in lymphoid organs and blood during tumour growth. MDSC mobilization was also reported after cyclophosphamide (CY) therapy. We have previously reported that although both CY-induced MDSC (CY-MDSC) and tumour-induced MDSC (TU-MDSC) accelerated tumour growth, their phenotype and function differed. Compared to TU-MDSC, CY-MDSC subpopulation consisted particularly of monocyte-like cells; it was accompanied by lower Arginase-1 (ARG-1) expression and lower T-cell proliferation suppression. The aim of our experiments was to evaluate (a) whether CY-MDSC or TU-MDSC could be in vitro modulated by 5-azacytidine (5AC), a DNA demethylating agent with antitumour effects, and (b) whether 5AC could also exert a modulatory effect on MDSC accumulating in the spleens and tumour microenvironment during the treatment of established tumours, both as individual treatment or in the combination with CY. After cultivation of MDSC in the presence of 5AC, the percentage of Gr-1⁺/CD11b⁺ cells decreased and the percentage of CD11c⁺ and CD86⁺/MHCII⁺ cells increased. This was accompanied by lower expression of immunosuppressive genes (ARG-1, iNOS). Peritumoral treatment of TC-1/A9 or TRAMP-C2 tumours with 5AC led to the tumour growth inhibition and decrease in the percentage of MDSC in tumour microenvironment, detected both by analysis of tumour infiltrating cells and immunohistochemical staining. This was accompanied by a decrease in the activity (Arg-1) of MDSC. 5AC was also used for combinatory treatment with CY. After CY administration, an additional increase of MDSC percentage and activity in the spleens and tumour microenvironment was noticed; this increase was subsequently inhibited by peritumoral 5AC treatment. Combination of CY with 5AC also led to the highest tumour growth inhibition. Similar effects were observed after intraperitoneal administration of 5AC in mice bearing large tumours or in CY-injected mice. Our findings supported the rationale for utilization of 5AC to modulate MDSC accumulation occurring during tumour growth or to inhibit MDSC mobilized during CY treatment of established tumours. Grant support: Czech Science Foundation Nos. GAP301/11/P220 and 301/10/2174, and Polish-Czech Republic Joint Research Project (2012-2014).

Myeloid-derived suppressor cell accumulation during tumour growth and its cyclophosphamide treatment is modulated by 5-azacytidine

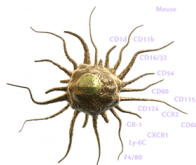
Romana Mikyšková¹, Marie Indrová¹, Veronika Polláková¹, Jana Bieblová¹, Jana Šimová¹, Zuzana Paračková¹, Elzbieta Pajtasz-Piasecka², Joanna Rossowska² and Milan Reiniš¹

¹Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

²Ludwik Hirsfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, Wrocław, Poland



Institute of Molecular Genetics of the ASCR, v. v. i.



Aims:

to evaluate

(a) whether spleen myeloid-derived suppressor cell from CY-treated mice (CY-MDSC) or tumour-bearing mice (TU-MDSC) could be *in vitro* modulated by 5-azacytidine (5AC), a DNA demethylating agent with antitumour effects

(b) whether 5AC could also exert *in vivo* modulatory effect on MDSC accumulating in the spleens and tumour microenvironment during the treatment of established tumours, both as individual treatment or in the combination with CY

Methods:

TC-1A9 tumour cells. MHC class II-negative variant of the TC-1 tumour cell line (developed by co-transfection of murine C57BL/6 lung cells with HPV16 E6/E7 genes and activated (G12V) Ha-ras plasmid DNA [Lin K-Y et al., Cancer Res. 56:21-25, 1996]), were obtained after transplantation of TC-1 cells into a DNA vaccine-immunized mouse (Šmahel et al., Vaccine 21: 1125-1136, 2003).

TRAMP-C2 tumour cells, established from a heterogeneous 32 week tumour of the transgenic adenocarcinoma mouse prostate (TRAMP) model (Foster BA, Cancer Res. 57: 3325-3330, 1997).

Preparation of CY-MDSC and TU-MDSC: CY-MDSC (CD11b⁺Gr-1⁺) and TU-MDSC (CD11b⁺spleenocytes) were isolated by MACS from spleens of mice 7 days after CY administration (200 mg/kg body weight i.p.) or mice bearing large tumours (1.5 cm in diameter). Cells were analysed by FACS analysis for the percentage of CD11b⁺Gr-1⁺ cells.

Modulation of MDSC with 5AC *in vitro*:

CY-MDSC and TU-MDSC were cultivated *in vitro* for 4 days in the presence of 5 μM 5AC and 10 ng/ml GM-CSF. After cultivation, cells were analysed by FACS analysis for the percentage of CD11b⁺Gr-1⁺ cells, CD11c⁺ and CD86⁺/MHCI⁺ cells. Relative expression of Arg-1, iNOS was analysed by qRT-PCR.

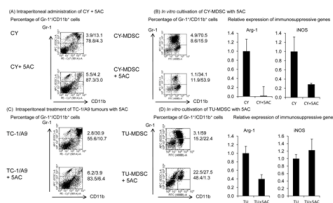
***In vivo* experiments:**

Mice bearing established (app. 0.5 cm in diameter) TC-1A9 or TRAMP-C2 tumours were treated with six doses of 5AC (100 μg i.t.) in three weeks. After the treatment, tumors were excised and used for analysis. Tumours were dissociated by gentleMACS[™] dissociator using protocol for preparation of single-cell suspensions, and the percentage of infiltrating MDSC (CD11b⁺Gr-1⁺) cells was analysed by FACS. Immunohistochemistry (Gr-1⁺ cells) on tumour, histological specimens was also performed. Relative expression of Arg-1 was analysed by qRT-PCR in tumour homogenates prepared by gentleMACS[™] dissociator using protocol for homogenization of tissue for total RNA isolation.

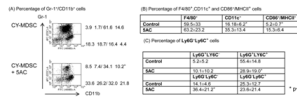
Mice bearing established (app. 0.5 cm in diameter) TC-1A9 or TRAMP-C2 tumours were administered with CY (200 mg/kg body weight i.p.) and 7 days later, treated with three doses of 5AC (100 μg i.t.) in one week. After the treatment, tumors were excised and the percentage of infiltrating MDSC (CD11b⁺Gr-1⁺) cells was analysed as in previous experiments.

Mice bearing established (app. 1.5 cm in diameter) TC-1A9 tumours and mice 7 days after CY administration (200 mg/kg body weight i.p.) were treated with 5AC (100 μg i.p.) and the percentage of CD11b⁺Gr-1⁺ cells in the spleens was analysed by FACS.

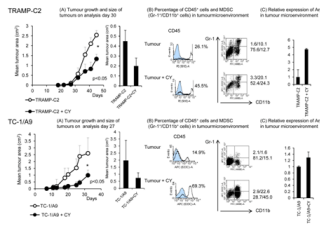
The *in vivo* and *in vitro* effect of 5-azacytidine (5AC) on CY-MDSC and TU-MDSC



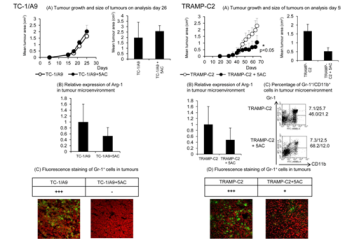
The *in vitro* effect of 5-azacytidine (5AC) on CY-MDSC: their phenotype



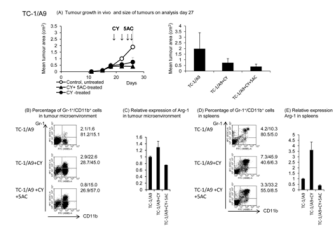
Infiltration of TRAMP-C2 and TC-1A9 tumour microenvironment during tumour growth and cyclophosphamide (CY) treatment



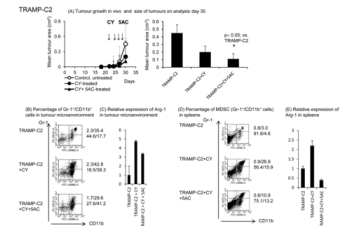
Treatment (i.t.) of established TC-1A9 or TRAMP-C2 tumours with 5-azacytidine (5AC)



Treatment of established TC-1A9 tumours with the combination of cyclophosphamide (CY) + 5-azacytidine (5AC)



Treatment of established TRAMP-C2 tumours with the combination of cyclophosphamide (CY) + 5-azacytidine (5AC)



Conclusions:

•After *in vitro* cultivation of MDSC in the presence of 5AC, the percentage of CD11b⁺Gr-1⁺ cells decreased and the percentage of CD11c⁺ and CD86⁺/MHCI⁺ cells increased. This effect was accompanied by a decrease in relative expression of Arg-1.

•Peritumoural treatment of established TC-1A9 or TRAMP-C2 tumours with 5AC led to the tumour growth inhibition and decrease in the percentage of MDSC in tumour microenvironment, detected both by analysis of tumour infiltrating cells and immunohistochemical staining. This was accompanied by a decrease in the activity (Arg-1) of MDSC.

•After CY administration, an additional increase of MDSC percentage and activity in the spleens and tumour microenvironment was noticed; this increase and activity (Arg-1) was subsequently inhibited by peritumoural 5AC treatment. Combination of CY with 5AC also led to the highest tumour growth inhibition. Similar effects were observed after intraperitoneal administration of 5AC in mice bearing large tumours or in CY-injected mice.

Grant support: Czech Science Foundation Nos. GAP301/11/P220 and 301/10/2174, and Polish-Czech Republic Joint Research Project (2012-2014).

Reference: Mikyšková et al., J Immunother. 2012 Jun;35(5):374-84.



DNA demethylating agent 5-azacytidine inhibits myeloid-derived suppressor cells induced by tumor growth and cyclophosphamide treatment

Romana Mikyšková¹, Marie Indrová¹, Veronika Polláková¹, Jana Bieblová¹, Jana Šimová¹, Zuzana Paračková¹, Elzbieta Pajtasz-Piasecka², Joanna Rossowska² and Milan Reiniš¹

¹Institute of Molecular Genetics of the Academy of Sciences of the Czech Republic, v. v. i., Prague, Czech Republic, ²Ludwik Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, Wroclaw, Poland

ABSTRACT

MDSC represent one of the key players mediating immunosuppression. These cells accumulate in TME, lymphoid organs, and blood during tumor growth. Their mobilization was also reported after CY therapy. DNA methyltransferase inhibitor 5AC has been intensively studied as an antitumor agent. In this study, we examined, using two different murine tumor models, the modulatory effects of 5AC on MDSC induced by tumor growth and CY therapy. Indeed, the percentage of MDSC both in the TME and spleens of 5AC-treated mice bearing TRAMP-C2 or TC-1/A9 established tumors was found decreased. The changes in the MDSC percentage were accompanied by a decrease in the ARG-1 gene expression, both in TME and spleens. CY treatment of the established tumors resulted in additional MDSC accumulation in the TME and spleens. This accumulation was subsequently inhibited by 5AC treatment. Combination of CY with 5AC led to the highest tumor growth inhibition. Further, *in vitro* cultivation of spleen MDSC in the presence of 5AC reduced the percentage of MDSC. This reduction was associated with increased percentage of CD11c⁺ and CD86⁺/MHCII⁺ cells. The observed modulatory effect on MDSC correlated with reduction of the Arg-1 gene expression. Similar, albeit weaker effects were observed when MDSC from the spleens of tumor-bearing animals were cultivated with 5AC. Our findings indicate that, beside the direct antitumor effect, 5AC can reduce the percentage of MDSC accumulating in the TME and spleens during tumor growth and CY chemotherapy, which can be beneficial for the outcome of cancer therapy.