

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. lékařská fakulta

Úloha imunitního systému u kolorektálního a ovariálního karcinomu

Disertační práce

Praha 2013

MUDr. Petr Kocián

Univerzita Karlova v Praze

2. lékařská fakulta

Studijní program: Postgraduální doktorské studium v biomedicině

Studijní obor: Experimentální chirurgie



MUDr. Petr Kocián

Úloha imunitního systému u kolorektálního a ovariálního karcinomu

The role of the immune system in colorectal and ovarian cancer

Disertační práce

Školitel: Prof. MUDr. Jiří Hoch, CSc.

Konzultant: Prof. MUDr. Jiřina Bartůňková, DrSc.

Praha, 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu. Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 12. 1. 2013

MUDr. Petr Kocián

Identifikační záznam:

KOCIÁN, Petr. *Úloha imunitního systému u kolorektálního a ovariálního karcinomu. [The role of the immune system in colorectal and ovarian cancer]*. Praha, 2013. 74 s., Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, Chirurgická klinika. Školitel Hoch, Jiří.

Seznam zkratek

ADCC	protilátkou zprostředkovaná buněčná toxicita
AFP	alfa-fetoprotein
AJCC	zkratka pro americkou organizaci „American joint committee on cancer“
APAF-1	název proteinu „apoptotic protease-activating factor-1“
APC	antigen prezentující buňky
CA 125	nádorový antigen
CA 19-9	nádorový antigen
CA 72-4	nádorový antigen
CCL	chemokin
CCR	chemokinový receptor
CD1a	název proteinu „cluster of differentiation 1a“
CEA	karcinoembryonální antigen
DC	dendritické buňky
DC-LAMP	název proteinu „lysosome-associated membrane glykoprotein“
DFS	interval bez známek onemocnění
DISC	„death inducing signalling complex“
EGFR	receptor pro epidermální růstový faktor
ELISA	imunologická vyšetřovací metoda „enzyme-linked immunosorbent assay“
EpCAM	adhezivní molekula epiteliálních buněk
FIGO	zkratka pro organizaci „International federation of gynecology and obstetrics“
FoxP3	název proteinu „forkhead box p3“
GM-CSF	granulocytární-makrofágový kolonie stimulující faktor
hCG	lidský choriový gonadotropin
HE4	lidský epididymální protein 4
HLA	lidský leukocytární antigen „human leukocyte antigen“
IAP	inhibitory apoptotických proteinů
IFN- α	interferon alfa
IFN- γ	interferon gamma
IL	interleukin

K-ras	název onkogenu „v-ki-ras2 kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog“
mDC	myeloidní dendritické buňky
MHC	hlavní histokompatibilní komplex „major histocompatibility complex“
MOMP	„mitochondria outer membrane permeabilization“
NECL2	název proteinu „nectin-like 2“
NK	přirozený zabíječ „natural killers“
OS	celkové přežití
PCR	polymerázová řetězová reakce
pDC	plazmacytoidní dendritické buňky
PMA	forbolmyristát acetát
RAG	gen pro rekombinaci T a B buněčných receptorů
TAP	název proteinu „transporter associated with antigen processing“
Tc	cytotoxické T lymfocyty
TGF- β	transformující růstový faktor beta
Th	pomocné T lymfocyty
TILs	tumor-infiltrující lymfocyty
TNM	klasifikace rozsahu nádorového šíření (T – nádor, N – uzliny, M - metastázy)
TSDR	název úseku DNA „treg-specific demethylated region“
UICC	zkratka pro mezinárodní organizaci „Union internationale contre le cancer“
VEGFR	receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor

Obsah

1	Abstrakt.....	6
2	Úvod do problematiky.....	8
2.1	Úvod.....	8
2.2	Role imunitního systému v obraně proti nádorům.....	8
2.2.1	Historie a současnost znalostí o vztahu imunitního systému a nádorů.....	8
2.2.2	Editace nádoru imunitním systémem	10
2.2.3	Úloha zánětu u nádorových onemocnění	12
2.3	Základní charakteristiky nádorových buněk.....	12
2.3.1	Nádorové antigeny	12
2.3.2	Autokrinní stimulace	14
2.3.3	Schopnost neodpídat na protirůstové signály	15
2.3.4	Schopnost inhibovat apoptózu.....	15
2.3.5	Proliferace nádorových buněk.....	16
2.3.6	Invazivita do okolních tkání a metastazování	16
2.3.7	Mechanismy úniku nádorových buněk před imunitním systémem.....	16
2.3.8	Genetické změny nádorových buněk – mutace v onkogenu K-ras	17
2.4	Základní charakteristiky imunokompetentních buněk	17
2.4.1	Subpopulace dendritických buněk.....	17
2.4.2	Subpopulace T lymfocytů	18
2.5	Význam imunitní reakce v nádoru pro prognózu onemocnění u vybraných solidních tumorů.....	19
2.5.1	Imunitní reakce u kolorektálního karcinomu	19
2.5.2	Imunitní reakce u ovariálního karcinomu.....	20
3	Hypotézy a cíle práce	22
3.1	Význam imunitního infiltrátu u kolorektálního karcinomu a jeho korelace s K-ras mutacemi pro prognózu onemocnění.....	22
3.2	Sledování dynamiky imunitního infiltrátu v závislosti na stádiu ovariálního karcinomu	22
4	Materiál a metodika	24
5	Výsledky a diskuze	25
5.1	Význam imunitního infiltrátu u kolorektálního karcinomu a jeho korelace s K-ras mutacemi a prognózou onemocnění	25
5.2	Dynamika imunitního infiltrátu v průběhu progresu ovariálního karcinomu. Postupná změna imunitní reakce od efektorových Th17 lymfocytů k regulačním T lymfocytům.....	34
5.3	K-ras mutace a nádory infiltrující lymfocyty u karcinomu kolon, současnost a výhledy	45
5.4	Imunitní systém a kontrola nádorového bujení: Mechanismy zahájení imunitní odpovědi a role imunitního systému v obraně proti nádorům	52
6	Závěr.....	63

6.1	<i>Význam imunitního infiltrátu u kolorektálního karcinomu a jeho korelace s K-ras mutacemi pro prognózu onemocnění</i>	63
6.2	<i>Sledování dynamiky imunitního infiltrátu v závislosti na stádiu ovariálního karcinomu</i>	64
7	Poděkování	65
8	Seznam citované literatury	66
9	Seznam vlastních publikací	73
9.1	<i>GAUK</i>	73
9.2	<i>Publikace s IF ve vztahu k disertační práci</i>	73
9.3	<i>Publikace bez IF v recenzovaných časopisech ve vztahu k disertační práci</i>	73
9.4	<i>Abstrakta v recenzovaných sbornících ve vztahu k disertační práci</i>	74

1 Abstrakt

Prognóza nádorového onemocnění je v současné době zpravidla stanovena na základě histopatologického vyšetření resekátu primárního nádoru. K určení rozsahu onemocnění se běžně používá AJCC/UICC klasifikace (TNM klasifikace), která stratifikuje nemocné do jednotlivých klinických stádií a je zároveň určujícím kritériem pro indikaci adjuvantní onkologické léčby. Nevýhodou TNM klasifikace je skutečnost, že nepřináší žádné informace o biologickém chování nádoru a proto prognóza pacienta stejného klinického stádia se do značné míry může lišit. Aktuálním tématem je proto hledání nových prognostických a prediktivních biomarkerů, které povedou k zpřesnění dosavadních klasifikačních systémů a racionalizaci adjuvantní onkologické léčby. Nedávno publikovaná data získaná od pacientů s nádorovým onemocněním prokazují, že přítomnost efektorových T lymfocytů v nádorové tkáni je významným prognostickým faktorem. Cílem této práce je analýza imunitního infiltrátu u kolorektálního a ovariálního karcinomu. U pacientů s kolorektálním karcinomem byla stanovena mutace v onkogenu K-ras a provedena analýza imunitních buněk infiltrujících nádorovou tkáň ve vztahu k recidivě onemocnění. Pacienti s mutantní formou kodonu 13, nízkou denzitou TILs a vysokým poměrem nezralých/zralých dendritických buněk (CD1a+/DC-LAMP+ ratio) v nádorové tkáni byli označeni za rizikové, ohrožené relapsem onemocnění. U pacientek s ovariálním karcinomem byla provedena analýza hodnotící dynamiku imunitního infiltrátu v průběhu nádorové progresse. Získaná data prokázala změnu imunitní reakce v průběhu progresse ovariálního karcinomu od efektorových Th17 lymfocytů směrem k aktivovaným regulačním T lymfocytům (Helios+) spolu s vysokým počtem monocytů/makrofágů a myeloidních dendritických buněk. Intratumorózní Treg byly do nádoru rekrutovány z periferní krve prostřednictvím interakce CCR4/CCL22. Chemokin CCL22 byl produkován zejména nádorovými buňkami, monocyty/makrofágy a myeloidními dendritickými buňkami v mikroprostředí nádoru pod vlivem IFN- γ . Tato práce prokazuje, že recruitment Treg z periferní krve pod vlivem zánětlivých mediatorů se významně podílí na imunopresivním mikroprostředí nádoru v pokročilém stádiu ovariálního karcinomu.

Klíčová slova: kolorektální karcinom, K-ras, tumor-infiltrující lymfocyty, ovariální karcinom, regulační T lymfocyty, Th17 lymfocyty

Prediction of clinical outcome in cancer is usually achieved by histopathological evaluation of tissue samples obtained during surgical resection of the primary tumor. Traditional tumor staging (AJCC/UICC-TNM classification) summarizes data on tumor burden (T), presence of cancer cells in draining and regional lymph nodes (N) and evidence for metastases (M). However, it is now recognized that clinical outcome can significantly vary among patients within the same stage. Data collected from large cohorts of human cancers has demonstrated the impact of immune-classification, which has a prognostic value that may add largely to the significance of the AJCC/UICC TNM-classification. In our study we examined the immune cells that infiltrated the tumor tissues of colorectal and ovarian cancer patients. In a cohort of newly diagnosed colorectal cancer patients we examined the correlations between the *KRAS* mutational status, patterns of tumor-infiltrating immune cells and the presence of tumor recurrence. Our data suggest that colorectal cancer patients with low levels of tumor-infiltrating lymphocytes, a high CD1a/DC-LAMP tumor-infiltrating dendritic cells ratio, and a *KRAS* mutation in codon 13 are at a high risk of disease recurrence. In ovarian cancer patients we focused on the dynamics of the tumor-infiltrating immune cells during disease progression. The early stages of development of ovarian carcinomas were characterized by a strong Th17 immune response, whereas in disseminated tumors, we detected a dominant population of Helios+ activated regulatory T cells along with high numbers of monocytes/macrophages and myeloid dendritic cells. Tumor-infiltrating Tregs were probably recruited to the tumor tissue via a CCL22/CCR4 interaction. CCL22 was mainly produced by tumor cells, monocytes/macrophages and myeloid dendritic cells in the primary ovarian tumors, and its expression markedly increased in response to IFN- γ . Taken together, the specific recruitment of Tregs, probably triggered by inflammatory stimuli, leads to a significant immune suppression in the advanced stages of ovarian cancer. Our findings clearly show a dynamic shift from an active anti-tumor immune response to a significant immune suppression in the advanced ovarian cancer.

Keywords: colorectal cancer, *KRAS*, tumor-infiltrating lymphocytes, ovarian cancer, regulatory T cells, Th17 lymphocytes

2 Úvod do problematiky

2.1 Úvod

Prognóza nádorového onemocnění je v současné době zpravidla stanovena na základě histopatologického vyšetření resekátu primárního nádoru. K určení rozsahu onemocnění se běžně používá AJCC/UICC klasifikace (TNM klasifikace), která stratifikuje nemocné do jednotlivých klinických stádií a je zároveň určujícím kritériem pro indikaci adjuvantní onkologické léčby. Nevýhodou TNM klasifikace je skutečnost, že nepřináší žádné informace o biologickém chování nádoru a proto prognóza pacienta stejného klinického stádia se může do značné míry lišit. Aktuálním tématem je hledání nových prognostických a prediktivních biomarkerů, které povedou k selekci rizikových pacientů napříč klinickými stádii a racionalizaci adjuvantní onkologické léčby. Vedle řady molekulárních biomarkerů představuje jednu z možností analýza imunitních buněk infiltrujících nádorovou tkáň. Existují důkazy pro to, že imunitní systém je schopen kontrolovat a regulovat růst nádorových buněk, a to zejména v raných stádiích karcinogeneze [1, 2]. Nedávno publikovaná data získaná od pacientů s kolorektálním karcinomem prokazují, že přítomnost efektorových T lymfocytů v nádorové tkáni je významným prognostickým faktorem, dokonce lepším než standardně používaná TNM klasifikace [3, 4]. Studium imunitní reakce u nádorového onemocnění přináší nové možnosti prohloubit naše poznatky o vývoji a růstu nádoru. Nádorové a imunologické markery zapojené do iniciace imunitní reakce proti nádoru mohou posloužit jako cílové molekuly pro nové terapeutické přístupy a mohou být využity pro diagnostické, prognostické a prediktivní účely.

2.2 Role imunitního systému v obraně proti nádorům

2.2.1 Historie a současnost znalostí o vztahu imunitního systému a nádorů

Názor, že imunitní systém je schopen rozeznat nádorové bujení a odpovídat na něj, byl poprvé formulován na počátku dvacátého století americkým chirurgem W. Coleyem, jenž zaznamenal regresi nádorů v průběhu bakteriálních infekcí. V roce 1950 byly publikovány studie, které ukázaly, že inbrední myši mohou být imunizovány proti nádorům indukovaným karcinogeny a že protilátky vytvořené proti odvrženému tumoru

byly specifické. Tyto objevy vedly v roce 1957 k formulaci hypotézy o protinádorovém imunitním dohledu. Hypotéza byla vyslovena Thomasem a Burnetem a vypovídala o existenci ochranných buněk z thymu, které monitorují přítomnost neoplastických buněk [5].

Nezpochybnitelnou roli imunitního systému v obraně proti nádorům poskytly studie na myších bez funkčních genů pro rekombinaci T a B buněčných receptorů RAG-1 a RAG-2 (RAG^{-/-}). RAG^{-/-} myši vyvíjejí chemicky indukované nádory rychleji a s větší frekvencí než imunokompetentní kontroly, ale také tvoří mnohem více spontánních tumorů, pokud experiment probíhá delší dobu [6].

Experimenty na dalších myších modelech vedly k identifikaci dalších buněčných komponent imunitního systému zapojených do obrany s nádorovým onemocněním. Selektivní eliminace NK buněk u myší, jimž byly podány anti-asialo-GM1 protilátky, je činí třikrát vnímavější k chemicky indukovaným tumorům. Podobně kmen myší, které nemají NK-T buňky, má vyšší incidenci chemicky indukovaných tumorů [7, 8].

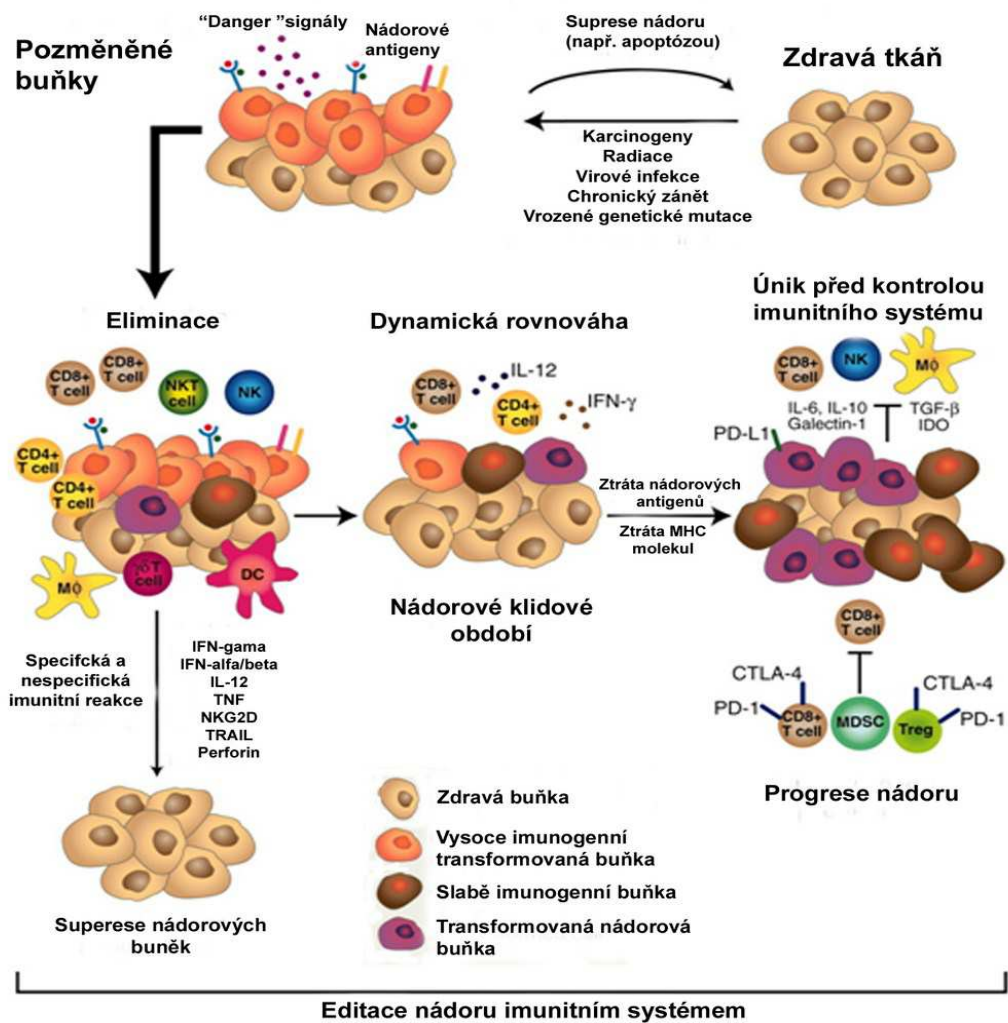
Dalším průlomem v nádorové imunologii jsou studie Roberta Schreibra na univerzitě ve Washingtonu, jež hovoří o zásadní roli interferonu- γ v imunitním dohledu. IFN- γ podporuje tvorbu antigen-specifických Th1 buněk a cytotoxických T lymfocytů, podporuje aktivaci dendritických buněk a makrofágů a inhibuje angiogenezi, ztráta jeho funkce zvyšuje vnímavost k chemicky indukovaným i spontánním nádorům [9-12]. Další experimenty identifikovaly jako důležitou molekulu protinádorové imunity perforin [13].

V současné době tedy existují dostatečné důkazy pro to, že v kontrole nádorového růstu hraje imunitní systém důležitou roli. Podmínkou pro účinnou imunitní reakci proti nádoru je předpoklad, že imunitní systém je schopen rozpoznat neoplastické buňky a zničit je dříve, než se projeví jako klinicky závažné onemocnění. Nádorové buňky exprimují na svém povrchu antigenní struktury, které se na jiných buněčných typech nevyskytují vůbec, nebo pouze ve velmi malé míře. Těchto tzv. nádorově specifických, resp. asociovaných antigenů je již popsáno velké množství. Problémem však je, že nádorové buňky samy nemohou fungovat jako antigen prezentující buňky, jelikož na svém povrchu neexprimují kostimulační molekuly. Další úskalí představuje fakt, že nádorové buňky disponují celou řadou mechanismů, pomocí nichž jsou schopné uniknout imunitnímu systému.

2.2.2 Editace nádoru imunitním systémem

Původní teorie Thomase a Burneta o imunitním dohledu proti nádorovým buňkám byla brzy rozšířena novými poznatky získanými na imunodeficitních myších modelech RAG. Nová hypotéza Dunna et al., nazvaná „Cancer immune Editing“, tj. editace nádoru imunitním systémem, poukázala na významné rozdíly v imunogenicitě nádorů v závislosti na hostiteli, ve kterém rostly [14]. Přenos nádoru rostoucího v RAG-2 -/- myši bez funkčního imunitního systému do kontrolní myši téhož kmene vedl k rychlé implantaci a rozvoji všech tumorů. Stejněho výsledku bylo dosaženo při přenosu nádoru izolovaného z imunokompetentní myši do kontrolní myši stejného kmene, tedy myši s funkčním imunitním systémem. Zajímavé a překvapivé je ovšem zjištění, že téměř 50% tumorů rostoucích v RAG-2 -/- imunokompromitovaných myších bylo odvrženo po přenosu do imunokompetentního hostitele. Tyto výsledky ukazují, že imunitní systém vyvíjí na nádorové buňky neustálý selekční tlak, který vede k selekci takových variant transformovaných buněk, které dokáží uniknout efektorovým mechanismům imunitního systému. Nádory rostoucí v nepřítomnosti funkčního imunitního systému, jsou tedy více imunogenní než tumory vytvořené v imunokompetentních hostitelích. Dunn rozlišuje tři odlišné úrovně v procesu boje imunitního systému proti nádorovým buňkám – eliminaci transformované buňky (elimination), ustanovení rovnováhy mezi transformovanou buňkou a organismem (equilibrium) a únik transformované buňky před kontrolou imunitního systému (escape) (obr.1). Zpravidla je nádorová buňka rozpoznána v časných stádiích transformace a zničena imunitním systémem. Celý proces zde může skončit nebo přejít do dalších fází. Ve fázi ustanovení rovnováhy hostitelský imunitní systém a přežívající nádorové buňky vcházejí do stadia dynamické rovnováhy. Neomezená přizpůsobivost nádorových buněk vyplývající z rostoucí genetické nestability nakonec vede ke vzniku nových genotypů, které zmenší imunogenicitu a může dojít k fázi úniku této buňky před kontrolou imunitního systému. Klinickým korelátem fáze ustanovení rovnováhy je preneoplastické onemocnění, které zůstává nejčastěji bohužel nedagnostikované. Výsledkem stadia rovnováhy mohou být tři různé situace: 1. kompletní eliminace nádorových buněk; 2. dlouhodobé udržení dynamické rovnováhy mezi aktivní imunitní odpovědí a vymezenou populací nádorových buněk; 3. únik před kontrolou imunitní reakce a rozvoj klinického onemocnění.

Pokud imunitní systém nádorové buňky rozpozná, bojuje proti nim všemi hlavními imunitními mechanismy, a to jak nespecifickými (neutrofilní granulocyty, aktivované makrofágy, NK buňky, komplement), tak specifickými (Th1 a Tc lymfocyty, protilátky aktivující komplement nebo protilátky zprostředkovávající buněčnou toxicitu (ADCC)). Spojkou mezi oběma systémy jsou buňky dendritické, které reagují na signál „nebezpečí“ a imunitní reakci adekvátně podle druhu podnětu směřují.



Upraveno podle Schreiber RD et al, Science 2011

Obr. 1 Teorie protinádorového dohledu, editace nádoru imunitním systémem a klinický korelát jednotlivých stádií

2.2.3 Úloha zánětu u nádorových onemocnění

Skutečnost, že zánět je silně propojený s nádorovým onemocněním, je v dnešní době již dobře známým faktem. Zejména zánět chronický přispívá k rozvoji nádorového onemocnění. Tato zjištění však nepopírají hypotézu imunitního dohledu. Specifická imunitní odpověď namířená proti nádorovým buňkám může vést k jejich eliminaci, zatímco chronický zánět udržovaný přetrvávající virovou infekcí nebo dlouhodobou expozicí karcinogenům vede k produkci cytokinů, chemokinů, růstových faktorů a ke zvýšení genetické nestability [15]. Zároveň se uvažuje o možnosti, že chronický zánět potlačuje specifickou imunitní odpověď proti nádorovému onemocnění. Změny v nádorovém mikroprostředí patří mezi hlavní překážky imunoterapie v léčbě nádorového onemocnění.

2.3 Základní charakteristiky nádorových buněk

2.3.1 Nádorové antigeny

Maligní transformace buňky je složitý a mnohastupňový proces, na jehož vzniku se podílí řada faktorů. Většinou jde o důsledek selhání mechanismů regulace buněčného dělení. Tyto poruchy vyvolávají nejčastěji mutace v onkogenech a anti-onkogenech. Nádorové buňky se vyvíjejí z buněk organismu vlastních, od kterých se liší expresí nádorových antigenů. Základní předpoklad pro interakci imunitního systému s nádorovou buňkou je existence nádorově specifických povrchových antigenů, jež by umožnily rozpoznání nádorových buněk. Navzdory této skutečnosti řada nádorových buněk imunitnímu systému díky malé odlišnosti od zdravých buněk uniká.

Série experimentů na myších modelech prokázala přítomnost imunitní reakce jak proti nádorům vzniklým po působení karcinogenů (chemických i fyzikálních), tak i proti nádorům bez umělé indukce [16, 17]. Tyto výsledky vedly ke vzniku teorie, že nádory bez ohledu na původ svého vzniku, exprimují jedinečné nádorové antigeny, které umožňují jejich rozpoznání a následnou eliminaci [17]. Buněčné proteiny, z kterých jsou odvozovány nádorové antigeny, jsou si u myší a lidí vzájemně podobné. Díky výzkumu na inbredních myších liniích byla již identifikována řada lidských nádorových antigenů.

Současným cílem je hledat takové nádorové antigeny, které splňují tyto charakteristiky: intenzivní exprese nádorového antigenu v různých nádorech, ale minimální ve zdravých tkáních; nepostradatelnost nádorového antigenu v procesu karcinogeneze, a to nejlépe v časných stádiích; bohaté zastoupení imunogenních epitopů v nádorovém antigenu s vysokou afinitou k HLA systému; rozeznatelnost nádorového antigenu T buňkami schopnými vyvolat imunitní odpověď; zastoupení epitopů v nádorovém antigenu, které jsou přirozeně zpracovávány v proteasomu nádorové buňky [18].

- **Nádorové antigeny u kolorektálního karcinomu v klinické praxi**

V současné době neexistuje univerzální metoda k detekci kolorektálního karcinomu. Představa citlivého markeru stanoveného z pouhého krevního odběru je určitě lákavá, ale takový marker není zatím k dispozici. V diagnostice je proto využíváno kombinace vyšetření. Jedná se především o klinické vyšetření, vyšetření onkomarkerů a diagnostických modalit jako jsou RTG, kolonoskopie, UZ, CT, PET/CT. Z onkomarkerů kolorektálního karcinomu je v praxi dostupné stanovení karcinoembryonálního antigenu. Jedná se o buněčný adhezivní glykoprotein, který je produkován buňkami kolorektálního karcinomu. Jeho vyšetření neslouží k diagnostickým účelům, ale především k monitorování nemocných po léčbě. Dojde-li po operaci k vymizení CEA, znamená to, že nádor je s velkou pravděpodobností úplně odstraněn. Přetrvávající resp. obnovená pozitivita CEA svědčí pro přítomnost metastáz nebo pro recidivu nádoru. Z hlediska diferenciální diagnostiky je důležité vědět, že hladiny CEA bývají vyšší u kuřáků, ale obvykle nepřekračují hodnotu 10 ng/ml [19-21]. Senzitivita a specifita vyšetření při detekci rekurence onemocnění se liší v závislosti na určení abnormální hodnoty CEA (cut-off CEA) a lokalizaci rekurence nádoru (játra 70%, plíce 15%) [22-24]. Vyšetření CEA se velice často doplňuje o stanovení hladiny nádorového markeru CA 19-9. Tato kombinace vyšetření zvyšuje senzitivitu záchytu progresu onemocnění [25]. Vedle výše uvedených onkomarkerů lze testovat pomocí několika různých panelů nádorovou DNA izolovanou ze vzorků stolice nebo krve. V současné době jsou tyto DNA – testy ve stádiu klinického výzkumu a cena těchto testů se blíží ceně kolonoskopického vyšetření.

- **Nádorové antigeny u ovariálního karcinomu v klinické praxi**

Zhoubné nádory vaječníku tvoří velmi heterogenní skupinu. Zdaleka nejčastějším typem jsou tzv. epitelální karcinomy, které tvoří 70 – 90% všech zhoubných nádorů ovaria. Ostatní typy nádorů vaječníku (germinální, gonadostromální, smíšené, sekundární metastatické) jsou vzácné. V současné době je pro nádory vaječníku nejpoužívanějším sérovým markerem glykoprotein CA 125. Je exprimován asi u 80% epitelálních karcinomů serózního typu v pokročilém stádiu [26]. K nevýhodám CA 125 patří nízká senzitivita (50%) u I. stádia choroby dle FIGO klasifikace a problematická specifita (hladiny nad cut-off i u benigních gynekologických patologií nebo u malignit v jiných lokalitách). Tyto nedostatky limitují použití CA 125 pro účely celoplošného screeningu. Nejdůležitější použití CA 125 zůstává v monitoraci nemocných s epitelálním karcinomem. Novým slibným sérovým markerem pro nádory vaječníku je lidský epididymální protein 4 (HE4), který byl poprvé identifikován v epitelu distální oblasti nadvarlete. HE4 je exprimován zejména epitelálními karcinomy serózního typu a vykazuje vysokou senzitivitu i v časných stádiích onemocnění (stádium I/II), což z něj činí vhodný marker pro detekci raných fází ovariálního karcinomu, kdy je prognóza pacientek příznivá [27, 28]. Pro posouzení rizika epitelálního karcinomu se v současné době u pacientek, u nichž je přítomna suspektní rezistence v malé pánvi a mají se podrobit chirurgické intervenci, provádí kombinované vyšetření HE4 a CA 125 pro výpočet tzv. ROMA skóre. Jde o výpočet určité hodnoty skóre z naměřených koncentrací HE4 a CA 125, které informuje jaké je riziko výskytu maligního nádoru [29-32]. Dalšími využitelnými nádorovými markery jsou CA 19-9, CA 72-4 (epitelální karcinomy mucinózního typu) a AFP, hCG (germinální nádory). Pro epitelální karcinomy ovaríí je charakteristická vysoká exprese adhezivní molekuly epitelálních buněk (EpCAM) [33, 34]. Vyšetření tohoto markeru nachází své uplatnění zejména při analýze metastáz nejasného origa k ozřejmení primárního nádoru.

2.3.2 Autokrinní stimulace

Nádorové buňky během svého vývoje přestávají podléhat kontrole imunitního systému, zároveň neodpovídají na produkci růstových faktorů od ostatních buněk. Naproti tomu produkují celou řadu růstových faktorů, na které samy odpovídají.

Některé z těchto faktorů mohou ovlivňovat imunitní systém. Například IL-4 a IL-10 jsou autokrinní růstové faktory karcinomu štítné žlázy. Oba tyto cytokiny polarizují T lymfocytární odpověď ze směru Th1 do Th2, jež přispívá k inhibici protinádorové imunitní odpovědi, která převážně závisí na Th1 větvi. Dalším příkladem je cytokin IL-6, autokrinní faktor nádorových buněk, který blokuje kontakt mezi přirozenou a adaptivní imunitní reakcí u rozsáhlého spektra lidských nádorových onemocnění [35-38].

2.3.3 Schopnost neodpovídat na protirůstové signály

Ve zdravé tkáni funguje celá řada antiproliferačních signálů, které udržují tkáňovou homeostázu. Jedním z nejvýznamnějších antiproliferačních signálů je transformující růstový faktor β [39-42]. TGF- β ovlivňuje mnoho populací buněk svým imunosupresivním účinkem. V případě dendritických buněk blokuje schopnost jejich antigenní prezentace. Dále inhibuje aktivitu IFN γ , redukuje proliferaci T buněk, snižuje cytotoxickou aktivitu NK buněk a stimuluje proliferaci regulačních lymfocytů.

2.3.4 Schopnost inhibovat apoptózu

Apoptóza může být spuštěna dvěma základními cestami. Mitochondriální dráhou, která zahrnuje rozrušení vnější mitochondriální membrány [43] a dráhou přes „death receptor“, která zahrnuje formaci komplexu DISC (death-inducing signalling complex) [44]. Nádorové buňky jsou však schopné vyvíjet resistenci k hlavním signálům spouštějícím apoptózu. Mezi endogenní inhibitory MOMP (mitochondria outer membrane permeabilization) patří např. anti-apoptické proteiny BCL-2, BCL-X a MCL1 produkované B buněčným lymfomem. Dále bylo zjištěno, že nádorové buňky často postrádají expresi funkční molekuly APAF1 (apoptotic-protease-activating factor-1), která je nezbytná pro apoptosomově-dependetní aktivaci kaspáz. Dalším příkladem je zvýšená exprese inhibitorů apoptotických proteinů (IAPs) na povrchu nádorových buněk, které také inhibují aktivaci kaspáz.

2.3.5 Proliferace nádorových buněk

Nádorové buňky jsou schopné pomocí upregulace exprese enzymu telomerázy procházet neomezeným množením. K „nesmrtelnosti“ nádorových buněk také přispívají různé mutace, jako mutace v proteinu p53 či jeho naprostá ztráta. Pokud nádorová buňka neexprimuje protein p53 [45], exprese regulátoru buněčného cyklu B1 je také snížena a buňka prochází neomezenými cykly buněčného dělení.

2.3.6 Invazivita do okolních tkání a metastazování

Většina úmrtí spojených s nádorovými onemocněními je spojená s jejich schopností metastazovat. Nádorové buňky mohou inaktivovat celou řadu proteinů, jako je např. nectin-like 2 protein (NECL2). Inaktivace tohoto proteinu umožní buňkám odpoutat se od ložiska primárního nádoru a volně se pohybovat krevním oběhem [46]. Podobný efekt mají proteolytické enzymy např. katepsin, jež umožňuje buňkám odpoutat se od ložiska primárního nádoru a zakládat metastázy.

2.3.7 Mechanismy úniku nádorových buněk před imunitním systémem

Nádorové buňky jsou schopné uniknout kontrole imunitního systému pomocí celé řady strategií [47]. Důležitých mechanismem je produkce cytokinů, které inhibují protinádorovou imunitní reakci, jako je TGF- β a IL-10. Oba zmíněné cytokiny jsou schopné přímo inhibovat maturaci dendritických buněk. Dalším únikovým mechanismem jsou mutace v genech, které kódují bílkoviny důležité pro prezentaci antigenů v antigen prezentujících buňkách (APC). Příkladem mohou být mutace v genech pro β 2-mikroglobulin, TAP (transporter associated with antigen processing) či v genech kódujících podjednotky proteasomu [48]. Tyto závažné mutace vedou ke vzniku rezistence k CD8 T lymfocytům. Tento fakt je obtížné překonat, přestože snížená exprese MHC glykoproteinu I. třídy vede k vyšší vnímavosti nádorových buněk k NK buňkám. Nádorové buňky také exprimují molekuly B7-H1, B7-H4 nebo indolamin 2,3-dioxygenázu, jež indukují anergii antigen specifických T lymfocytů [49, 50].

2.3.8 Genetické změny nádorových buněk – mutace v onkogenu K-ras

Podstatou vývoje nádoru je postupné hromadění genetických a epigenetických změn. Mezi nejběžnější mutace u lidských maligních onemocnění patří mutace v onkogenu K-ras (nádory slinivky břišní, tlustého střeva, adenokarcinomy plic a další). K-ras kóduje protein s GTPázovou aktivitou o velikosti 21 kDa. Jeho fyziologickou funkcí je zprostředkovat přenos podnětů z aktivovaných membránových receptorů do buněčného jádra a stimulovat tak buněčnou proliferaci a diferenciaci. V procesu tumorigeneze dochází velmi často k poškození K-ras genu bodovými mutacemi, které vedou ke konstitutivní aktivaci K-ras proteinu. Ve většině případů jsou tyto mutace lokalizovány v kodonu 12 a 13. Výskyt mutace je asociován s horší prognózou onemocnění, často spojenou s chemorezistencí nádorových buněk. Rovněž přítomnost mutace v onkogenu K-ras je negativním prediktivním znakem pro použití cílené terapie pomocí inhibitorů EGFR, tj. cetuximabu či panitumumabu [51-53]. U kolorektálního karcinomu se mutace v onkogenu K-ras vyvíjí v časně fázi tumorigeneze, během progresu z adenomu na karcinom, a její prevalence se u zmíněné malignity pohybuje mezi 30 – 50% [54-56].

2.4 Základní charakteristiky imunokompetentních buněk

2.4.1 Subpopulace dendritických buněk

Dendritické buňky (DC) jsou nejdůležitější antigen prezentující buňky, které mají schopnost stimulovat naivní T a B lymfocyty a regulovat tak imunitní odpověď organismu. DC se v organismu vyskytují jednak ve formě nezralé, jednak zralé. Nezralé formy jsou rozmístěny ve všech tkáních, které jsou na rozhraní organismu a okolního prostředí (kůže, sliznice dýchacího a zažívacího traktu). V případě, že není v organismu přítomna infekce, nezralé DC průběžně pohlcují odumřelé buňky zdravých tkání a následně migrují do sekundárních lymfatických orgánů. Během své cesty pak takové pohlcené vlastní molekuly zpracují a jejich fragmenty vystaví v komplexu s MHC proteiny na svém povrchu. Rozpoznání takového normálního autoantigenu v sekundárních lymfatických orgánech nevede pak k aktivaci specifických T lymfocytů, ale k jejich anergii nebo ke vzniku tzv. regulačních T lymfocytů (Treg), které imunitní reakce vůči danému antigenu aktivně potlačují (princip periferní tolerance). Pokud

nezralé DC rozpoznají podnět, který ale představuje pro organismus nebezpečí (patogenní mikroorganismy, vlastní nekrotické buňky), tak se aktivují a stávají se z nich zralé DC. Maturace DC je spojena s dramatickými změnami jejich vlastností – ztráta schopnosti pohlcovat částice z okolí, schopnost efektivní prezentace antigenu (zvýšená exprese MHC proteinů, kostimulačních a adhezivních molekul), produkce cytokinů potřebných pro optimální stimulaci diferenciaci antigeně specifických efektorových T lymfocytů (např. IL-1, IL-6, IL-12, TNF). Pouze zralé DC dokáží aktivovat naivní T lymfocyty, tj. takové, které se dosud neseťkaly s antigenem. Maturované DC přežívají asi 2-3 dny, poté hynou apoptózou. Zásoby DC jsou kontinuálně doplňovány z prekurzorů v kostní dřeni a snad i z krevních monocytů. Výše zmíněné nezralé a zralé DC jsou označovány jako tzv. myeloidní DC (mDC). Kromě nich existují ještě morfologicky a funkčně odlišné plasmacytoidní DC (pDC) (lymfoidní linie). Pro mDC jsou hlavními růstovými a diferenciacními faktory IL-4 a GM-CSF a jejich hlavní funkcí je stimulovat ve zralém stádiu antigeně specifické T lymfocyty. Pro pDC jsou hlavními růstovými faktory CD40L a IL-3. Exprese receptoru pro IL-3 (CD123) je pro pDC charakteristická a využívá se k identifikaci pDC v krvi a tkáních. pDC po setkání s viry produkují velké množství IFN- γ , který je důležitý i pro aktivaci NK a NK-T buněk (antivirová imunita). DC představují nástroj pro léčbu infekcí, nádorových onemocnění, autoimunitních onemocnění, alergií a uplatňují se i v transplantologii [57-59].

2.4.2 Subpopulace T lymfocytů

Antigeně specifický (adaptivní) imunitní systém je značně komplikovaný a zásadní roli v něm hrají T a B lymfocyty (antigeně specifické receptory T lymfocytů, protilátky). V organismu existuje několik různých subpopulací T lymfocytů. Hlavními představiteli T lymfocytů recirkulujících v krvi a v tkáních jsou ty, které nesou molekuly CD8 (koreceptor pro MHC glykoprotein I. třídy) a CD4 (koreceptor pro MHC glykoprotein II. třídy). Většina CD8 T lymfocytů jsou pak prekurzory cytotoxických T lymfocytů (Tc) nebo paměťové buňky tohoto funkčního typu. Většina CD4 T lymfocytů jsou prekurzory pomocných T lymfocytů (Th), které se podle produkce hlavních cytokinů dále dělí na Th1 (produkce IL-2, IFN- γ) a Th2 (produkce IL-4, IL-5, IL-6 a IL-10). Tzv. Th0 klony produkují směs cytokinů typu 1 a 2. Jako Th3 se označují ty T lymfocyty, které intenzivně produkují TGF- β , jako Tr1 ty, které produkují velké

množství IL-10. Další recentně objevenou subpopulací T lymfocytů jsou tzv. Th17 lymfocyty [60]. Hlavní charakteristikou těchto buněk je sekrece IL-17, který má významné prozánětlivé vlastnosti. Th17 lymfocyty se diferencují z Th0 lymfocytů pod vlivem IL-23 produkovaného buňkami nespecifické imunity. Vedle pomocných T lymfocytů (Th) patří do skupiny CD4 T lymfocytů tzv. regulační (supresorové) T lymfocyty (Treg), které jsou schopny potlačovat aktivity jiných efektorových T lymfocytů. Regulační T lymfocyty se rozdělují na přirozené a indukované. Přirozené Treg jsou vytvářeny v thymu, tvoří zhruba 5% všech krevních lymfocytů, jsou silně závislé na IL-2 (exprese receptoru pro IL-2 CD25) a vyznačují se expresí transkripčního faktoru FoxP3. Mechanismy jejich působení zahrnují supresi pomocí inhibičních cytokinů (IL-10, TGF- β a IL-35), supresi přímým kontaktem (cytotoxické působení – sekrece perforinu a granzymů), supresi ovlivněním metabolismu efektorových T lymfocytů (vyčerpání růstového faktoru IL-2 a jeho nedostatek pro efektorové buňky) a supresi pomocí modulace zrání a funkce dendritických buněk (indukce exprese indolamin 2,3-dioxygenázy dendritickými buňkami katabolizující aminokyselinu tryptofan nezbytnou pro správnou proliferaci a diferenciaci efektorových T lymfocytů). Indukované regulační T lymfocyty vznikají v periferních tkáních z naivních CD4 T lymfocytů působením TGF- β ve vysokých koncentracích. Mezi tyto buňky patří již výše zmíněné Th3 a Tr1. Hlavní úlohou Treg je zjevně zabezpečovat periferní toleranci a bránit vzniku autoimunitních onemocnění, na druhou stranu jejich role může být důležitá při vzniku a progresi nádorového onemocnění. Treg dokáží inhibovat protinádorovou imunitní odpověď. Taková inhibice poté může mít pro onkologické pacienty fatální následky, neboť jejich imunitní systém nedokáže s nádorovými buňkami efektivně bojovat. Tím se Treg stávají jednou z hlavních překážek pro protinádorovou imunoterapii [61-65].

2.5 Význam imunitní reakce v nádoru pro prognózu onemocnění u vybraných solidních tumorů

2.5.1 Imunitní reakce u kolorektálního karcinomu

Imunitní systém hraje důležitou roli v kontrole růstu nádorových buněk a to zejména v raných stádiích tumorigeneze. S pokročilým růstem nádoru se imunitní mechanismy víceméně paralyzují a mnohdy mají naopak podpurný účinek ve prospěch

proliferace nádorových buněk. Nedávno publikovaná data získaná od pacientů s kolorektálním karcinomem prokazují, že zastoupení různých subpopulací T lymfocytů, jejich rozmístění vzhledem k nádoru a jejich množství predikuje další klinický osud pacientů [66, 67]. Studie Francka Pagése na univerzitě ve Francii, provedené na histologických vzorcích získaných od pacientů s kolorektálním karcinomem, přesvědčivě prokazují, že přítomnost efektorových T lymfocytů (Th1 lymfocyty, Tc lymfocyty a paměťové T lymfocyty) v nádorové tkáni je pozitivním prognostickým faktorem. Význam imunitní reakce mj. v kontrole lokálního růstu nádoru, způsobu a rozsahu jeho lokální invaze a metastazování potvrzuje skutečnost, že přítomnost těchto efektorových T lymfocytů je v korelátu s histopatologickými nálezy vylučujícími časné metastatické šíření nádoru (perineurální šíření, angioinvaze, lymfangioinvaze) [3, 68]. Dosavadní studie ukazují, že pro příznivou prognózu pacientů s kolorektálním karcinomem hrají klíčovou úlohu zejména Tc lymfocyty infiltrující přímo nádorový epitel (intraepiteliální Tc lymfocyty), zatímco imunitní odpověď na rozhraní nádoru a zdravé tkáně se zdá být spíše nespecifická [66]. Důležitou část tumor-infiltrujících lymfocytů (TILs) tvoří regulační T lymfocyty, které dokážou inhibovat protinádorovou imunitní odpověď a v boji proti nádoru stojí na opačné straně než Tc lymfocyty. Recentně publikované práce ukazují, že vysoký poměr Tc/Treg lymfocytů infiltrujících nádorovou tkáň u pacientů s kolorektálním karcinomem je asociován s příznivou prognózou onemocnění (DFS, OS) [69]. Zastoupení Treg v nádoru se zvýšenou expresí FoxP3 (VEGFR2+ Treg), který propůjčuje supresivní funkce Treg, je negativním prognostickým markrem [70]. Vedle TILs je nádorová tkáň infiltrována dále antigen prezentujícími buňkami, které jsou zcela klíčové pro zahájení imunitní odpovědi. Prognostický význam jednotlivých subpopulací DC v nádoru u pacientů s kolorektálním karcinomem není zatím zcela objasněn [71, 72].

2.5.2 Imunitní reakce u ovariálního karcinomu

Ovariální karcinom patří mezi gynekologické zhoubné nádory s nejvyšší mortalitou. Většina pacientek (zhruba 70%) je vzhledem k neefektivnímu screeningu a nespecifickým příznakům diagnostikována v pokročilém stádiu nemoci. Úvodní léčba ovariálního karcinomu spočívající v primární cytoredukční operaci v kombinaci s adjuvantní chemoterapií na bázi platiny a paklitaxelu dosahuje klinické remise v 80% případů. Přesto zhruba u dvou třetin pacientek dochází v časovém intervalu 2 – 5 let

v důsledku rozvoje chemorezistence reziduálních nádorových buněk k relapsu onemocnění a úmrtí [73]. Tyto údaje jsou jednoznačným podnětem k hledání nových prognostických markerů a terapeutických metod, které povedou k časně diagnostice ovariálního karcinomu a zabrání relapsu onemocnění. Jednou z možností je analýza imunitních buněk infiltrujících nádorovou tkáň ovariálního karcinomu. Experimentální data potvrzují význam imunitního systému v kontrole růstů nádorových buněk u řady malignit [6, 8, 13]. Přesto spontánní vymizení nádoru v přítomnosti specifické protinádorové imunitní odpovědi je velmi vzácně. Důvodem jsou imunosupresivní mechanismy nádorové tkáně, které mají naopak podpůrný účinek ve prospěch proliferace nádorových buněk a jdou ruku v ruce s růstovou progresí nádoru [74]. Nedávno publikované práce získané od pacientek s karcinomem ovaria prokazují, že zastoupení různých subpopulací imunitních buněk infiltrujících nádorovou tkáň, jejich lokalizace v nádoru a jejich množství predikuje další klinický osud pacientek. Obdobně jako u kolorektálního karcinomu dosavadní studie ukazují, že pro příznivou prognózu pacientek s ovariálním karcinomem hrají i zde klíčovou úlohu zejména Tc lymfocyty infiltrující přímo nádorový epitel (intraepiteliální Tc lymfocyty) a nízká hladina intratumorálních Treg inhibujících protinádorovou imunitní odpověď. Společně s Treg se na tvorbě imunodepresivního mikroprostředí nádoru podílí dále intratumorální pDC a B7-H4 makrofágy a jejich zastoupení je u pacientek s ovariálním karcinomem negativním prognostickým faktorem [75, 76]. Další subpopulací intratumorálních T lymfocytů u ovariálního karcinomu jsou recentně objevené Th17 lymfocyty. Hlavní charakteristikou těchto buněk je sekrece IL-17, který má významné prozánětlivé vlastnosti. Prognostický význam intratumorálních Th17 lymfocytů u pacientek s ovariálním karcinomem není v současné době plně objasněn [77, 78]. Dosavadní práce hodnotí zejména prognostický význam různých typů intratumorálních imunitních buněk, ale minimum prací je zaměřeno na sledování dynamiky imunitního infiltrátu v závislosti na stádiu ovariálního karcinomu.

3 Hypotézy a cíle práce

Problematika této práce je členěna do dvou oblastí:

3.1 Význam imunitního infiltrátu u kolorektálního karcinomu a jeho korelace s K-ras mutacemi pro prognózu onemocnění

Jednotlivé úkoly řešené v průběhu experimentu:

- zavedení a optimalizace metodiky imunofluorescenčního značení parafinových řezů kolorektálního karcinomu
- imunofluorescenční analýza imunitních buněk infiltrujících nádorovou tkáň (CD3, CD8, FoxP3, CD1a, DC-LAMP) pomocí fluorescenčního mikroskopu
- stanovení mutace v onkogenu K-ras v parafinových řezech kolorektálního karcinomu
- korelace imunologických a molekulárních dat s klinickými parametry přežití

Naší hypotézou bylo:

Kombinace molekulárních biomarkerů s imunologickými daty představuje vhodný prognostický faktor pro selekci rizikových pacientů s kolorektálním karcinomem.

3.2 Sledování dynamiky imunitního infiltrátu v závislosti na stádiu ovariálního karcinomu

Jednotlivé úkoly řešené v průběhu experimentu:

- imunofluorescenční analýza imunitních buněk (Th1, Th17, Tc, Treg, mDC, pDC, mikrofágy/monocyty) v nádoru a periferní krvi pomocí průtokové cytometrie u pacientek s časným a pokročilým ovariálním karcinomem

- stanovení spontánní a stimulované sekrece cytokinů a chemokinů v nádoru pomocí imunochemické metody na bázi ELISA
- získání DNA z nádoru a vyšetření stavu metylace DNA v oblasti FoxP3 TSDR (treg-specific demethylated region) pomocí kvantitativní real-time PCR (demethylace v této oblasti je asociována se stabilní expresí genu FoxP3 a je charakteristická pro přirozené regulační T lymfocyty)

Naší hypotézou bylo:

Při progresi ovariálního karcinomu dochází k dynamické změně imunitní reakce od aktivní protinádorové reakce k pasivní pronádorové reakci přítomné v pokročilém stádiu onemocnění v důsledku imunosupresivního mikroprostředí nádoru.

Regulační T lymfocyty se významně podílí na imunosupresivním mikroprostředí nádoru.

Regulační T lymfocyty nejsou indukovány v nádoru z naivních T lymfocytů, ale pochází z periferní krve (přirozené regulační T lymfocyty).

4 Materiál a metodika

Materiál a metodika této disertační práce je podrobně popsána v původních publikacích s impakt faktorem. Tyto publikace jsou uvedeny v plnotextové formě v kapitole 5.

5 Výsledky a diskuze

Výsledky této práce byly shrnuty do tří původních publikací. V následujícím oddílu jsou tyto publikace uvedené ve formě, ve které byly otištěny v recenzovaném zahraničním tisku s impakt faktorem a jedna práce ve zkrácené české verzi v Chirurgických rozhledech. Komentář předcházející každé publikaci shrnuje a diskutuje zásadní výsledky práce a hodnotí jejich význam. Další přiložená publikace je přehledovým článkem o problematice protinádorové imunologie.

5.1 Význam imunitního infiltrátu u kolorektálního karcinomu a jeho korelace s K-ras mutacemi a prognózou onemocnění

Prognóza kolorektálního karcinomu v současné době vychází z AJCC/UICC klasifikace (TNM klasifikace), která stratifikuje nemocné do jednotlivých klinických stádií a je zároveň určujícím kritériem pro indikaci adjuvantní onkologické léčby. Nevýhodou TNM klasifikace je skutečnost, že nepřináší žádné informace o biologickém chování nádoru a proto prognóza pacienta stejného klinického stádia se může do značné míry lišit. Aktuálním tématem je hledání nových prognostických a prediktivních biomarkerů, které povedou k selekci rizikových pacientů napříč klinickými stádii a racionalizaci adjuvantní onkologické léčby. V současné době jediným rutinně používaným biomarkerem je stav mutace v onkogenu K-ras. Mutace v onkogenu K-ras se u kolorektálního karcinomu vyvíjí v časně fázi tumorigeneze, během progresu z adenomu na karcinom, a její prevalence se u zmíněné malignity pohybuje mezi 30 – 50%. Stanovení mutace v onkogenu K-ras je jednoznačným negativním prediktivním markerem pro použití cílené terapie pomocí inhibitorů EGFR, tj. cetuximabem či panitumumabem (prediktivní biomarker), naopak prognostický význam této mutace zůstává stále kontroverzní. Vedle vyšetření molekulárních biomarkerů je jednou z možností analýza imunitních infiltrátů, které hrají důležitou roli v kontrole lokálního růstu nádoru, způsobu a rozsahu jeho lokální invaze a metastazování. Cílem této práce bylo stanovení mutace v onkogenu K-ras a analýza imunitních buněk infiltrujících nádorovou tkáň u pacientů s kolorektálním karcinomem ve vztahu k relapsu onemocnění. Do retrospektivní studie bylo zařazeno 44 pacientů s kolorektálním karcinomem, kteří podstoupili radikální chirurgický výkon v období 2004–2009.

Primárně byli vybráni pacienti s recidivou onemocnění (n=16) a soubor byl doplněn o pacienty ze stejného období bez recidivy. V parafinových řezech karcinomu byly stanoveny mutace v onkogenu K-ras a provedena imunofluorescenční analýza imunitních buněk infiltrujících nádorovou tkáň (CD3, CD8, FoxP3, CD1a, DC-LAMP). Všichni pacienti podstoupili radikální chirurgický výkon (R0 resekce). Mutace v onkogenu K-ras byla prokázána u 45,5 % (n=20) karcinomů: 65 % v kodonu 12 a 35 % v kodonu 13. Přestože mutace v onkogenu K-ras v kodonu 13 byla asociována s relapsem onemocnění, vyskytovala se i ve skupině pacientů v remisi. Zásadní rozdíly byly ale prokázány mezi oběma skupinami pacientů ve složení imunitních infiltrátů. Ve skupině pacientů s relapsem onemocnění byl prokázán trend ke klesajícímu množství tumor-infiltrujících lymfocytů a pouze malé množství zralých dendritických buněk (DC-LAMP+) a naopak velké množství nezralých dendritických buněk (CD1a+) v porovnání se skupinou pacientů v remisi. Pacienti s mutantní formou kodonu 13, nízkou denzitou TILs a vysokým poměrem CD1a+/DC-LAMP+ buněk v nádorové tkáni mají vysoké riziko rekurence onemocnění. Vzhledem ke skutečnosti, že tyto pacienti jsou rezistentní na léčbu inhibitory EGFR, a tudíž vystaveni vyššímu riziku úmrtí na nádorové onemocnění, měli by být po radikálním chirurgickém výkonu indikováni k adjuvantní onkologické léčbě a pečlivému follow-up.



Tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells in human colorectal cancer: Their relationship to KRAS mutational status and disease recurrence

Petr Kocián^{a,b}, Monika Šedivcová^c, Jan Drgáč^d, Kateřina Černá^c, Jiří Hoch^b, Roman Kodet^d, Jiřina Bartůňková^a, Radek Špišek^a, Anna Fialová^{a,*}

^a Department of Immunology, 2nd Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Motol, V Úvalu 84, 15006 Prague 5, Czech Republic

^b Department of Surgery, 2nd Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Motol, V Úvalu 84, 15006 Prague 5, Czech Republic

^c Department of Pathology, Medical School and University Hospital, Charles University, 304 60 Pilsen, Czech Republic

^d Department of Pathology and Molecular Medicine, 2nd Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Motol, V Úvalu 84, 15006 Prague 5, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 March 2011

Accepted 25 July 2011

Available online 16 August 2011

Keywords:

Colorectal cancer

KRAS

Tumor-infiltrating lymphocytes

ABSTRACT

The prognosis of newly diagnosed colorectal cancer patients relies mostly on tumor-node metastasis classification. However, analyses of tumor-infiltrating lymphocytes and several molecular markers have also shown promising prognostic value. Mutations in the proto-oncogene *KRAS*, which occur early in colorectal carcinogenesis, have been demonstrated to be common in human colorectal cancer (CRC); however, their prognostic significance remains controversial. We examined the correlations between *KRAS* mutational status and tumor-infiltrating immune cells with respect to CRC recurrence. Mutations in *KRAS* were identified in 45.5% of the primary carcinomas in our cohort of patients: 65% in codon 12 and 35% in codon 13. Although codon 13 *KRAS* mutations were associated with disease relapse, they were present in both disease-free and relapsed patients. However, disease-free and relapsed patients differed markedly in their patterns of tumor-infiltrating immune cells. There was a trend toward decreased density of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) within the group of relapsed cases. In addition, relapsed patients with codon 13 mutations had markedly lower levels of tumor-infiltrating mature DC-LAMP⁺ dendritic cells (DCs) and higher frequency of CD1a⁺ cells compared with disease-free patients. Our data suggest that CRC patients with low levels of TILs, a high CD1a⁺/DC-LAMP⁺ tumor-infiltrating DC ratio, and a *KRAS* mutation in codon 13 are at a high risk of disease recurrence.

© 2011 American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Colorectal cancer (CRC) is one of the 3 most common malignant neoplasms worldwide, with an incidence of 1.2 million cases per year. The estimates for CRC-related deaths are more than 600,000 annually [1]. Despite the recent progress in diagnosis and treatment, the prognosis of advanced CRC remains poor, often with palliative therapy as the only option. Because the prognostic value of the standard tumor-node metastasis (TNM) staging system has been recently challenged in many ways, superior prognostic markers are needed to more precisely define prognosis and better predict the benefits of adjuvant treatment in colorectal cancer [2].

Cancer development is a multistep process that involves chromosomal abnormalities and mutations, as well as epigenetic modifications of genes that regulate cell proliferation, differentiation, and apoptosis [3,4]. One of the best known CRC-associated proto-oncogenes is *KRAS*, which encodes a small, 21-kDa GTP/GDP-binding protein involved in the regulation of the cellular response to a

wide range of extracellular stimuli [4,5]. Specific *KRAS* mutations lead to the constitutive activation of multiple signaling pathways, including 1 downstream of the epidermal growth factor receptor (EGFR), thus driving the growth and progression of CRC and providing an escape mechanism that allows the tumor cells to overcome the pharmacologic inhibition induced by anti-EGFR molecules [4,6]. Activating mutations in *KRAS* have been observed in 30 to 50% of CRCs [7–9], and up to 90% of these mutations have been reported in codons 12 and 13 [10]. Although a wide range of studies and meta-analyses concerning the prognostic significance of *KRAS* mutations have been published, the results remain controversial, with only some of them indicating an impact of mutant *KRAS* on clinical outcome [4,11].

In addition to genetic mutations and TNM staging, a quantitative assessment of the immune cells that infiltrate the tumor tissue and peritumoral areas has been proposed as an independent outcome predictor. Indeed, it has been convincingly demonstrated that high densities of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) are associated with improved recurrence-free and/or overall survival [12–16].

Immune surveillance is believed to play a crucial role in cancer development and progression. The correlation between the pres-

* Corresponding author.

E-mail address: anna.fialova@lfmotol.cuni.cz (A. Fialová).

ence of TILs in tumor tissue and improvements in survival supports this concept. Nevertheless, multivariate analyses concerning the densities of tumor-infiltrating immune cells and clinicopathologic data have mostly not included any differences in the molecular phenotype of the patients. In fact, the association between the densities of tumor-infiltrating immune cells and KRAS mutation status has not yet been evaluated. To extend the knowledge about suggested prognostic factors, we examined the correlations between the KRAS mutational status, patterns of tumor-infiltrating immune cells, and the presence of tumor recurrence in a cohort of newly diagnosed CRC patients.

2. Subjects and methods

2.1. Patients and tissue samples

Formalin-fixed paraffin-embedded specimens were obtained from 44 patients with surgically resected colorectal cancer treated between 2004 and 2009 at the University Hospital Motol in Prague, Czech Republic. None of the patients had received neoadjuvant radiotherapy or chemotherapy. The histopathologic stages of the tumors were determined according to the TNM classification system of the Union for International Cancer Control and the American Joint Committee on Cancer. The pathology of each tumor sample was reevaluated by an experienced pathologist. No patient was lost to follow-up. The median duration of follow-up was 55 months for disease-free patients and 20 months for relapsed patients. The collection of all tissue specimens was approved by the Institutional Review Board of the University Hospital Motol. The clinicopathologic characteristics of the patients are summarized in Table 1.

2.2. Detection of KRAS gene mutations

Formalin-fixed paraffin-embedded tumor tissue sections were deparaffinized and genomic DNA was extracted using a NucleoSpin tissue kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) ac-

ording to the manufacturer's instructions. To detect the mutational status of the KRAS gene, polymerase chain reaction (PCR) amplification of exon 1 was performed using the following primers: sense, 5'-tcattattttattataaggcctgctg-3'; and antisense, 5'-agaatggctcgcaccagtaa-3'. Amplified PCR products were purified by Montage PCR filter units (Millipore, Billerica, MA) and sequenced using a Big Dye Terminator sequencing kit (PE/Applied Biosystems, Foster City, CA) on an automated sequencer ABI Prism 3130xl (PE/Applied Biosystems). The sensitivity of this method is only 10% of mutated cells; therefore, negative samples were subsequently retested using the highly sensitive (1% of mutated alleles) PGX-KRAS-BRAF StripAssay (ViennaLab, Vienna, Austria) according to the manufacturer's instructions. Briefly, biotinylated multiplex PCR amplification products were hybridized to nitrocellulose test strips and bound sequences were visualized using a streptavidin-alkaline phosphatase conjugate and color substrate.

2.3. Immunofluorescence

For immunostaining, 4- μ m-thick sections were cut, deparaffinized using xylene, and subjected to heat antigen retrieval using Tris/EDTA buffer, pH 9 (Dako, Glostrup, Denmark), in a water bath for 35 minutes at 98°C. To reduce the nonspecific background signal, the sections were subsequently treated with Image-iT FX signal enhancer (Invitrogen, Carlsbad, CA) and stained with primary monoclonal antibodies against CD3 (F7.2.38, Dako), CD8 (C8/144B, Dako), FoxP3 (236 A/E7, Abcam, Cambridge, UK), CD1a (CD1a007, Abcam), DC-LAMP (1010E1.01, Dendritics, Lyon, France), cytokeratin (MNF116, Dako, or rabbit polyclonal, Abcam), and Ki-67 (SP6, Abcam) overnight at 4°C. Incubation with Alexa Fluor 488-labeled goat antimouse, Alexa Fluor 488-labeled goat antirat (both from Invitrogen), and DyLight 594-labeled goat anti-rabbit (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK) secondary antibodies was performed for 45 minutes at room temperature. Stained slides were mounted using ProLong Gold antifade reagent with 4'-diamidino-2-phenylindole (Invitrogen).

2.4. Quantification of tumor-infiltrating immune cells

Each tumor section was evaluated for lymphocyte or dendritic cell (DC) infiltration in the tumor epithelium and tumor stroma in 10 representative visual fields selected for the most abundant immune cell distribution under a fluorescent microscope (Olympus FV300; Olympus, Hamburg, Germany) at 400 \times magnification. The proportion of Ki67⁺ tumor cell nuclei was evaluated in 5 representative fields at 600 \times magnification, and only epithelial cells were included in the analysis. The count was performed by a single investigator (PK) without knowledge of the clinical outcome or the KRAS mutational status of the patients. Images were obtained using an Olympus FV300 microscope and a DP50 digital camera (Olympus). Representative images for each marker used are shown in Fig. 1.

2.5. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Statistica 7.1 software (StatSoft, Tulsa, OK). Correlations between tumor-infiltrating immune cells were evaluated using a correlation matrix. Differences between KRAS mutants and wild-type patients with respect to tumor recurrence were estimated using Pearson's χ^2 test. Differences between relapsed and disease-free patients were analyzed using the Mann-Whitney *U* test. The remaining data were analyzed using analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's HSD test. Additionally, multivariate analysis with Cox regression was performed to assess the prognostic value of tumor-infiltrating immune cells, KRAS mutational status, and stage of the disease for disease-free survival. The results were considered a trend when $p < 0.1$ and statistically significant when $p < 0.05$.

Table 1
Clinicopathological features of patients with colorectal cancer included in the study

Clinicopathological feature	n	%
Gender		
Female	19	43.2
Male	25	56.8
Tumor location		
Right side of colon	14	31.8
Left side of colon	8	18.2
Sigmoid colon	22	50
pT stage		
pT1	0	0
pT2	4	9.1
pT3	34	77.3
pT4	6	13.7
pN stage		
pN0	20	45.5
pN1	15	34
pN2	6	13.7
NX	3	6.8
Distant metastases (M)		
None detected	42	95.5
Present	2	4.5
Tumor grade		
1	7	15.9
2	28	63.6
3	9	20.5
KRAS mutation		
Wt	24	54.5
Codon 12	13	29.5
Codon 13	7	16
Relapse		
Yes	16	36.4
No	28	63.6

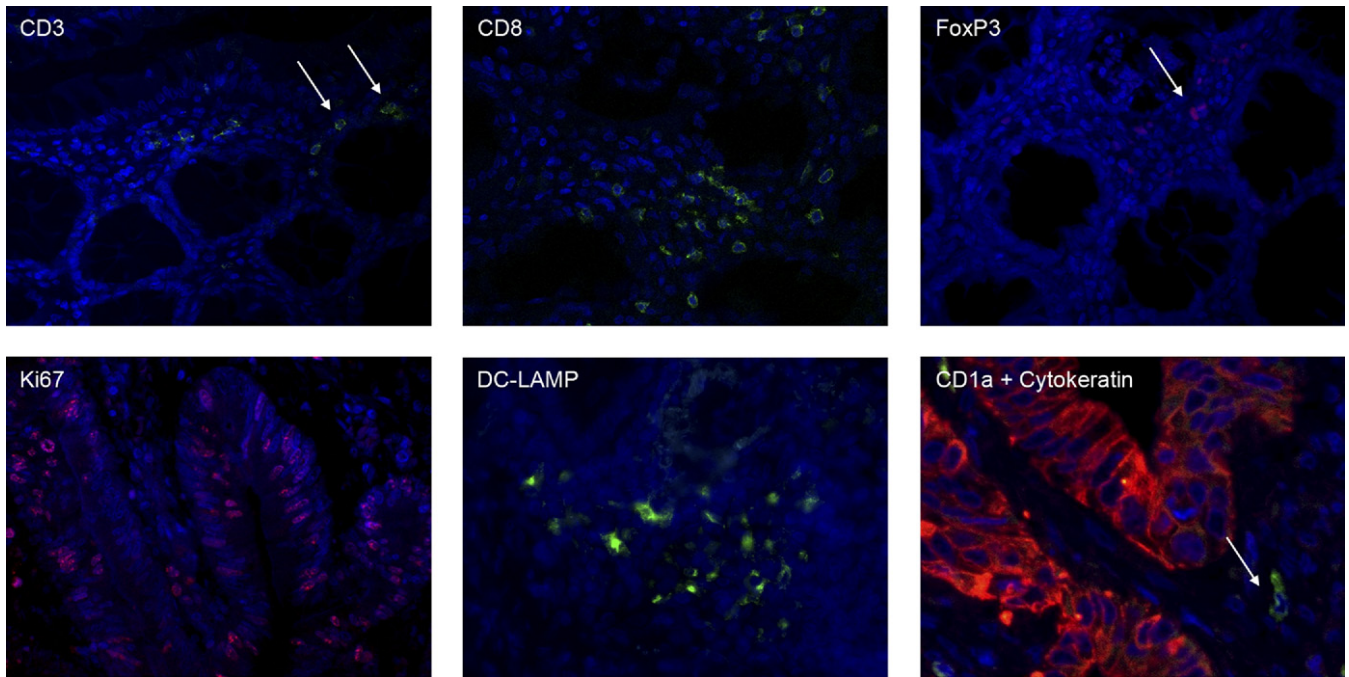


Fig. 1. Immunofluorescent staining of tumor-infiltrating lymphocytes expressing CD3, CD8, or FoxP3 (upper row) and epithelial cells with nuclear expression of Ki67 and dendritic cells expressing DC-LAMP and CD1a (lower row). Magnification 400 \times .

3. Results

3.1. Intratumoral distribution of TILs and DCs

Tumor-infiltrating lymphocytes stained with CD3, CD8, or FoxP3 were identified in all of the primary colorectal tumor samples analyzed in this study. Similarly, DC-LAMP-expressing mature DCs were present in 43 (97.7%) tumor samples, whereas CD1a-

positive DCs were identified in 42 (95.5%) samples. Representative images of immune cell infiltration are presented in Fig. 1. Markedly higher infiltrations of immune cells were observed in the tumor stroma than in the tumor epithelium (Fig. 2).

The number of FoxP3-expressing cells in the epithelium was positively correlated with the proportion of Ki-67⁺ tumor cells (correlation coefficient 0.35; $p = 0.04$) and the number of CD8⁺

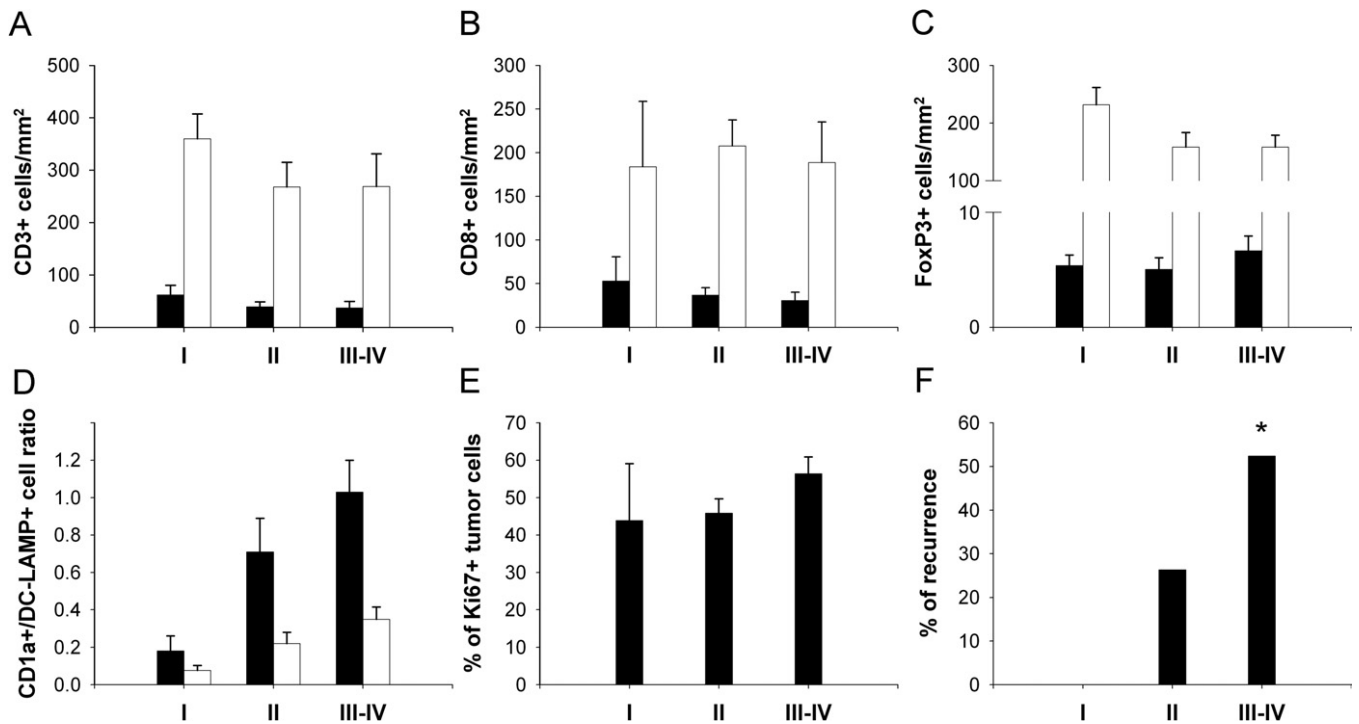


Fig. 2. Immune cell populations within primary colorectal tumors according to disease stage. (A–D) Black columns represent immune cells infiltrating the tumor epithelium; white columns represent immune cells infiltrating the tumor stroma. (A–C) Data are expressed as the mean number of infiltrating lymphocytes per 1 mm² of tumor tissue + SEM (D) Data are expressed as ratios of CD1a⁺/DC-LAMP⁺ dendritic cells + SEM (E) Columns represent the proportion of Ki67⁺ tumor cell nuclei + SEM (F) Columns represent the proportion of patients who experienced local recurrence. * $p < 0.05$ (Pearson χ^2 test).

cells was negatively correlated with the number of CD1a⁺ DCs in the tumor stroma (correlation coefficient -0.34 ; $p = 0.046$). We did not observe any significant association between the number of tumor-infiltrating immune cells and the tumor stage; however, our data suggest that the CD1a⁺/DC-LAMP⁺ cell ratio increases during disease progression (Fig. 2).

3.2. Tumor-infiltrating immune cells and tumor cell proliferation status with respect to KRAS mutations

In our cohort, KRAS mutations were identified in 45.5% ($n = 20$) of patients: 65% of mutations were reported in codon 12 and 35% were observed in codon 13. The most frequent mutation in codon 12 resulted in the replacement of a glycine with valine (46.1%). The other mutations resulted in the replacement of a glycine with aspartate (30.8%) or cysteine (23.1%). The most frequent mutation in codon 13 resulted in the replacement of a glycine with aspartate (85.7%); 1 patient (14.3%) had a glycine replaced with cysteine. We observed no significant association between the number of tumor-infiltrating immune cells and the KRAS mutational status; however, we observed that patients with mutations in codon 13 of the KRAS gene had a significantly higher proportion of Ki-67⁺ tumor cells than did wild-type (Wt) patients and patients with mutations in codon 12 (Fig. 3A). Moreover, we demonstrated that 57% of patients with mutations in codon 13 experienced disease relapse compared with only 33.3 and 30.1% of Wt patients and patients with mutations in codon 12, respectively (Fig. 3B).

3.3. Differences in the characteristics of the immune cell infiltrate between patients with mutations in codon 13 of the KRAS gene with and without disease recurrence

Despite being more abundant in patients with disease recurrence, mutations in codon 13 of the KRAS gene were present in both

disease-free and relapsed patients in our cohort. Therefore, we evaluated the characteristics of tumor-infiltrating immune cells in patients with a KRAS mutation in codon 13 with respect to tumor recurrence. We identified a trend toward disease recurrence in patients with low numbers of TILs in both the tumor epithelium and the stroma. Moreover, patients with tumor recurrence had more CD1a⁺ DCs and significantly fewer DC-LAMP⁺ DCs in the tumor stroma (Fig. 4). Consequently, we observed a trend toward a higher CD1a⁺/DC-LAMP⁺ cell ratio within the tumor epithelium and a significantly higher CD1a⁺/DC-LAMP⁺ cell ratio within the tumor stroma in relapsed patients with KRAS mutations in codon 13. Similar differences between disease-free and relapsed patients were observed in the entire cohort regardless of the KRAS mutational status (Fig. 5). However, multivariate analysis revealed that only the CD1a/DC-LAMP ratio in the tumor epithelium, proportion of Ki-67⁺ tumor cells, and number of intraepithelial CD8⁺ cells were independent prognostic factors of recurrence.

4. Discussion

Carcinogenesis is caused by both external and internal factors, and most types of tumors require the concurrence of multiple steps. However, despite extensive research, the mechanisms that control cancer progression and recurrence have not been fully characterized. Consequently, there is a strong need to establish reliable prognostic markers for each type of cancer to properly address postsurgical patient follow-up and identify patients who would benefit from adjuvant therapy.

One of the recently discussed possible prognostic factors in CRC patients is the mutational status of the KRAS gene. It has been reported that KRAS mutations occur early in colorectal carcinogenesis, often before the development of polyps [3,17,18]. The percentage of CRC patients with mutations in KRAS varies from 30 to 50%, most likely depending on the different techniques used for detection [7–9]. In our cohort of patients, we identified KRAS mutations in 45.5% of tumors, including 65% in codon 12 and 35% in codon 13, which agrees with previous studies [9,10]. Missense mutations at these positions that result in the replacement of glycine with a different amino acid lead to decreased GTPase activity in RAS. Because GTP-bound RAS is involved in a wide range of cellular processes by regulating the activation of at least 10 downstream effector pathways, these mutations markedly affect the proliferation, differentiation, and survival of tumor cells [11].

Analyses focused on the prognostic significance of KRAS mutations in CRC patients have reported conflicting results. Whereas some studies have reported a correlation between a reduced survival rate and the presence of KRAS mutations [19–27], other studies have not confirmed this association [28–32]. Several reports have indicated that only specific KRAS mutations may have a strong predictive value. Indeed, KRAS mutations in codon 12 have been observed to be associated with the mucinous histotype [9,19], whereas codon 13 mutations have been demonstrated to correlate with a high S-phase fraction [9] and reduced patient survival rate [9,26]. Similarly, we observed that tumors with a mutation in codon 13 had a significantly higher proliferation rate and exhibited a higher risk of disease recurrence than Wt tumors and tumors with a codon 12 mutation. Because the percentage of Ki67⁺ tumor cells was an independent prognostic factor according to the multivariate analysis, we suggest that tumor proliferation rate, which reflects tumor aggressivity, may be the proximate cause of higher risk of disease recurrence in CRC patients with KRAS mutations in codon 13.

In addition, we observed marked variability in the pattern of tumor-infiltrating immune cells within the group of patients with codon 13 mutations, regardless of the mutation type. Patients who experienced tumor recurrence had fewer lymphocytes in both the tumor epithelium and the stroma. Additionally, relapsed patients

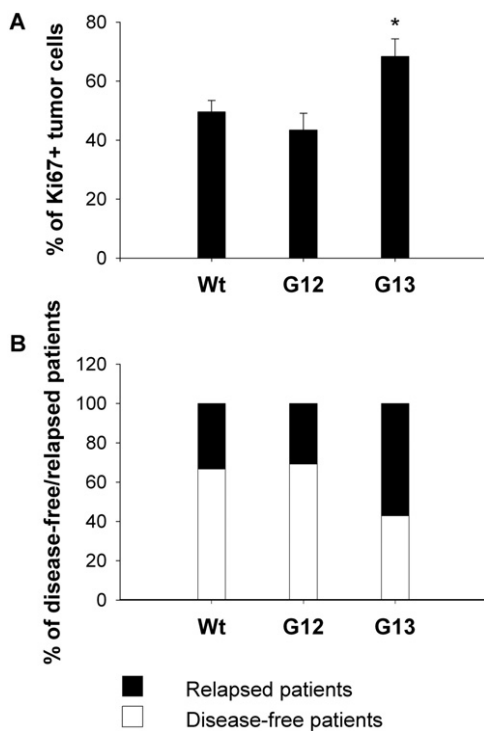


Fig. 3. Proportions of Ki67⁺ tumor cells and disease-free versus relapsed patients according to KRAS mutational status. Wild-type (Wt) patients, $n = 24$; patients with mutation in codon 12 (G12), $n = 13$; patients with a mutation in codon 13 (G13), $n = 7$. (A) Columns represent the mean percentage of Ki67⁺ tumor cells + SEM (B) Columns represent the proportion of disease-free (white columns) or relapsed (black columns) patients classified according to KRAS mutational status. * $p < 0.05$ (analysis of variance followed by Tukey's HSD test).

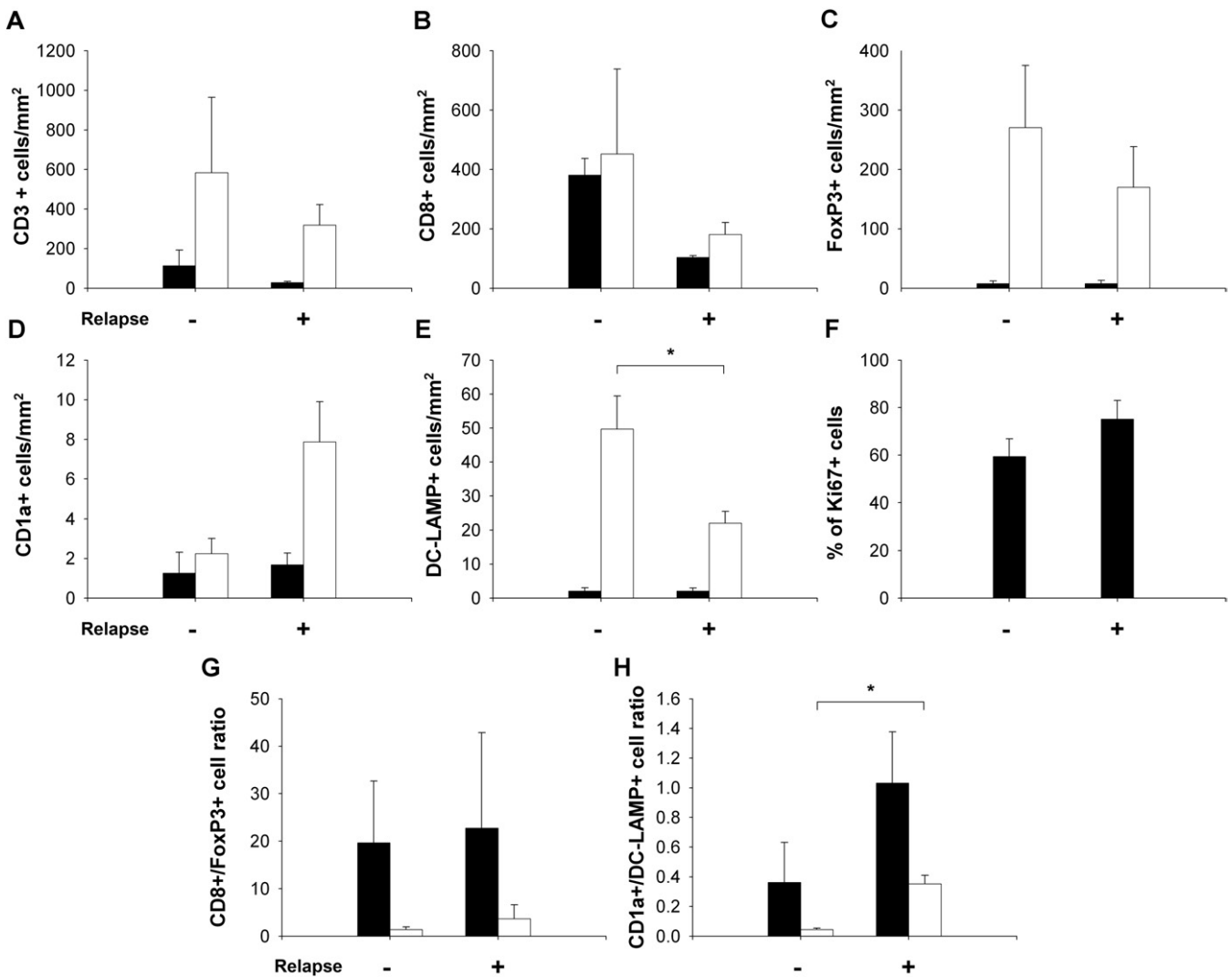


Fig. 4. Differences between patients with a codon 13 mutation of the *KRAS* gene with (relapse +) and without (relapse -) recurrence. (A–E, G, H) Black columns represent immune cells infiltrating the tumor epithelium; white columns represent immune cells infiltrating the tumor stroma. (A–E) Data are expressed as the mean number of infiltrating immune cells per 1 mm² of the tumor tissue + SEM (G, H) Data are expressed as ratios of CD8⁺/FoxP3⁺ lymphocytes or CD1a⁺/DC-LAMP⁺ dendritic cells + SEM (F) Columns represent the proportion of Ki67⁺ tumor cell nuclei + SEM. **p* < 0.05 (Mann–Whitney *U* test).

had a significantly higher CD1a⁺/DC-LAMP⁺ cell ratio than disease-free patients. These data are in accordance with the theory that immune surveillance plays an essential role in cancer development and progression [33]. Indeed, it has been convincingly demonstrated that high densities of TILs predict a favorable outcome in CRC patients [12–16]. Galon et al. reported that CRC patients with an increased expression of T helper 1 adaptive immunity-associated genes in the tumor tissue had the best prognosis. Moreover, the presence of such an immune response seemed to be an even stronger independent predictor than TNM classification [15]. The prognostic impact of DC subtypes in CRC is much less clear. Dadabayev et al. [34] demonstrated that higher densities of MHC class II-expressing cells in the tumor stroma were associated with shorter survival. Conversely, the presence of MHC class II⁺ cells in the tumor epithelium was correlated with improved survival. Nagorsen et al. [35] observed a better survival rate in cases with both high stromal and high epithelial DC infiltration.

In our study, the phenotype of the tumor-infiltrating DCs seemed to be crucial. Patients with disease recurrence had higher densities of CD1a⁺ cells and significantly lower densities of mature DC-LAMP⁺ DCs in the tumor stroma (Fig. 5). This effect was even more pronounced in the group of patients with *KRAS* mutation in

codon 13 (Fig. 4). Thus, the activation status of DCs in relapsed patients seems to be skewed toward immature DCs. Suzuki et al. suggested that part of CD1a⁺ tumor-infiltrating DCs migrated to cancer stroma, lost CD1a expression during maturation, and recruited T cells to form DC–lymphocyte clusters where T-cell activation occurred [36]. Similarly, we also observed aggregates of DC-LAMP⁺ DCs in the tumor stroma of CRC patients, as illustrated in Fig. 1. On the contrary to DC-LAMP⁺ DCs, CD1a⁺ cells were observed throughout the tumor tissue without forming any clusters.

We suggest that our data might elucidate the discrepancies in the analyses focused on the prognostic significance of *KRAS* mutations. Indeed, disease-free (>50 months) and relapsed patients (confirmed relapse <50 months from the date of surgery) with codon 13 mutations in our cohort were markedly different in terms of their levels of tumor-infiltrating immune cells. Thus, CRC patients with low levels of TILs, a high CD1a⁺/DC-LAMP⁺ tumor-infiltrating DC ratio, and *KRAS* mutations in codon 13 might be at high risk of disease recurrence. Moreover, because these patients cannot benefit from anti-EGFR therapy, they might also be at high risk of cancer-related death. Because the quantification of immune responses within the tumors indicated a strong predictive role in

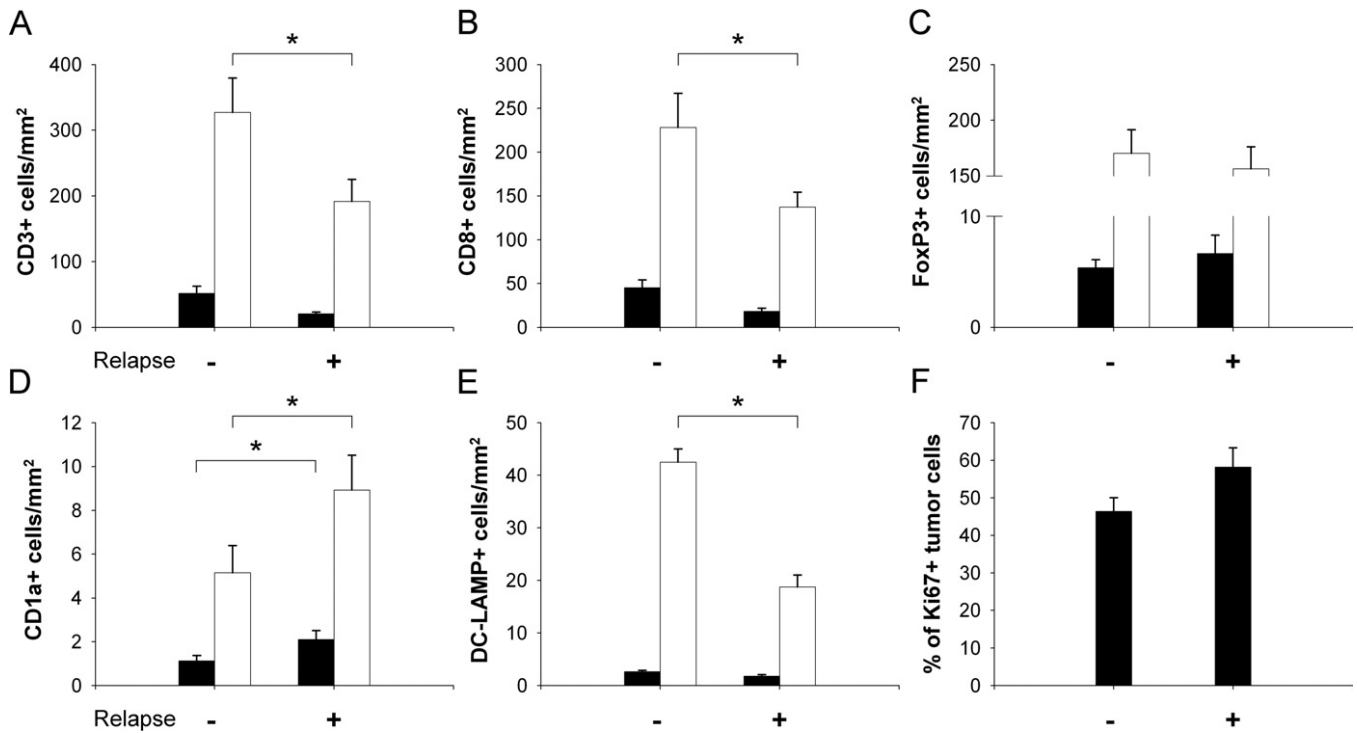


Fig. 5. Differences between patients with (relapse +) and without (relapse -) recurrence. (A–E) Black columns represent immune cells infiltrating the tumor epithelium; white columns represent immune cells infiltrating the tumor stroma. Data are expressed as the mean number of infiltrating immune cells per 1 mm² of the tumor tissue + SEM. (F) Columns represent the proportion of Ki67⁺ tumor cell nuclei + SEM. **p* < 0.05 (Mann–Whitney *U* test and Pearson χ^2 test, respectively).

CRC patients, the combined characterization of genetic features and immune cells might provide the foundation to identify the group of high-risk patients who would potentially benefit from adjuvant chemotherapy and careful follow-up.

Acknowledgments

We thank Vit Budinský for technical help with fluorescence microscopy. This project was supported by Research Grant MSM 0021620812 from the Czech Ministry of Education and GAUK 9939/2009 from Charles University.

References

[1] American Cancer Society: Global Cancer Facts & Figures. 2nd ed. Atlanta: American Cancer Society; 2011.
 [2] Laghi L, Bianchi P, Miranda E, Balladore E, Pacetti V, Grizzi F, et al. CD3⁺ cells at the invasive margin of deeply invading (pT3–T4) colorectal cancer and risk of post-surgical metastasis: a longitudinal study. *Lancet Oncol* 2009; 10:877–84.
 [3] Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988; 319:525–32.
 [4] Rizzo S, Bronte G, Fanale D, Corsini L, Silvestris N, Santini D, et al. Prognostic vs predictive molecular biomarkers in colorectal cancer: is KRAS and BRAF wild type status required for anti-EGFR therapy? *Cancer Treat Rev* 2010;36;suppl 3:S56–61.
 [5] Schubbert S, Shannon K, Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer* 2007;7:295–308.
 [6] Siena S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Balfour J, Bardelli A. Biomarkers predicting clinical outcome of epidermal growth factor receptor-targeted therapy in metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101:1308–24.
 [7] Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, Verlaan-de Vries M, van Boom JH, van der Eb AJ, et al. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 1987;327:293–7.
 [8] Boughdady IS, Kinsella AR, Haboubi NY, Schofield PF. K-ras gene mutations in adenomas and carcinomas of the colon. *Surg Oncol* 1992;1:275–82.
 [9] Bazan V, Migliavacca M, Zanna I, Tubiolo C, Grassi N, Latteri MA, et al. Specific codon 13 K-ras mutations are predictive of clinical outcome in colorectal cancer patients, whereas codon 12 K-ras mutations are associated with mucinous histotype. *Ann Oncol* 2002;13:1438–46.
 [10] Benvenuti S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Zanon C, Moroni M, Veronese S, et al. Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs

the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. *Cancer Res* 2007;67:2643–8.
 [11] Vakiani E, Solit DB. KRAS and BRAF: drug targets and predictive biomarkers. *J Pathol* 2011;223:219–29.
 [12] Ropponen KM, Eskelinen MJ, Lipponen PK, Alhava E, Kosma VM. Prognostic value of tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) in colorectal cancer. *J Pathol* 1997;182:318–24.
 [13] Naito Y, Saito K, Shiiba K, Ohuchi A, Saigenji K, Nagura H, et al. CD8⁺ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;58:3491–4.
 [14] Chiba T, Ohtani H, Mizoi T, Naito Y, Sato E, Nagura H, et al. Intraepithelial CD8⁺ T-cell-count becomes a prognostic factor after a longer follow-up period in human colorectal carcinoma: possible association with suppression of micro-metastasis. *Br J Cancer* 2004;91: 1711–17.
 [15] Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006;313:1960–4.
 [16] Ohtani H. Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human colorectal cancer. *Cancer Immun* 2007;7:4.
 [17] Forrester K, Almoguera C, Han K, Grizzle WE, Perucho M. Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis. *Nature* 1987;327:298–303.
 [18] Pretlow TP, Brasitus TA, Fulton NC, Cheyer C, Kaplan EL. K-ras mutations in putative preneoplastic lesions in human colon. *J Natl Cancer Inst* 1993;85: 2004–7.
 [19] Laurent-Puig P, Olschwang S, Delattre O, Remvikos Y, Asselain B, Melot T, et al. Survival and acquired genetic alterations in colorectal cancer. *Gastroenterology* 1992;102:1136–41.
 [20] Bell SM, Scott N, Cross D, Sagar P, Lewis FA, Blair GE, et al. Prognostic value of p53 overexpression and c-Ki-ras gene mutations in colorectal cancer. *Gastroenterology* 1993;104:57–64.
 [21] Lee JC, Wang ST, Lai MD, Lin YJ, Yang HB. K-ras gene mutation is a useful predictor of the survival of early stage colorectal cancers. *Anticancer Res* 1996;16:3839–44.
 [22] Span M, Moerkerk PTM, De Goeij AFPM, Arends JW. A detailed analysis of K-ras point mutations in relation to tumor progression and survival in colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 1996;69:241–45.
 [23] Ahnen DJ, Feigl P, Quan G, Fenoglio-Preiser C, Lovato LC, Bunn PA Jr, et al. Ki-ras mutations and p53 overexpression predict the clinical behavior of colorectal cancer: a Southwest Oncology Group study. *Cancer Res* 1998;58: 1149–58.
 [24] Bouzourene H, Gervaz P, Cerottini JP, Benhattar J, Chaubert P, Saraga E, et al. p53 and ki-ras as prognostic factors for Dukes' stage B colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2000;36:1008–15.

- [25] Pajkos G, Kiss I, Sándor J, Ember I, Kisházi P. The prognostic value of the presence of mutations at the codons 12, 13, 61 of K-ras oncogene in colorectal cancer. *Anticancer Res* 2000;20:1695–701.
- [26] Samowitz WS, Curtin K, Schaffer D, Robertson M, Leppert M, Slattery ML. Relationship of Ki-ras mutations in colon cancers to tumor location, stage, and survival: a population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:1193–7.
- [27] Andreyev HJN, Norman AR, Cunningham D, Oates J, Dix BR, Iacopetta BJ, et al. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer. The “RASCAL II” study. *Br J Cancer* 2001;85:692–96.
- [28] Dix BR, Robbins P, Soong R, Jenner D, House AK, Iacopetta BJ. The common molecular genetic alterations in Dukes’ B and C colorectal carcinomas are not short-term prognostic indicators of survival. *Int J Cancer* 1994;59:747–51.
- [29] Andersen SN, Løvig T, Breivik J, Lund E, Gaudernack G, Meling GI, et al. K-ras mutations and prognosis in large-bowel carcinomas. *Scand J Gastroenterol* 1997;32:62–9.
- [30] Tortola S, Marcuello E, González I, Reyes G, Arribas R, Aiza G, et al. p53 and K-ras gene mutations correlate with tumor aggressiveness but are not of routine prognostic value in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1999;17:1375–81.
- [31] Hirvikoski P, Auvinen A, Servomaa K, Kiuru A, Rytömaa T, Makkonen K, et al. K-ras and p53 mutations and overexpressions as prognostic factors in female rectal carcinoma. *Anticancer Res* 1999;19:685–91.
- [32] Esteller M, Gonzalez S, Risques RA, Marcuello E, Mangues R, Germà JR. K-ras and p16 aberrations confer poor prognosis in human colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2001;19:299–304.
- [33] Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002;3:991–8.
- [34] Dadabayev AR, Sandel MH, Menon AG, Morreau H, Melief CJ, Offringa R, et al. Dendritic cells in colorectal cancer correlate with other tumor-infiltrating immune cells. *Cancer Immunol Immunother* 2004;53:978–86.
- [35] Nagorsen D, Voigt S, Berg E, Stein H, Thiel E, Loddenkemper C. Tumor-infiltrating macrophages and dendritic cells in human colorectal cancer: relation to local regulatory T cells, systemic T-cell response against tumor-associated antigens and survival. *J Transl Med* 2007;5:62.
- [36] Suzuki A, Masuda A, Nagata H, Kameoka S, Kikawada Y, Yamakawa M, et al. Mature dendritic cells make clusters with T cells in the invasive margin of colorectal carcinoma. *J Pathol* 2002;196:37–43.

5.2 Dynamika imunitního infiltrátu v průběhu progresu ovariálního karcinomu. Postupná změna imunitní reakce od efektorových Th17 lymfocytů k regulačním T lymfocytům

Ovariální karcinom patří mezi gynekologické zhoubné nádory s nejvyšší mortalitou. Úvodní terapie ovariálního karcinomu spočívající v primární cytoredukční operaci v kombinaci s adjuvantní chemoterapií dosahuje klinické remise v 80% případů. Přesto zhruba u dvou třetin pacientek dochází v časovém intervalu 2 – 5 let v důsledku rozvoje chemorezistence reziduálních nádorových buněk k relapsu onemocnění a úmrtí. Studium imunitních infiltrátů u pacientek s ovariálním karcinomem prokazuje, že zastoupení různých subpopulací imunokompetentních buněk v nádoru hraje důležitou roli v kontrole růstu nádoru a predikuje další klinický osud pacientek. Dosavadní práce se zaměřují zejména na analýzu imunitních infiltrátů z hlediska stavby, lokalizace a jejich množství v nádoru, ale málo je známo o dynamice imunitní reakce v mikroprostředí nádoru v závislosti na progresi nádorového onemocnění. Cílem této práce bylo sledování dynamiky imunitního infiltrátu v závislosti na stádiu ovariálního karcinomu. V časném stádiu ovariálního karcinomu byly imunitní infiltráty tvořeny zejména Th17 lymfocyty. Ve stádiu II převládala imunitní odpověď Th1 typu. U diseminovaného onemocnění (stádium III a IV) byla nádorová tkáň ovariálního karcinomu infiltrována zejména aktivovanými Treg (Helios +) spolu s vysokým počtem monocytů/makrofágů a mDC. Intratumorózní Treg byly charakterizovány výrazně nízkou expresí chemokinového receptoru CCR4 v porovnání s Treg izolovanými z periferní krve a dále demethylací v oblasti FoxP3 TSDR, která je asociována se stabilní expresí genu FoxP3 a je charakteristická pro přirozené Treg. Množství intratumorózních Treg pozitivně korelovalo s hladinou chemokinu CCL22 v nádorovém supernatantu, což svědčí pro chemotaxi regulačních T lymfocytů z periferní krve prostřednictvím CCR4/CCL22. Chemokin CCL22 byl produkován zejména nádorovými buňkami, monocyty/makrofágy a mDC v mikroprostředí nádoru pod vlivem IFN- γ . Tato práce prezentuje změnu imunitní reakce od efektorových Th17 lymfocytů k Treg v průběhu nádorové progresu. Recruitment Treg z periferní krve pod vlivem zánětlivých mediatorů se významně podílí na imunosupresivním mikroprostředí nádoru v pokročilém stádiu ovariálního karcinomu.

Dynamics of T-cell infiltration during the course of ovarian cancer: The gradual shift from a Th17 effector cell response to a predominant infiltration by regulatory T-cells

Anna Fialová¹, Simona Partlová¹, Luděk Sojka¹, Hana Hromádková¹, Tomáš Brtnický², Jitka Fučíková¹, Petr Kocián^{1,3}, Lukáš Rob², Jiřina Bartůňková¹ and Radek Špišek¹

¹Department of Immunology, UK and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

²Department of Gynecology and Obstetrics, UK and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

³Department of Surgery, UK and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

The type of immune cells that are present within the tumor microenvironment can play a crucial role in the survival of patients. However, little is known about the dynamics of the tumor-infiltrating immune cells during disease progression. We studied the immune cells that infiltrated the tumor tissues of ovarian cancer patients at different stages of disease. The early stages of development of ovarian carcinomas were characterized by a strong Th17 immune response, whereas in stage II patients, recruitment of high numbers of Th1 cells was observed. In disseminated tumors (Stages III–IV), we detected a dominant population of Helios⁺ activated regulatory T cells (Tregs) along with high numbers of monocytes/macrophages and myeloid dendritic cells (mDCs). Tumor-infiltrating Tregs had markedly lower expression of CCR4 than circulating Tregs, and the numbers of tumor-infiltrating Tregs significantly correlated with the levels of CCL22 in ovarian tumor cell culture supernatants, suggesting their recruitment *via* a CCR4/CCL22 interaction. CCL22 was mainly produced by tumor cells, monocytes/macrophages and mDCs in the primary ovarian tumors, and its expression markedly increased in response to IFN γ . Taken together, the specific recruitment of Tregs, probably triggered by inflammatory stimuli, leads to a significant immune suppression in the advanced stages of ovarian cancer.

Introduction

Ovarian cancer is one of the 10 most common malignancies in females worldwide and is known to have the highest mortality rate among gynecologic cancers.¹ Because of the lack of sensitive and specific biomarkers and due to the fact that the disease tends to develop and spread rapidly, almost 70% of patients are diagnosed at an advanced stage of tumor dissemination with poor prognosis. Although conventional treatment leads to a significant reduction in malignant cell

numbers in more than 80% of ovarian carcinomas, most of the patients experience an eventually lethal relapse of the disease within 2–5 years because of the persistence of a small number of chemotherapy-resistant tumor cells.² To improve the prognosis of ovarian cancer patients, there is a need for superior prognostic markers and novel therapeutic strategies that can identify high-risk patients and diminish the likelihood of relapse, respectively.

Immune surveillance has been proposed to play a crucial role in cancer development and progression. Experiments in immunodeficient mice have shown that the immune system is able to recognize and eradicate tumors.^{3–5} However, although cancer cells can prime tumor-specific immune responses, interactions between the tumor and the host immune system may not result in clinical regression of the disease but instead to the development of an immunosuppressive microenvironment within the tumor tissue, consequently promoting immune evasion.⁶

Despite being unable to eradicate established tumors, the presence of certain tumor-infiltrating immune cells can represent strong prognostic markers in cancer patients. Zhang et al.⁷ has reported that high numbers of tumor-infiltrating CD3⁺ T cells are associated with a favorable clinical outcome in advanced ovarian cancer patients. More recent studies have reported that improved survival is associated with enhanced numbers of CD8⁺ cytotoxic T cells.^{8,9} By contrast, high numbers of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells

Key words: epithelial ovarian cancer, Th17, Treg, CCL22, recruitment

Abbreviations: DC, dendritic cell; EOC, epithelial ovarian cancer; FIGO, International Federation of Gynecology and Obstetrics; mDC: myeloid dendritic cell; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; Treg: regulatory T cell

Grant sponsor: Czech Ministry of Education; **Grant number:** MSM 0021620812; **Grant sponsor:** Czech Ministry of Health; **Grant number:** IGA NT12402-5; **Grant sponsor:** Charles University; **Grant numbers:** GAUK 3654/2011, 63310/2010

DOI: 10.1002/ijc.27759

History: Received 2 Feb 2012; Revised 24 Jun 2012; Accepted 18 Jul 2012; Online 2 Aug 2012

Correspondence to: Dr. Anna Fialová, Department of Immunology, 2nd Faculty of Medicine, Charles University, V Úvalu 84, CZ-15006 Prague 5, Czech Republic, Tel.: +420 224 435 950, Fax: +420 224 435 962, E-mail: anna.fialova@lfmotol.cuni.cz

What's new?

The types of immune cells within a tumor can play a crucial role in patient survival. In this study of ovarian cancer (OC), the authors examined the immune cells infiltrating tumor tissues of patients at various stages of the disease. They found that the pattern of cells shifted as the disease progressed, from an active anti-tumor immune response to one of immune suppression, with activated regulatory T cells (Tregs) becoming the most abundant cell type in advanced OC. The authors conclude that overcoming this suppressive microenvironment should play a role in new therapeutic protocols.

(Tregs),¹⁰ plasmacytoid dendritic cells,¹¹ and B7-H4⁺ macrophages¹² within the tumor tissue can indicate a poor prognosis. The role of CD4⁺ T helper cells is less well documented; however, there is strong evidence that Th17 cells may be substantial players in cancer immunity. Proinflammatory Th17 cells have primarily been associated with autoimmune diseases and mucosal immunity.¹³ Further studies have demonstrated that Th17 cells are present in different types of tumors, including ovarian cancer, head and neck cancer, gastric cancer, breast cancer, colorectal cancer and prostate cancer.^{14–19} Although extensively studied, the exact role of Th17 cells in tumor immunity and the survival of patients remains controversial. On the one hand, IL-17-producing cells have been reported to promote antitumor immunity,^{20–22} but on the other hand, IL-17 is known to act as an angiogenic factor that can enhance tumor growth.^{23–25}

Most published studies have focused on the pattern and prognostic significance of different types of tumor-infiltrating immune cells; however, little is known about the dynamics of the immune response within the tumor tissue during disease progression. In this study, we evaluated the distribution, phenotype and clinico-pathological significance of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes, dendritic cells (DCs) and monocytes/macrophages in different stages of epithelial ovarian cancer (EOC). Our findings demonstrate an alteration in the tumor-infiltrating immune cell pattern during cancer development and clearly show a dynamic shift from an effector Th17 cell infiltration, which prevail over Tregs in the early stages of EOC, to a significant Treg accumulation in the advanced stages of disease.

Material and Methods**Patients and tissue samples**

Peripheral blood and primary epithelial ovarian cancer specimens were obtained from 44 patients undergoing initial cytoreductive surgery at the University Hospital Motol in Prague between March 2009 and October 2011. None of the patients enrolled in the study had received neoadjuvant chemotherapy prior to the surgery. All tissue specimens were collected with patient consent, and the study was approved by the Institutional Review Board of the University Hospital Motol. The clinico-pathological characteristics of the patients are summarized in Table 1.

Tumor tissue was minced with scissors, digested in PBS containing 1 mg/ml of Collagenase D (Roche, Basel, Switzerland) at 37°C for 30 min, mechanically dissociated using the

gentleMACS™ Dissociator (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) and passed through a 100 µm nylon cell strainer (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from blood samples were isolated using Ficoll-Paque density gradient solution (GE Healthcare, Waukesha, WI).

Cell lines

The ovarian cancer cell lines, OV-90 and SKOV3, were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated FCS, L-glutamine and penicillin-streptomycin (all from Invitrogen, Carlsbad, CA) at 37°C and 5% CO₂.

Flow cytometry analysis

To detect tumor infiltrating myeloid DCs (mDCs), plasmacytoid DCs (pDCs) and monocytes/macrophages, single cell suspensions were stained with specific antibodies against CD3, CD11c, CD14, CD16, CD19, CD20, CD45, CD56 (Exbio, Vestec, Czech Republic), CD123 (eBioscience, San Diego, CA) and HLA-DR (BD Biosciences). Regulatory T cells (Tregs) were identified by surface staining with anti-CD3 (Exbio), anti-CD4 (eBioscience), anti-CD8 (Exbio), anti-CD25, anti-CD127 and anti-CCR4 (BioLegend) antibodies followed by fixation and permeabilization with a Foxp3 Staining Buffer Set (eBioscience) and intracellular staining with anti-FoxP3 (eBioscience) and anti-Helios (BioLegend) antibodies. For detection of intracellular cytokines, cell suspensions were stimulated with 50 ng/ml of PMA and 1 µg/ml of ionomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) for 4 hr in the presence of brefeldin A (BioLegend). After the 4-hr incubation, cells were stained with antibodies against CD3 (Exbio), CD4 (eBioscience), and CD8 (Exbio), fixed and permeabilized with the Foxp3 Staining Buffer Set (eBioscience) and stained with anti-IL-17 (BioLegend) and anti-IFNγ (BD Biosciences) antibodies. For CCL22 detection, cells were cultured in the presence of brefeldin for 4 hr and labeled with the antibodies used for DC/macrophage identification, EpCAM (BioLegend) and CCL22 (R&D, Minneapolis, MN) as described above. Samples were analyzed on a BD FACSAria (BD Biosciences) using FlowJo software (TreeStar, Ashland, OR).

Cytokine and chemokine detection

Tumor tissue-derived cell suspensions (1 x 10⁶ cells/ml) were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated FCS, L-glutamine and penicillin-streptomycin (Invitrogen) in the presence or absence of PMA + ionomycin. For IFNγ-mediated induction of chemokines, ovarian cancer cell

Table 1. Clinicopathological characteristics of the EOC patients in the study

Variable	No.	%
Total no. of patients	44	
Age		
Mean	56	
Range	33–83	
FIGO stage		
I	6	13.6
II	5	11.4
III	32	72.7
IV	1	2.3
Histological subtype		
Serous	27	61.4
Mucinous	9	20.4
Clear cell	3	6.8
Other	5	11.4
Differentiation		
Well	6	13.6
Moderate	9	20.4
Poor	21	47.7
ND	8	18.3

lines and primary tumor tissue-derived cell suspensions (1×10^6 cells/ml) were cultured in the presence of 10, 50 and 100 ng/ml of recombinant human IFN γ (Invitrogen). After 24 hr of incubation, culture supernatants were harvested and stored at -80°C until use. Concentrations of IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-17a, IL-21, IFN γ and TNF α released into the culture supernatants were determined using a MILLIPLEXTM Human Cytokine/Chemokine Kit (Millipore, Billerica, MA). Concentrations of chemokines (CCL2, CCL5, CCL17, CCL19, CCL20, CCL21, CCL22, CXCL9 and CXCL10) were analyzed using a Quantibody[®] Array Kit (Raybiotech, Norcross, GA).

Extraction of genomic DNA and quantitative real time PCR-based methylation assay

Genomic DNA (gDNA) was isolated from a lysate containing 2×10^6 tumor tissue-derived cells using the PureLink Genomic DNA Mini kit (Invitrogen, Carlsbad, USA). Concentrations of extracted gDNA were measured with a Nanodrop[®] 2000c UV-Vis spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, USA). Four to five micrograms of gDNA was treated with sodium bisulfite using the MethylCode Bisulfite Conversion kit (Invitrogen). Quantitative real time PCR amplification of the methylated and demethylated *FoxP3* Treg-specific demethylated region (TSDR) was performed using bisulfite-treated gDNA, 0.5 U Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen), PCR buffer without MgCl₂, 3 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs (each), 1 μM primers and 0.2 μM

TaqMan[®] probe. PCR reactions were performed using a CFX 96 cycler (BioRad, Hercules, USA). Methylation-specific and demethylation-specific primers and TaqMan[®] probes were commercially synthesized (TIB MOLBIOL, Berlin, Germany). Amounts of methylated and demethylated *FoxP3* TSDR DNA were estimated from calibration curves by crossing points linear regression using the second derivative maximum method as described by Rasmussen *et al.*²⁶ The proportion of cells with a demethylated *FoxP3* TSDR was calculated as the ratio of demethylated *FoxP3* TSDR DNA to the sum of methylated and demethylated *FoxP3* TSDR DNA.^{27,28}

Plasmid constructs

DNA fragments of the methylated and demethylated *FoxP3* TSDR (86 bp) were cloned into the pUC18 plasmid (Amersham Biosciences, Amersham, UK) using *Hind*III and *Eco*RI restriction sites. The identity of the plasmid constructs was verified by sequencing followed by plasmid DNA purification using a Wizard Plus Midipreps kit (Promega, Madison, USA) and dilution to seven final concentrations of 100, 10, and 1 pg/ μl and 100, 10, 1 and 0.1 fg/ μl , representing a range of 3.34×10^{-7} to 3.34×10^{-1} plasmid copies. Serial dilutions demonstrated the specificity of the assay and were used as standards for quantification of the methylated and demethylated *FoxP3* TSDR.

RNA extraction and quantitative real time PCR

Total RNA was extracted from 2×10^6 tumor-tissue derived cells using an RNA Easy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). RNA concentrations were determined with a Nanodrop[®] 2000c UV-Vis spectrophotometer (Thermo Scientific), and RNA integrity was assessed using an Experion automated system (BioRad). Complementary DNA was synthesized from total RNA using the M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen) and amplified by quantitative real time PCR in the presence of primers and TaqMan[®] probes specific for TGF β and the β -actin housekeeping gene, which was used as an internal reference. All primers and probes were commercially synthesized (TIB MOLBIOL). The identity of qPCR products in each assay was verified by sequencing. The relative expression of the target genes was normalized to the expression of β -actin.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Statistica[®] 10.0 software (StatSoft, Tulsa, OK). The parametric assumptions of the data were verified using the Kolmogorov-Smirnov test for normality. The homogeneity of variances was tested by the Levene test. Correlations between tumor-infiltrating immune cells were evaluated using the Pearson *r* coefficient. The differences between tumor tissue and peripheral blood samples were analyzed using a paired *t*-test. The remaining data were analyzed using an ANOVA followed by a Scheffé test. The results were considered statistically significant when $p < 0.05$.

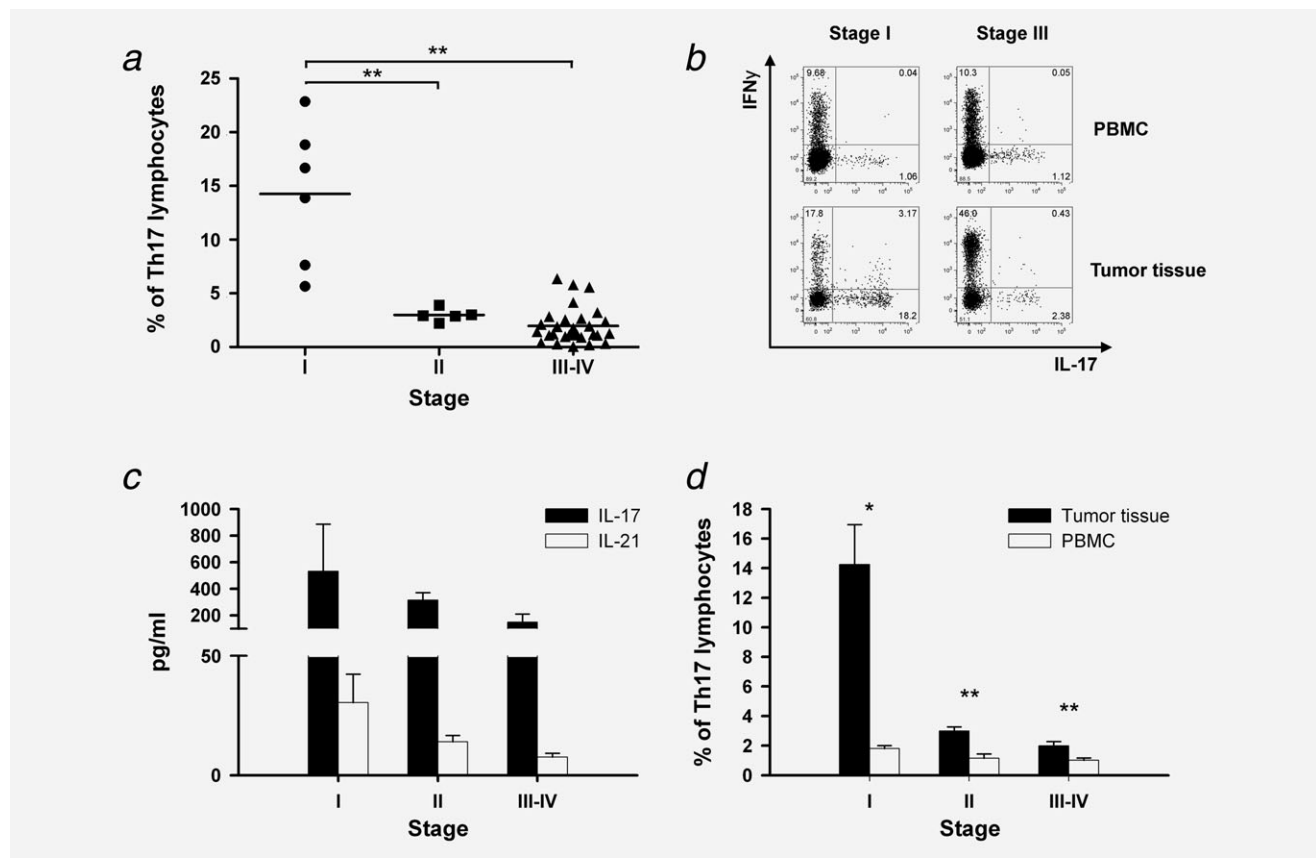


Figure 1. Proportions of Th17 cells within the primary ovarian tumor tissue and peripheral blood according to the stage of the disease. (a) Data are expressed as the proportion of Th17 lymphocytes among CD4⁺ T cells, — represents the mean value in each stage. (b) Dot plots are gated on CD3⁺CD4⁺ cells and show IL-17 and IFN γ in two representative patients. (c) Columns represent mean levels of IL-17 and IL-21 produced by PMA + ionomycin stimulated tumor tissue-derived cells + S.E.M. (d) Columns represent mean proportions of Th17 cells in the tumor tissue and PBMC + S.E.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (A, ANOVA followed by Scheffé test; D, paired t -test).

Results

Th17 lymphocytes accumulate in the tumor tissue and their proportions negatively correlate with disease progression

Th17 lymphocytes were detected in 100% of the analyzed ovarian tumor samples (range, 0.06–22.8%). The proportion of Th17 cells within the CD4⁺ T cell subset was significantly higher in the tumor tissues obtained from patients with limited disease (FIGO Stage I) than in those from patients suffering from disseminated disease (FIGO Stages III–IV) (Figs. 1a and 1b). The frequency of Th17 cells within the whole tumor-derived single cell suspensions showed the same pattern (data not shown), indicating that the absolute numbers of Th17 cells significantly decreased in the advanced disease. In accord with these findings, the concentration of IL-17 and IL-21 in tumor tissue-derived cell culture supernatants of early stage patients was markedly higher in both unstimulated (data not shown) and PMA- and ionomycin-stimulated (Fig. 1c) cultures. Despite the significant decrease in Th17 cell proportions in the later stages of the disease, the percentage of tumor-infiltrating Th17 cells was still significantly higher when compared with the peripheral blood of patients (Fig. 1d). The frequency of

Th17 cells in the peripheral blood was not predictive of the number or proportion of Th17 cells in the tumor tissue.

The proportion of tumor-infiltrating Tregs is enhanced in the tumor tissue and increases with disease progression

In contrast to Th17 cells, the proportion of CD4⁺CD25⁺CD127⁻FoxP3⁺ Tregs was significantly higher in the tumor tissues obtained from patients with disseminated disease (FIGO Stages III–IV) when compared with the samples from patients with Stage I disease (Figs. 2a and 2b). The proportion of tumor-infiltrating Tregs (Ti-Tregs) was significantly higher than that found in the peripheral blood of patients in all stages of the disease (Fig. 2c). To better characterize the status of Ti-Tregs, we included an analysis of the transcription factor, Helios, which is a marker of Treg activation. The proportion of Helios⁺ Tregs was significantly higher in the tumor tissue (67.8 ± 2.5%) than in the peripheral blood (56.3 ± 4.2%) of EOC patients (Fig. 2d). There was no difference in the proportions of Helios⁺ Tregs in the different stages of disease. The increasing proportion of stable Ti-Tregs during disease progression was further confirmed using a quantitative real time PCR-based methylation assay,

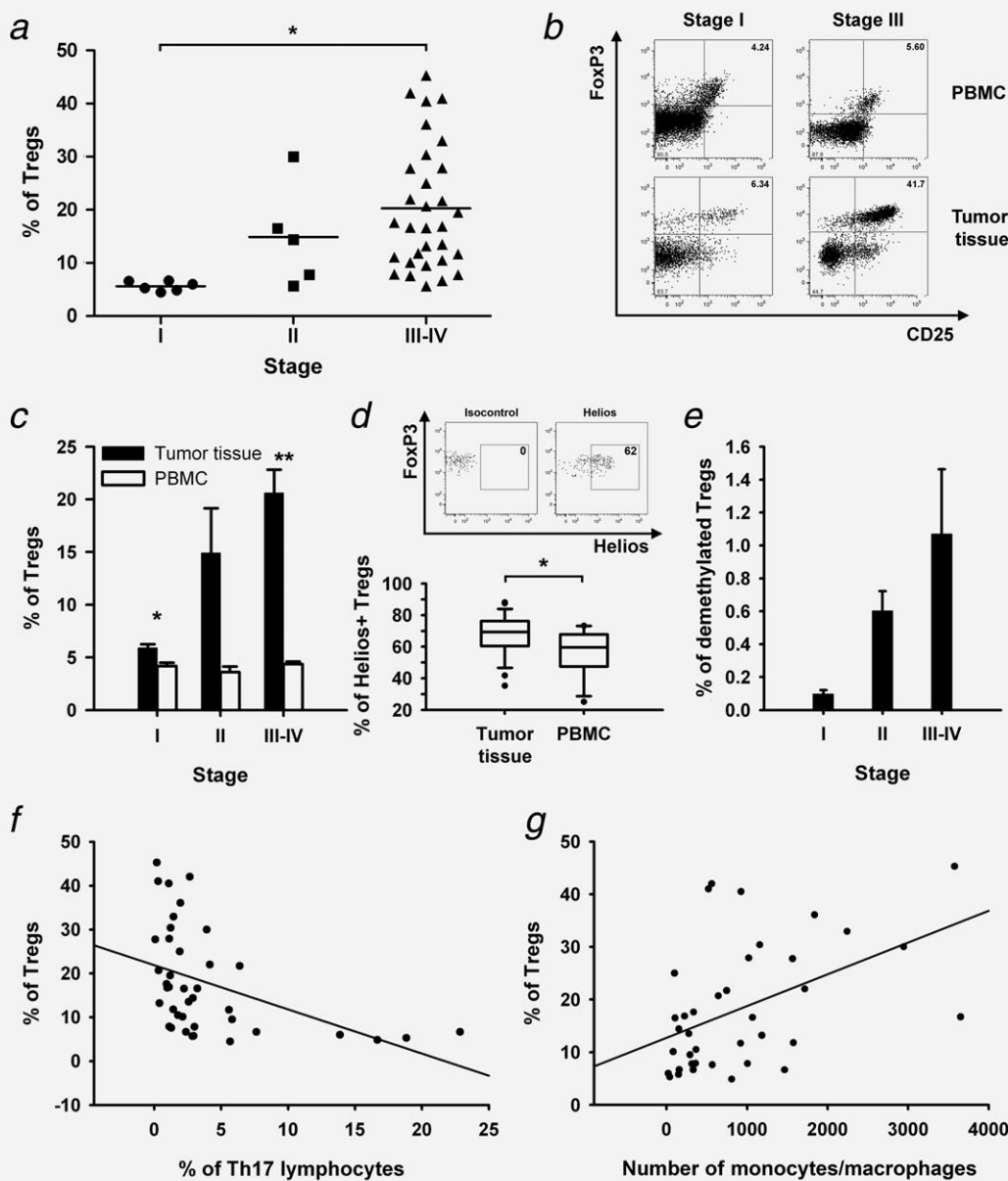


Figure 2. Proportions of Tregs within the primary ovarian tumor tissue and peripheral blood according to the stage of the disease. (a) Data are expressed as the proportion of $CD4^+CD25^+CD127^{\text{low}}FoxP3^+$ Tregs among $CD4^+$ T cells, — represents the mean value in each stage. (b) Dot plots are gated on $CD3^+CD4^+$ cells and show $CD25^+FoxP3^+$ Tregs in two representative patients. (c) Columns represent mean proportions of Tregs in the tumor tissue and PBMC + S.E.M. (d) Dot plots are gated on $CD3^+CD4^+CD25^+CD127^{\text{low}}$ cells and show $FoxP3^+Helios^+$ Tregs in the tumor tissue of a representative patient. Box plots represent the proportion of $Helios^+$ Tregs among $CD4^+CD25^+CD127^{\text{low}}FoxP3^+$ Tregs. The boundaries of the box indicate the 25th and the 75th percentiles, the line within the box represents the median. Whiskers indicate the 90th and 10th percentiles. (e) Columns represent proportions of Tregs demethylated in *FoxP3* TSDR among cells isolated from the primary ovarian tumor tissue in different stages of the disease, error bars indicate S.E.M. (f) The line shows negative correlation between % of tumor-infiltrating Tregs and Th17 cells. (g) The line shows positive correlation between % of tumor-infiltrating Tregs and the number of tumor-infiltrating monocytes/macrophages. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (a, ANOVA followed by Scheffé test; c, d, paired *t*-test).

which assessed the percentage of stable Tregs that were demethylated at the *FoxP3* TSDR in tumor tissue-derived single cell suspensions (Fig. 2e). The proportions of Tregs and Th17 lymphocytes were inversely correlated in the same tumors ($r = -0.44$, $p < 0.01$) (Fig. 2f), whereas the proportion of Tregs positively correlated with the number of monocytes/macrophages ($r = 0.47$, $p < 0.01$) (Fig. 2g).

Proportions of Th1 and $CD8^+$ T lymphocytes, DCs and monocytes/macrophages do not show significant changes during disease progression

In addition to Th17 cells and Tregs, we also analyzed the presence of other immune cell subsets, including Th1 cells, $CD8^+$ T cells, pDCs, mDCs and monocytes/macrophages, in the tumor tissue. Although there was a trend toward an increase in

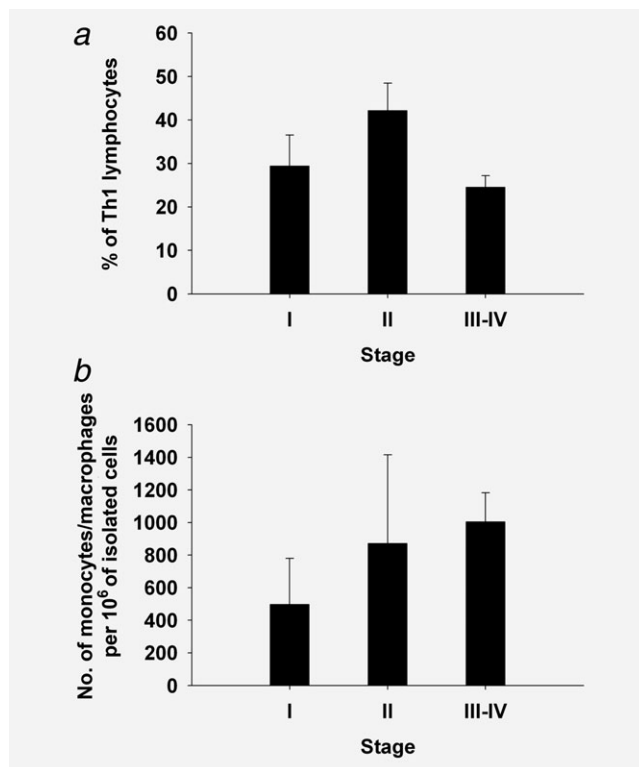


Figure 3. Proportions of Th1 lymphocytes and monocytes/macrophages within the primary ovarian tumor tissue according to the stage of the disease. (a) Data are expressed as the mean proportion of CD3+CD4⁺IFN γ + Th1 cells among CD4⁺ T cells + S.E.M. (b) Columns represent the mean number of CD45⁺Lineage⁻HLA-DR⁺CD14⁺ monocytes/macrophages in 1×10^6 of isolated tumor-derived cells + S.E.M.

mDC and monocyte/macrophage proportions in the advanced tumors (Fig. 3), none of these cell types showed any statistically significant dynamics during ovarian cancer progression.

Cytokine and chemokine profiles of tumor-derived single cell suspensions support the recruitment of polarized Th lymphocytes into the tumor tissue rather than their *in situ* priming and polarization

To better characterize the tumor microenvironment and to evaluate, whether the cytokine profile supports *in situ* priming and polarization of T lymphocytes, we assessed the cytokine and chemokine profile in the tumor-derived cell culture supernatants. In the unstimulated culture supernatants, only three cytokines were detected in significant amounts, IL-6, IL-10 and TNF α (Fig. 4a). IL-2, IL-4, IL-12 and IL-23 levels were below the limit of detection of the MILLIPLEXTM assay in most of the patient samples tested, and IL-17 was only detected in cell supernatants of patients in Stage I of disease. Importantly, only minimal concentrations of IL-1 β (4.2 ± 2.5 pg/ml), which is crucial for Th17 polarization, were detected in culture supernatants from Stage I patients, who had the highest proportions of tumor-infiltrating Th17 cells (Fig. 4c). Except for IL-17, no other significant correla-

tions with disease progression were observed in the unstimulated cultures. Upon PMA and ionomycin stimulation, most of the tested cytokines were produced, except IL-12 and IL-23 (Fig. 4a). The production of IL-21 was significantly decreased in culture supernatants from patients in the advanced stages of the disease when compared with culture supernatants from Stage I patients (Fig. 1c). The expression of TGF β mRNA was observed in all of the patient samples and did not significantly correlate with disease stage (Fig. 4d).

Unstimulated tumor-derived cells produced high amounts of CCL20, CCL22 and inflammatory CXCL9 and CXCL10 (Fig. 4b) but low amounts of CCL2, CCL5, CCL17, CCL19 and CCL21. The levels of CCL22 (Fig. 5a), CXCL9 and CXCL10 (not shown) increased during disease progression; however, these data were not statistically significant. The levels of CXCL9 significantly correlated with the numbers of tumor-infiltrating CD4⁺ ($r = 0.65$, $p < 0.01$) and CD8⁺ ($r = 0.64$, $p < 0.01$) T lymphocytes. There was no correlation with a particular Th lymphocyte subset (not shown). Most important, the levels of CCL22 significantly correlated with the number of Ti-Tregs ($r = 0.66$, $p < 0.01$) (Fig. 5b). No other correlations between the chemokines and tumor-infiltrating immune cells were observed.

Tregs are probably recruited to the tumor tissue via a CCL22/CCR4 interaction and proliferate *in situ*

As described above, the number of Ti-Tregs significantly correlated with the level of CCL22 in the tumor cell culture supernatants. In accord with these observations, Ti-Tregs had significantly lower expression of CCR4 than Tregs from the peripheral blood (mean fluorescence intensity $6,280 \pm 35$ and $3,487 \pm 333$, respectively; $n = 6$) (Fig. 5c). To evaluate whether Ti-Tregs proliferated *in situ*, Ki67 staining was performed in tumor tissue-derived cell suspensions and PBMCs. A markedly higher percentage of Ti-Tregs expressed Ki67 when compared with Tregs in the peripheral blood ($21.8 \pm 5.1\%$ and $12.9 \pm 1.8\%$, respectively; $n = 6$). Ki67 was expressed in a significantly lower proportion of conventional CD4⁺FoxP3⁻ T cells in comparison with Tregs ($7.6 \pm 2.7\%$ in the tumor tissue and $2.3 \pm 0.4\%$ in the peripheral blood) (Figs. 5d and 5e).

Ovarian cancer cell lines produce chemokines, including CCL22, upon IFN γ stimulation

To assess whether ovarian cancer cell lines were able to produce CCL22, OV-90 and SKOV3 cells were cultured either without stimulation or upon stimulation with recombinant human IFN γ , as IFN γ has been shown to induce CCL22 production in breast cancer cell lines.²⁹ In contrast to primary tumor-derived cell suspensions, spontaneous CCL22 secretion was undetectable in the ovarian cancer cell lines, a result that was similar to most of the other chemokines measured in this study. The SKOV3 cell line spontaneously produced small amounts of CXCL9 (Fig. 6a), whereas unstimulated

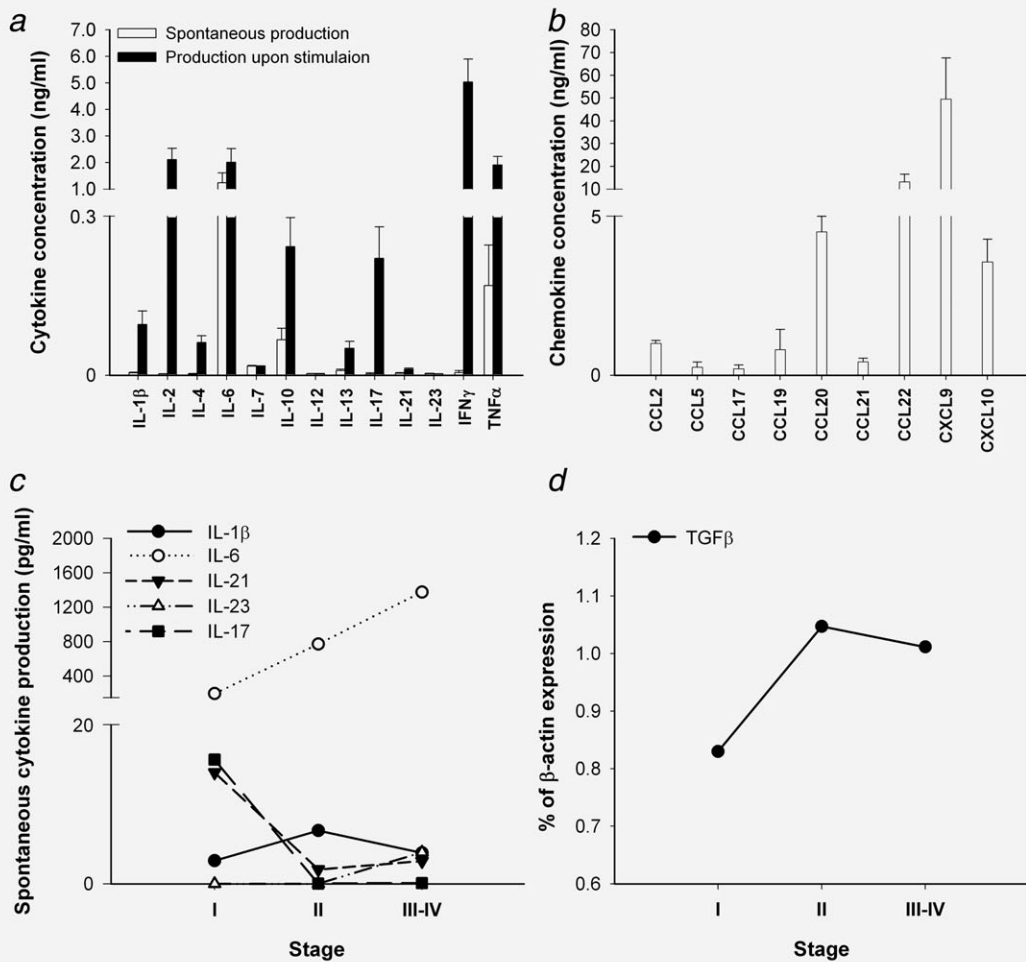


Figure 4. Cytokine and chemokine profiles of tumor-derived single cell suspensions. (a) White columns represent the mean spontaneous cytokine production; black columns represent cytokine production upon PMA and ionomycin stimulation. (b) Columns represent mean spontaneous chemokine production. All error bars indicate S.E.M. (c) The plot expresses the dynamics of the mean spontaneous production of Th17 polarizing cytokines and IL-17 during the disease progression. (d) The plot indicates the dynamics of TGF β mRNA expression during the disease progression presented as the mean proportion of β -actin mRNA expression.

OV-90 cells produced high amounts of CXCL9, CXCL10 and CCL20 (Fig. 6b). The addition of IFN γ induced robust secretion of CCL19, CCL21 and CCL22 in both of the cell lines tested. Surprisingly, production of CXCL9, CXCL10 and CCL20 increased in SKOV3 but decreased in OV-90 cells upon IFN γ stimulation (Figs. 6a and 6b).

Primary ovarian tumor-derived cells have markedly increased CCL22 production upon IFN γ stimulation

To evaluate the effect of IFN γ on primary tumor-derived single cell suspensions, cells isolated from patient tumor tissues ($n = 6$) were cultured in the presence of IFN γ . As shown in Figure 6c, only CCL21, CCL22 and CXCL10 concentrations increased in the tumor cell culture supernatants upon IFN γ stimulation, with the most significant increase observed for CCL22. As the source of the CCL22 secretion, EpCAM $^+$ tumor cells, monocytes/macrophages and mDCs were identified in unstimulated as well as stimulated cultures (Fig. 6d).

Discussion

The presence and prognostic value of different types of tumor-infiltrating immune cells within tumor tissues have been extensively studied; however, little is known about the alterations in immune cell patterns within the tumor tissue during disease progression. To investigate the dynamics of immune cell distribution within cancer tissues, adequate selection of patients with both early and advanced disease is essential. However, with less than 15% of EOC patients diagnosed at Stage I,^{30,31} it is very challenging to study the microenvironment of the early ovarian cancer lesions in prospective studies. Despite the extremely low availability of fresh tumor tissue samples from early disease patients, we were able to analyze six tumor samples from Stage I patients together with 38 tumor samples from patients with more advanced disease (Stages II–IV).

We found that different subsets of CD4 $^+$ T cells, but not other immune cell types, were present and exhibited a significantly different pattern during disease progression. Indeed, the

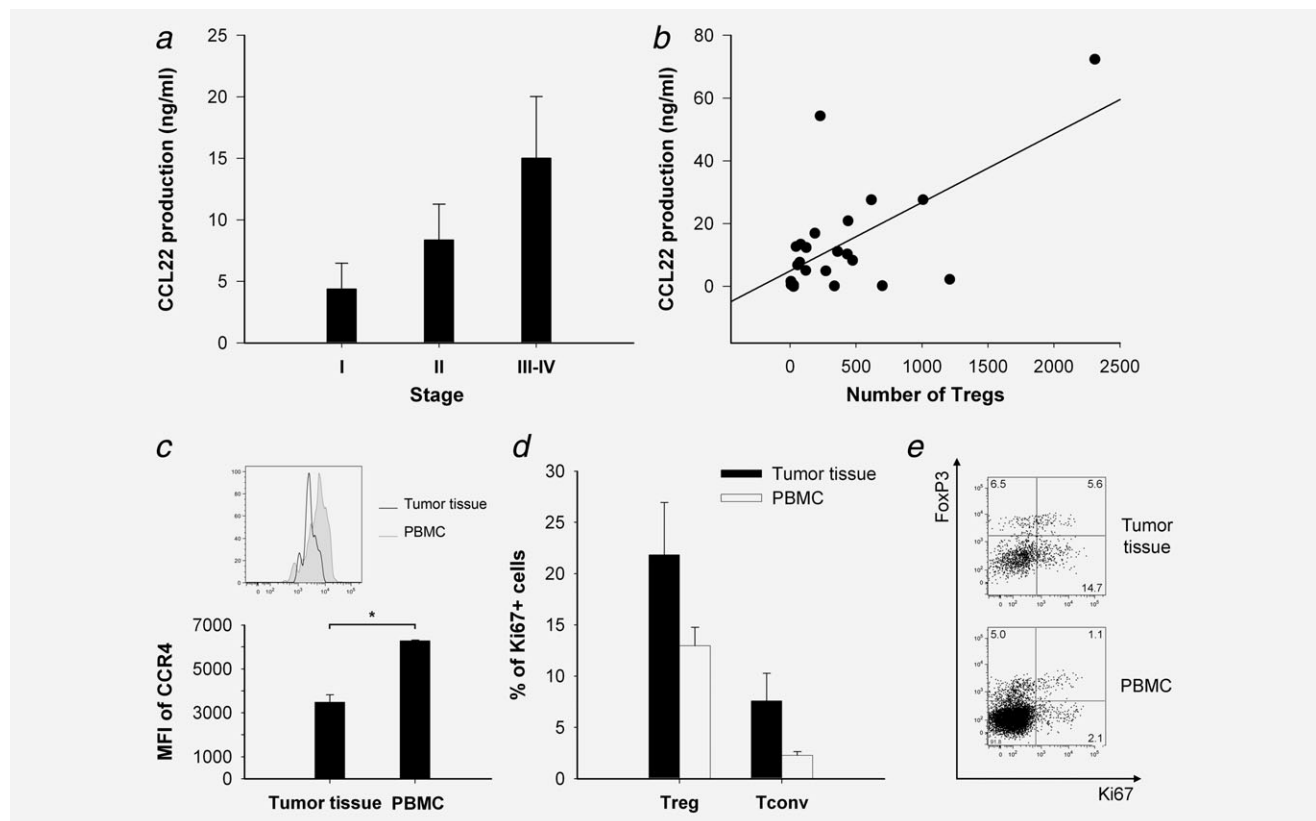


Figure 5. Recruitment of Tregs into the ovarian tumor tissue is probably CCL22-mediated. (a) Columns represent CCL22 production in tumor tissue derived cell culture supernatants + S.E.M. (b) The scatter plot expresses the positive correlation between CCL22 production and number of Tregs. (c) Histograms show the CCR4 expression in $CD4^+CD25^+CD127^-FoxP3^+$ Tregs in the tumor tissue (black line) and peripheral blood (gray line, tinted) in a representative patient. Columns represent the mean fluorescence intensity of CCR4 on $CD4^+CD25^+CD127^-FoxP3^+$ Tregs in the tumor tissue and peripheral blood + S.E.M. ($n = 6$). (d) Columns represent the mean proportion of proliferating $Ki67^+CD4^+CD25^+CD127^-FoxP3^+$ Tregs and $CD4^+FoxP3^-$ conventional T cells (Tconv) in the tumor tissue and peripheral blood + S.E.M. ($n = 6$). (e) Dot plots are gated on $CD3^+CD4^+$ cells and show the proportion of $Ki67^+FoxP3^+$ Tregs and $FoxP3^-Tconv$ in a representative Stage III patient. * $p < 0.05$ (paired t -test).

early stages of EOC were characterized by a strong Th17 immune response (Fig. 1a), whereas in advanced stages of disease, a dominant population of regulatory T cells was detected (Fig. 2a). Surprisingly, $CD8^+$ T lymphocytes and pDCs did not show any substantial alterations, whereas the proportions of mDCs and monocytes/macrophages appeared to increase during disease progression. The proportion of Th1 cells slightly increased in the Stage II tumors and then decreased again in the advanced stages of disease (data not shown). However, neither the alterations in mDCs and monocytes/macrophages nor those in Th1 cells were statistically significant. A similar kinetics of $CD4^+$ effector T cells, *i.e.*, an early burst of Th17 cells that was replaced by high numbers of $IFN\gamma$ -producing cells, has been described in mouse models of EAE³² and infection.³³ Consistent with these observations, Lohr *et al.*³⁴ transferred antigen-specific T cells into transgenic mice expressing the antigen recognized by the T cells and found the sequential development of Th17 and then Th1 effector cells followed by Treg development in the late phase of disease. As far as we know, this dynamic has not yet been described in the microenvironment of human tumors.

Notably, the origin of the tumor-infiltrating Th17 cells and their exact role in tumor immunity remain controversial. Kryczek *et al.*¹⁵ has reported that macrophages isolated from EOC tissues are capable of inducing Th17 cells *in vitro*. However, because IL-1 β , IL-6 and IL-23 are supposed to be essential for the differentiation of human Th17 cells,^{35,36} the cytokine profile of the tumor microenvironment that was observed in our study, especially the very low levels of IL-1 β in stage I patients together with the complete lack of IL-23 (Fig. 4c), does not support the hypothesis of Th17 polarization *in situ*. It has been shown that Th17 trafficking could be mediated *via* the CCR6/CCL20 axis.³⁷ Surprisingly, in our study we have not observed any correlation between the numbers of Th17 cells and CCL20 levels in the tumor tissue.

In comparison with Th17 cells, many more studies have focused on the trafficking properties and prognostic significance of Tregs in tumors. Curiel *et al.* has shown that Tregs infiltrating ovarian cancer tissues effectively inhibit TAA-specific immunity *in vitro* and *in vivo* and contribute to tumor growth. These authors also suggested that Treg tumor trafficking could be mediated by CCL22.¹⁰ Treg recruitment into

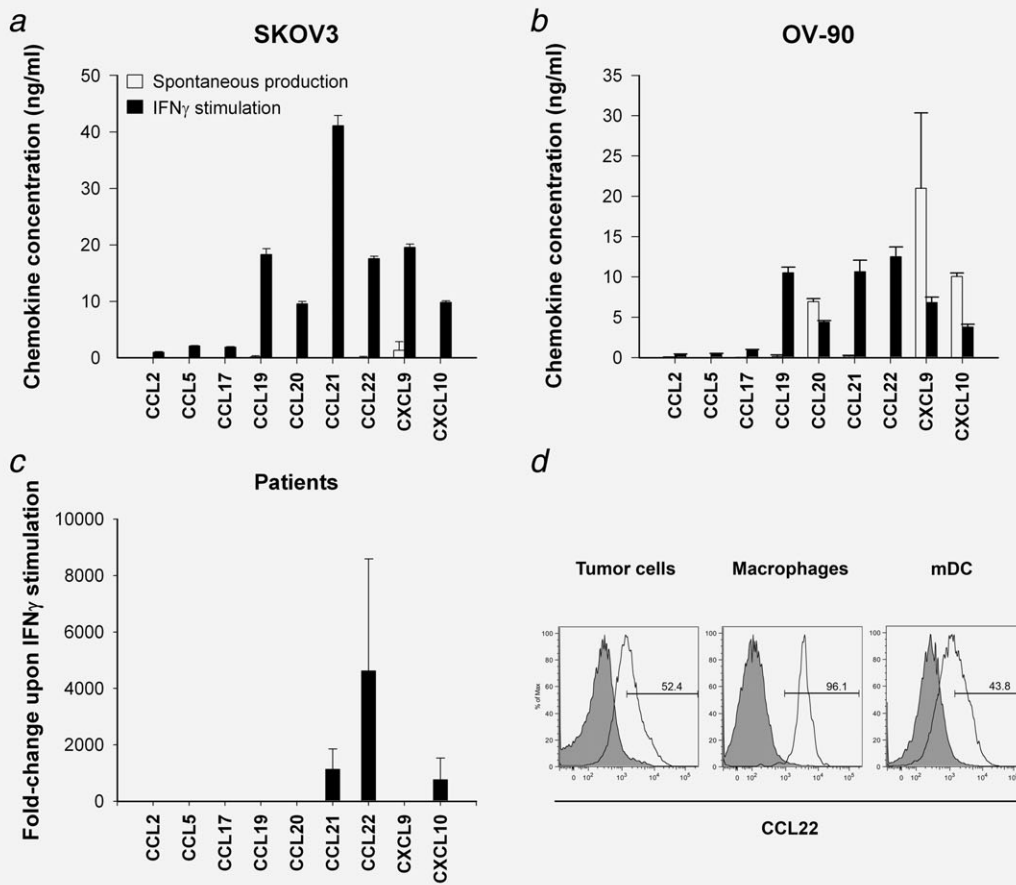


Figure 6. IFN γ induces chemokine production in both ovarian cancer cell lines and patients. (a, b) Columns represent the mean chemokine production in ovarian cancer cell lines with (black columns) or without IFN γ (white columns) stimulation + S.E.M. (c) Data are expressed as the mean fold-changes in chemokine levels in IFN γ -stimulated primary tumor-derived cell cultures in comparison to unstimulated cultures + S.E.M. (d) Histograms show the spontaneous expression of CCL22 in primary tumor-derived cells. Cells are gated on CD45⁺EpCAM⁺ tumor cells; CD45⁺Lineage⁻HLA-DR⁺CD14⁺ monocytes/macrophages and CD45⁺Lineage⁻HLA-DR⁺CD14⁻CD11c⁺ mDCs.

the tumor tissue *via* CCL22/CCR4 has recently been confirmed in breast cancer patients.^{29,38}

In this study, we showed that Ti-Tregs were mainly Helios⁺ activated Tregs. A significant number of these Ti-Tregs was demethylated in the *Foxp3* TSDR. Naturally occurring, but not *in vitro* TGF β -induced, Foxp3⁺ Tregs have been shown to display stable Foxp3 expression that is associated with selective demethylation of the TSDR.³⁹ Similarly, the Ikaros family member, Helios, has been reported to be a marker useful for discriminating between naturally occurring thymic-derived Tregs (nTregs) and those peripherally induced from naïve CD4⁺ T cells (iTregs),⁴⁰ but these findings have very recently been questioned by Akimova *et al.*⁴¹ Thus, rather than discriminating between nTregs and iTregs, Helios appears to be useful for indicating activated Tregs regardless of their origin.⁴¹ Taken together, the high expression of Helios together with the demethylation of the TSDR found in the Ti-Tregs in the EOC tissues in our study indicate the stability and highly activated status of these cells.

In accord with the studies concerning Treg tumor trafficking, we demonstrated that the number of Ti-Tregs signifi-

cantly correlated with the concentration of CCL22 in the ovarian tumor cell culture supernatants. Consistently, Ti-Tregs had significantly lower expression of CCR4 than circulating Tregs. As shown by Gobert *et al.*,³⁸ low levels of CCR4 reflect its internalization due to an active engagement with CCL22. We also observed that a large proportion of Ti-Tregs (21.8 \pm 5.1%) expressed the proliferation marker, Ki67, indicating their extensive local expansion.

Faget *et al.*²⁹ has demonstrated that IFN γ triggers production of CCL22 by breast tumor cells. Indeed, the cooperation between tumor cells and the immune cell infiltrate (especially macrophages and NK cells) has been shown to be essential for inducing high quantities of CCL22. Similarly, we observed that ovarian cancer cell lines produced chemokines, including significant levels of CCL22, upon IFN γ stimulation. Most important, in primary ovarian cancer tissue-derived cells, recombinant IFN γ selectively augmented CCL22 production with only a small effect on the other chemokines tested (Fig. 6c). Tumor cells, monocytes/macrophages and mDCs were identified as the key source of CCL22 in the cancer tissue samples in our study.

In summary, our data suggest that the development of the antitumor immune response in ovarian cancer patients is highly dynamic. In the early stages of the disease, a strong recruitment of Th17 cells is observed, which is followed by a recruitment of Th1 cells, monocytes/macrophages and mDCs. In the later stages of EOC, enhanced levels of IFN γ , probably produced by the immigrating cells, together with increased proportions of monocytes/macrophages and mDCs may favor the production of CCL22 and the recruitment of Tregs via CCL22/CCR4, thus promoting the development of a suppressive

microenvironment. Thus, as our findings clearly show a dynamic shift from an active antitumor immune response to a significant immune suppression in the advanced EOC, the development of novel cancer immunotherapy protocols should not only involve immune-boosting strategies but should also target the immunosuppressive tumor microenvironment in advanced disease.

Acknowledgements

The authors would like to thank Hana Ulčová for technical assistance.

References

- American Cancer Society. Global Cancer Facts & Figures, 2nd ed. Atlanta: American Cancer Society, 2011. 58 p.
- Ozols RF, Bundy BN, Greer BE, et al. Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *J Clin Oncol* 2003;21:3194–200.
- van den Broek ME, Kägi D, Ossendorp F, et al. Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J Exp Med* 1996;184:1781–90.
- Smyth MJ, Thia KY, Street SE, et al. Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J Exp Med* 2000;191:661–8.
- Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, et al. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 2001;410:1107–11.
- Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer* 2005;5:263–74.
- Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 2003;348:203–13.
- Sato E, Olson SH, Ahn J, et al. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:18538–43.
- Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:3360–5.
- Curiel TJ, Coukos G, Zou L, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004;10:942–9.
- Labidi-Galy SI, Sisirak V, Meeus P, et al. Quantitative and functional alterations of plasmacytoid dendritic cells contribute to immune tolerance in ovarian cancer. *Cancer Res* 2011;71:5423–34.
- Kryczek I, Wei S, Zhu G, et al. Relationship between B7-H4, regulatory T cells, and patient outcome in human ovarian carcinoma. *Cancer Res* 2007;67:8900–5.
- Bettelli E, Korn T, Oukka M, et al. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 2008;453:1051–7.
- Miyahara Y, Odunsi K, Chen W, et al. Generation and regulation of human CD4+ IL-17-producing T cells in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:15505–10.
- Kryczek I, Banerjee M, Cheng P, et al. Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood* 2009;114:1141–9.
- Kesselring R, Thiel A, Pries R, et al. Human Th17 cells can be induced through head and neck cancer and have a functional impact on HNSCC development. *Br J Cancer* 2010;103:1245–54.
- Maruyama T, Kono K, Mizukami Y, et al. Distribution of Th17 cells and FoxP3(+) regulatory T cells in tumor-infiltrating lymphocytes, tumor-draining lymph nodes and peripheral blood lymphocytes in patients with gastric cancer. *Cancer Sci* 2010;101:1947–54.
- Su X, Ye J, Hsueh EC, et al. Tumor microenvironments direct the recruitment and expansion of human Th17 cells. *J Immunol* 2010;184:1630–41.
- Sfanos KS, Bruno TC, Maris CH, et al. Phenotypic analysis of prostate-infiltrating lymphocytes reveals TH17 and Treg skewing. *Clin Cancer Res* 2008;14:3254–61.
- Martin-Orozco N, Muranski P, Chung Y, et al. T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. *Immunity* 2009;31:787–98.
- Muranski P, Boni A, Antony PA, et al. Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood* 2008;112:362–73.
- Kryczek I, Wei S, Szeliga W, et al. Endogenous IL-17 contributes to reduced tumor growth and metastasis. *Blood* 2009;114:357–9.
- Murugaiyan G, Saha B. Protumor vs antitumor functions of IL-17. *J Immunol* 2009;183:4169–75.
- Zhang JP, Yan J, Xu J, et al. Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *J Hepatol* 2009;50:980–9.
- Ji Y, Zhang W. Th17 cells: positive or negative role in tumor? *Cancer Immunol Immunother* 2010;59:979–87.
- Rasmussen R. Quantification on the LightCycler. In: Meuer S, Wittwer C, Nagawara K, eds. Rapid Cycle real-time PCR, methods and application. Heidelberg: Springer Press, 2001. 21–34.
- Wieczorek G, Asemussen A, Model F, et al. Quantitative DNA methylation analysis of FOXP3 as a new method for counting regulatory T cells in peripheral blood and solid tissue. *Cancer Res* 2009;69:599–608.
- de Vries IJ, Castelli C, Huygens C, et al. Frequency of circulating Tregs with demethylated FOXP3 intron 1 in melanoma patients receiving tumor vaccines and potentially Treg-depleting agents. *Clin Cancer Res* 2011;17:841–8.
- Faget J, Biota C, Bachelot T, et al. Early detection of tumor cells by innate immune cells leads to T(reg) recruitment through CCL22 production by tumor cells. *Cancer Res* 2011;71:6143–52.
- Visintin I, Feng Z, Longton G, et al. Diagnostic markers for early detection of ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:1065–72.
- Howlander N, Noone AM, Krapcho M, et al, eds. SEER Cancer Statistics Review, 1975–2008. Bethesda, MD: National Cancer Institute, 2011.
- Korn T, Bettelli E, Gao W, et al. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* 2007;448:484–7.
- Lin Y, Ritchea S, Logar A, et al. Interleukin-17 is required for T helper 1 cell immunity and host resistance to the intracellular pathogen *Francisella tularensis*. *Immunity* 2009;31:799–810.
- Lohr J, Knoechel B, Caretto D, et al. Balance of Th1 and Th17 effector and peripheral regulatory T cells. *Microbes Infect* 2009;11:589–93.
- Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, et al. Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* 2007;8:942–9.
- Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 2007;8:950–7.
- Kesselring R, Thiel A, Pries R, et al. Human Th17 cells can be induced through head and neck cancer and have a functional impact on HNSCC development. *Br J Cancer* 2010;103:1245–54.
- Gobert M, Treilleux I, Bendriss-Vermare N, et al. Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res* 2009;69:2000–9.
- Polansky JK, Kretschmer K, Freyer J, et al. DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *Eur J Immunol* 2008;38:1654–63.
- Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, et al. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol* 2010;184:3433–41.
- Akimova T, Beier UH, Wang L, et al. Helios expression is a marker of T cell activation and proliferation. *PLoS One* 2011;6:e24226.

5.3 K-ras mutace a nádory infiltrující lymfocyty u karcinomu kolon, současnost a výhledy

Tato práce představuje zkrácenou českou verzi původního článku otištěného v recenzovaném zahraničním tisku s impakt faktorem. Pro důležitá zjištění použitelná i v každodenní klinické praxi byl článek zpřístupněn českým chirurgům uvedením publikace v českém jazyce v Chirurgických rozhledech. Cílem této práce bylo stanovení mutace v onkogenu K-ras a analýza imunitních buněk infiltrujících nádorovou tkáň u pacientů s kolorektálním karcinomem ve vztahu k relapsu onemocnění. Do retrospektivní studie bylo zařazeno 44 pacientů s kolorektálním karcinomem, kteří podstoupili radikální chirurgický výkon v období 2004–2009. Primárně byli vybráni pacienti s recidivou onemocnění (n=16) a soubor byl doplněn o pacienty ze stejného období bez recidivy. V parafinových řezech karcinomu byly stanoveny mutace v onkogenu K-ras a provedena imunofluorescenční analýza imunitních buněk infiltrujících nádorovou tkáň (CD3, CD8, FoxP3, CD1a, DC-LAMP). Všichni pacienti podstoupili radikální chirurgický výkon (R0 resekce). Mutace v onkogenu K-ras byla prokázána u 45,5 % (n=20) karcinomů: 65 % v kodonu 12 a 35 % v kodonu 13. Přestože mutace v onkogenu K-ras v kodonu 13 byla asociována s relapsem onemocnění, vyskytovala se i ve skupině pacientů v remisi. Zásadní rozdíly byly ale prokázány mezi oběma skupinami pacientů ve složení imunitních infiltrátů. Ve skupině pacientů s relapsem onemocnění byl prokázán trend ke klesajícímu množství tumor-infiltrujících lymfocytů a pouze malé množství zralých dendritických buněk (DC-LAMP+) a naopak velké množství nezralých dendritických buněk (CD1a+) v porovnání se skupinou pacientů v remisi. Pacienti s mutantní formou kodonu 13, nízkou denzitou TILs a vysokým poměrem CD1a+/DC-LAMP+ buněk v nádorové tkáni mají vysoké riziko rekurence onemocnění. Vzhledem ke skutečnosti, že tito pacienti jsou rezistentní na léčbu inhibitory EGFR, a tudíž vystaveni vyššímu riziku úmrtí na nádorové onemocnění, měli by být po radikálním chirurgickém výkonu indikováni k adjuvantní onkologické léčbě a pečlivému follow-up.

K-ras mutace a nádory infiltrující lymfocyty u karcinomu kolon, současnost a výhledy

P. Kocián¹, M. Šedivcová³, J. Drgáč⁴, K. Černá³, J. Hoch¹, R. Kodet⁴, J. Bartůňková², R. Špišek², A. Fialová²

¹ Chirurgická klinika 2. LF UK a FN v Motole

² Ústav imunologie 2. LF UK a FN v Motole

³ Ústav patologie LF Plzeň

⁴ Ústav patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN v Motole

Práce byla věnována prof. MUDr. Jiřímu Hochovi, CSc. při příležitosti jeho významného životního jubilea.

Souhrn

Úvod: Prognóza kolorektálního karcinomu v současné době vychází z TNM klasifikace, která je zároveň určujícím kritériem pro indikaci adjuvantní onkologické léčby. Aktuálním tématem je hledání nových prognostických a prediktivních biomarkerů, které povedou k selekci rizikových pacientů a racionalizaci adjuvantní onkologické léčby. Vedle řady molekulárních biomarkerů je jednou z možností analýza lymfocytů infiltrujících nádory. Cílem studie je stanovení mutace K-ras a analýza imunitních buněk infiltrujících nádorovou tkáň u pacientů s karcinomem kolon ve vztahu k recidivě onemocnění.

Materiál a metodika: Do retrospektivní studie bylo zařazeno 44 pacientů s karcinomem kolon, kteří podstoupili radikální chirurgický výkon (R0 resekce) v období 2004–2009. V parafinových řezech karcinomu kolon byly stanoveny mutace K-ras a provedena imunofluorescenční analýza imunitních buněk infiltrujících nádorovou tkáň (CD3, CD8, FoxP3, CD1a, DC-LAMP).

Výsledky: Všichni pacienti s karcinomem kolon (n=44) podstoupili radikální chirurgický výkon (R0 resekce). U 16 pacientů došlo k recidivě onemocnění (36,4 %). Mutace K-ras byla prokázána u 45,5 % (n=20) karcinomů: 65 % v kodonu 12 a 35 % v kodonu 13. Přestože mutace K-ras v kodonu 13 byla frekventní zejména mezi pacienty s recidivou onemocnění, vyskytovala se i ve skupině pacientů v remisi. Při podrobnější analýze pacientů s mutantní formou kodonu 13 byly nicméně mezi pacienty s recidivou onemocnění a pacienty v remisi zjištěny zásadní rozdíly v zastoupení imunitních buněk infiltrujících nádorovou tkáň. Byl prokázán trend ke klesajícímu množství lymfocytů infiltrujících nádory ve skupině pacientů s recidivou onemocnění. Navíc u pacientů s recidivou onemocnění bylo v nádorové tkáni detekováno pouze malé množství zralých dendritických buněk (DC-LAMP+) a naopak velké množství nezralých dendritických buněk (CD1a+) v porovnání se skupinou pacientů v remisi.

Závěr: Pacienti s mutantní formou kodonu 13, nízkou denzitou lymfocytů infiltrujících nádory a vysokým poměrem CD1a+/DC-LAMP+ buněk v nádorové tkáni mají vysoké riziko rekurence onemocnění.

Klíčová slova: kolorektální karcinom – K-ras – lymfocyty infiltrující nádory

Summary

Kocián P, Šedivcová M, Drgáč J, Černá K, Hoch J, Kodet R, Bartůňková J, Špišek R, Fialová A.

K-ras mutational status and tumour-infiltrating lymphocytes in human colon cancer: state of the art and future perspectives

Introduction: Nowadays, the prognosis of newly diagnosed colorectal cancer patients relies mostly on the tumour-node-metastasis (TNM) classification which is also a determining criterion for the indication of adjuvant oncological treatment. Currently, new prognostic and predictive biomarkers are sought after in order to more precisely define prognosis and better predict the benefits of adjuvant treatment in colorectal cancer. Besides several molecular biomarkers, such as mutations in the proto-oncogene K-ras, analyses of tumour-infiltrating lymphocytes have shown promising prognostic value. The aim of the study is to examine the correlations between K-ras mutational status and tumour-infiltrating immune cells in colon cancer patients with respect to colon cancer recurrence.

Material and methods: Formalin-fixed paraffin-embedded specimens were obtained from 44 patients with surgically resected colon cancer (R0 resection) treated between 2004 and 2009. K-ras mutational status was detected using PCR amplification of exon 1 followed by direct sequencing and K-ras StripAssay. Tumour-infiltrating immune cells were detected by immunofluorescence staining using monoclonal antibodies against CD3, CD8, FoxP3, CD1a and DC-LAMP.

Results: All 44 patients in our cohort underwent radical resection of colon cancer. In 16 patients the tumour relapsed (36.4%). K-ras mutations were found in 45.5% (n=20) of the primary carcinomas: 65% in codon 12 and 35% in codon 13. Although codon 13 K-ras mutations were associated with disease relapse, they were present in both disease-free and relapsed patients. However, disease-free and relapsed patients differed markedly in their patterns of tumour-infiltrating immune cells. There was a trend towards decreased density of tumour-infiltrating lymphocytes within the group of relapsed patients. In addition, relapsed patients with codon 13 mutations had markedly lower levels of tumour-infiltrating mature DC-LAMP+ dendritic cells and higher frequency of CD1a+ cells compared to disease-free patients.

Conclusion: Colon cancer patients with low levels of tumour-infiltrating lymphocytes, a high CD1a+/DC-LAMP+ tumour-infiltrating DC ratio and a K-ras mutation in codon 13 are at a high risk of disease recurrence.

Keywords: colorectal cancer – K-ras – tumour-infiltrating lymphocytes

Rozhl Chir 2012;91:xxx-xxx

ÚVOD

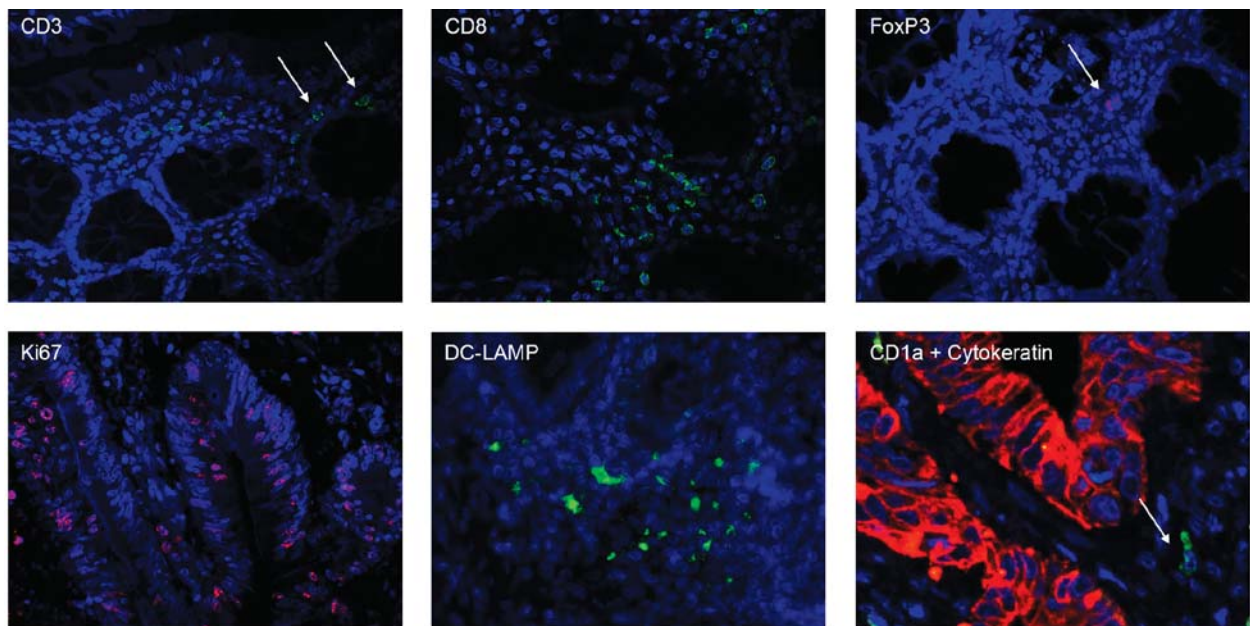
Kolorektální karcinom je civilizačním onemocněním s významným socioekonomickým dopadem. Prognóza kolorektálního karcinomu v současné době vychází z TNM klasifikace, která je zároveň určujícím kritériem pro indikaci adjuvantní onkologické léčby. Zatímco pacienti v klinickém stadiu III (přítomnost uzlinového postižení) po radikálním chirurgickém výkonu z adjuvantní chemoterapie jednoznačně profitují, role adjuvantní léčby v klinickém stadiu II zůstává stále diskutabilní [1–3]. Při rozhodování o indikaci adjuvantní léčby zůstává v dnešní době jedinou možností posouzení klinických a histopatologických rizikových faktorů (nádor velikosti T4, angioinvaze, lymfatická invaze, perineurální šíření, stanovení N0 na základě vyšetření menšího počtu lymfatických uzlin než 12, nízká diferenciacie nádoru G3-4, pozitivní resekcí okraje, obstrukce či perforace střeva jako první projev nádoru, zvýšená hladina onkomarkeru CEA). Aktuálním tématem je hledání nových prognostických a prediktivních biomarkerů, které povedou k selekci rizikových pacientů napříč oběma klinickými stadii a racionalizaci adjuvantní onkologické léčby. Jinými slovy na základě laboratorního vyšetření těchto biomarkerů předurčit, zda bude další onkologická léčba pro pacienta přínosná ve srovnání s pouhým sledováním po radikální chirurgické resekcí. V současné době jediným, rutinně používaným molekulárním biomarkerem je stav mutace K-ras. Tato mutace se vyskytuje přibližně u 30–50 % kolorektálních karcinomů [4–6] a ve více než 90 % případů je lokalizována v kodonu 12 a 13 [7]. Stanovení mutace K-ras je jednoznačným markerem absence léčebné odpovědi (non response) na léčbu inhibitory EGFR, tj. cetuximabem či panitumumabem (prediktivní biomarker)[8–10]. Naopak prognostický význam mutace K-ras zůstává stále kontroverzní. [11–13] Vedle řady molekulárních biomarkerů je jednou z možností analýza lymfocytů infiltrujících nádory (TILs). Existují důkazy pro to, že imunitní systém je schopen kontrolovat růst nádorových buněk, a to zejména v raných stadiích karcinogeneze. V boji proti nádorovým buňkám používá imunitní systém obě hlavní složky – systém přirozené imunity i systém imunity adaptivní (specifické T a B lymfocyty). Spojkou mezi oběma systémy jsou buňky dendritické, které hrají klíčovou roli v procesu zahájení plnohodnotné imunitní reakce. Nedávno publikovaná data získaná od pacientů s kolorektálním karcinomem prokazují, že přítomnost TILs je asociovaná s příznivou prognózou onemocnění [14–18]. Cílem této práce je stanovení mutace K-ras a analýza imunitních buněk infiltrujících nádorovou tkáň (včetně dendritických buněk) u pacientů s karcinomem kolon (zejména klinické stadium II a III) ve vztahu k relapsu onemocnění.

MATERIÁL A METODIKA

Do retrospektivní studie bylo zařazeno 44 pacientů s karcinomem kolon, kteří podstoupili radikální chirurgický výkon (R0 resekce) na Chirurgické klinice 2. LF UK a FN v Motole v období 2004–2009 (Tab. 1). Primárně byli vybráni pacienti s recidivou onemocnění a soubor byl doplněn o pacienty ze stejného období bez recidivy. Žádný pacient neabsolvoval neoadjuvantní onkologickou léčbu. Medián doby sledování byl 55 měsíců pro pacienty v remisi a 20 měsíců pro pacienty s recidivou onemocnění. V parafinových řezech karcinomu kolon byly vyšetřeny mutace K-ras pomocí PCR amplifikace exonu 1 následované přímým sekvenováním a K-ras StripAssay. Zastoupení jednotlivých subpopulací T lymfocytů a dendritických buněk, infiltrujících nádorovou tkáň, bylo identifikováno imunofluorescenčním značením parafinových řezů pomocí monoklonálních protilátek proti povrchovým a intracelulárním znakům (CD3, CD8, FoxP3, CD1a, DC-LAMP). Nádorové buňky byly

Tab. 1: Klinicko-patologická charakteristika pacientů
Tab. 1: Clinicopathological features of patients

	n	%
Pohlaví		
žena	19	43.2
muž	25	56.8
Lokalizace nádoru		
pravé kolon	14	31.8
levé kolon	8	18.2
sigmoideum	22	50.0
pT stadium		
pT1	0	0
pT2	4	9.1
pT3	34	77.3
pT4	6	13.7
pN stadium		
pN0	20	45.5
pN1	15	34.0
pN2	6	13.7
NX	3	6.8
Vzdálené metastázy (M)		
ne	42	95.5
ano	2	4.5
Grade		
1	7	15.9
2	28	63.6
3	9	20.5
K-ras mutace		
Wt	24	54.5
kodon 12	13	29.5
kodon 13	7	16.0
Recidiva		
ano	16	36.4
ne	28	63.6



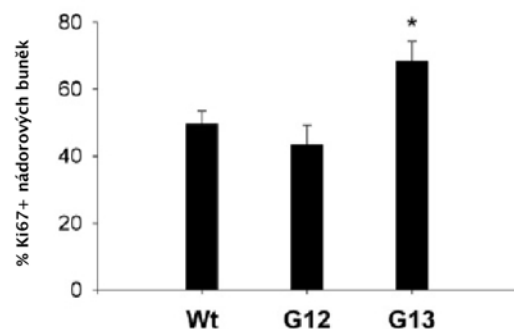
Obr. 1: Imunofluorescenční značení parafinových řezů
Fig. 1: Immunofluorescent staining of paraffin sections

charakterizovány pomocí protilátek proti cytokeratinu a proti proliferacionálnímu markeru Ki-67. Kvantitativní analýza imunitních buněk infiltrujících nádorovou tkáň (intraepiteliální a stromální lokalizace) byla provedena pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus FV300 (Obr. 1).

VÝSLEDKY

Všichni pacienti s karcinomem kolon (n=44) podstoupili radikální chirurgický výkon (R0 resekce). U dvou pacientů byla přítomna v době diagnózy solitární synchronní metastáza v játrech. V obou případech byla jaterní metastáza zresekována v jedné době s primárním karcinomem a bylo dosaženo R0 výkonu. U 16 pacientů došlo k recidivě onemocnění (36,4 %). Mutace K-ras byla prokázána u 45,5 % (n=20) karcinomů: 65 % v kodonu 12 a 35 % v kodonu 13. Karcinomy s mutantní formou kodonu 13 vykazovaly signifikantně vyšší proliferční aktivitu (vyšší poměr Ki67+ nádorových buněk) ve srovnání s karcinomy s mutantní formou kodonu 12 a wild-type karcinomy (bez mutace) (Graf 1). 57 % pacientů s mutantní formou kodonu 13 bylo asociováno s recidivou onemocnění ve srovnání pouze s 30,1 % a 33,3 % pacientů s mutantní formou kodonu 12 a wild type mutací (Graf 2). Přestože mutace K-ras v kodonu 13 byla frekventní zejména mezi pacienty s recidivou onemocnění, vyskytovala se i ve skupině pacientů v remisi. Při podrobnější analýze pacientů s mutantní formou kodonu 13 byly nicméně mezi pacienty s recidivou onemocnění a pacienty v remisi zjištěny zásadní rozdíly ve zastoupení imunitních buněk infiltrujících nádorovou tkáň. Byl pro-

kázán trend ke klesajícímu množství TILs ve skupině pacientů s recidivou onemocnění (Graf 3). Navíc u pacientů s recidivou onemocnění bylo v nádorové tkáni detekováno pouze malé množství zralých dendritických buněk (DC-LAMP+) a naopak velké množství nezralých dendritických buněk (CD1a+) v porovnání se skupinou pacientů v remisi. Pacienti s recidivou onemocnění měli signifikantně vyšší poměr nezralých/zralých dendritických buněk (CD1a+/DC-LAMP+ ratio) v nádorovém stromatu v porovnání s pacienty v remisi (Graf 4).

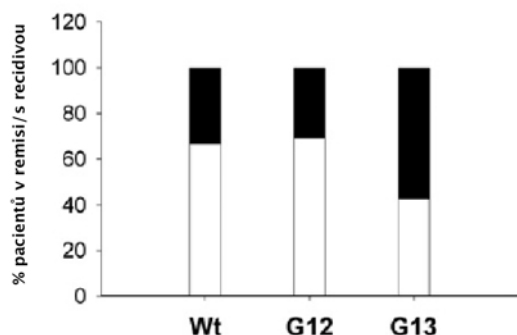


Graf 1: Zastoupení Ki67+ nádorových buněk ve vztahu k mutaci K-ras

Wt (wild-type), pacienti bez přítomnosti mutace n=24; G12, pacienti s mutací v kodonu 12 n=13; G13, pacienti s mutací v kodonu 13 n=7.

Graph 1: Proportions of Ki67+ tumour cells according to K-ras mutational status

Wild-type (Wt) patients, n=24; patients with a mutation in codon 12 (G12), n=13; patients with a mutation in codon 13 (G13), n=7.

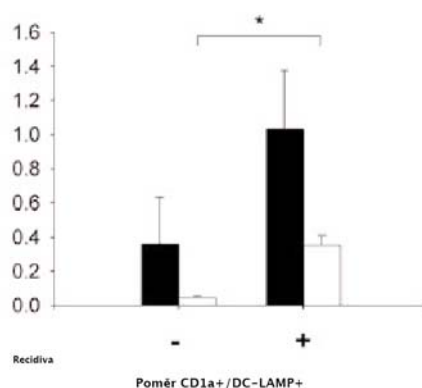


Graf 2: Poměr pacientů v remisi/s recidivou ve vztahu k mutaci K-ras

Wt (wild-type), pacienti bez přítomnosti mutace n=24; G12, pacienti s mutací v kodonu 12 n=13; G13, pacienti s mutací v kodonu 13 n=7. Bílé sloupce – pacienti v remisi, černé sloupce – pacienti s recidivou.

Graph 2: Proportions of disease-free versus relapsed patients according to K-ras mutational status

Wild-type (Wt) patients, n=24; patients with mutation in codon 12 (G12), n=13; patients with a mutation in codon 13 (G13), n=7. Columns represent the proportion of disease-free (white columns) or relapsed (black columns) patients classified according to K-ras mutational status.



Graf 4: Poměr nezralých/zralých dendritických buněk (CD1a+/DC-LAMP+) v nádorové tkáni u pacientů s recidivou a u pacientů v remisi s mutací v kodonu 13

(černé sloupce – nádorový epitel, bílé sloupce – nádorové stroma)

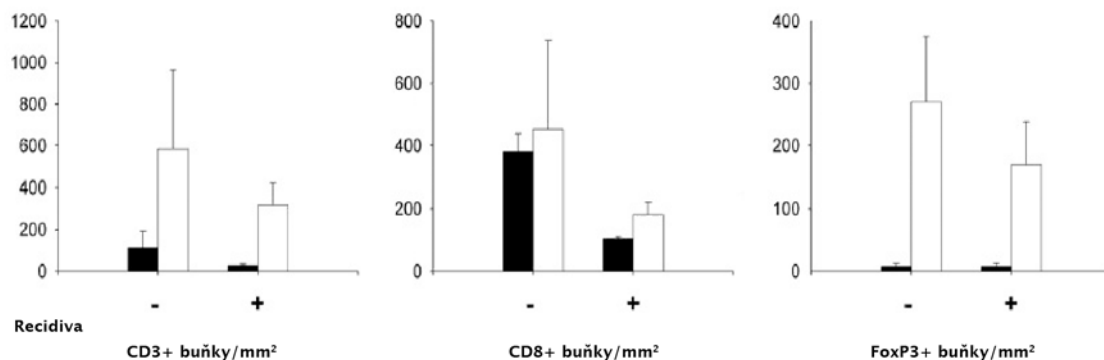
Graph 4: Ratio of CD1a+/DC-LAMP+ dendritic cells in patients with a codon 13 mutation of the K-ras gene with (relapse) and without (relapse) recurrence

(black columns – immune cells infiltrating the tumour epithelium; white columns – immune cells infiltrating the tumour stroma)

DISKUZE

V době biologické terapie již nelze spoléhat na klinické stadium podle TNM systému jako na jediný prostředek pro stratifikaci nemocných s kolorektálním karcinomem. Je to právě biologická léčba, která vyvolává naléhavou potřebu nových prediktivních a prognostických biomarkerů, které povedou k dalšímu zdokonalování v oblasti optimalizace a individuální specifikace adjuvantní chemoterapie. U pacientů s kolorektálním karcinomem je za tímto účelem velmi intenzivně studována mutace K-ras. Panuje široká shoda, že právě aktivační

mutace K-ras na krátkém rameni chromozomu 12 v kodonu 12 a 13 patří mezi nejběžnější mutace u lidských maligních onemocnění. V případě kolorektálního karcinomu se mutace K-ras vyvíjí v časných fázích tumorigeneze, během progresu z adenomu na karcinom [19–21]. Výskyt K-ras mutace u kolorektálního karcinomu se pohybuje mezi 30–50 %. V naší kohortě pacientů s karcinomem kolon byla prokázána mutace K-ras v 45,5 % případech: 65 % v kodonu 12 a 35 % v kodonu 13, tedy v souladu s literárně udávanými daty [4–7]. Vzhledem k významu K-ras v rámci signální kaskády receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR) je stanovení mutace K-ras jednoznačným prediktivním markerem absence lé-



Graf 3: Rozdíly v zastoupení imunitních buněk infiltrujících nádorovou tkáň mezi pacienty s recidivou a pacienty v remisi s mutací v kodonu 13

(černé sloupce – nádorový epitel, bílé sloupce – nádorové stroma)

Graph 3: Differences between patients with a codon 13 mutation of the K-ras gene with (relapse) and without (relapse) recurrence

(black columns – immune cells infiltrating the tumour epithelium; white columns – immune cells infiltrating the tumour stroma)

čebně odpovědi (no response) na léčbu inhibitory EGFR, tj. cetuximabem či panitumumabem [8–10]. Přítomnost mutace K-ras vede k rezistenci nádoru vůči působení monoklonálních protilátek namířených proti EGFR, a tedy pouze pacienti s nemutovaným K-ras (wild-type K-ras) jsou vhodní pro tento druh terapie a lze u nich očekávat pozitivní terapeutickou odpověď (prediktivní marker). Naopak prognostický význam mutace K-ras zůstává stále kontroverzní [11–13]. Bazan et al. v prospektivní studii publikovali horší parametry přežití u pacientů s kolorektálním karcinomem s mutantní formou kodonu 13, zatímco pacienti s mutantní formou kodonu 12 byli asociováni s mucinózním typem karcinomu [4]. Obdobně v naší studii pacienti s karcinomem kolon s mutantní formou kodonu 13 byli asociováni s recidivou onemocnění a jejich karcinomy vykazovaly signifikantně vyšší proliferativní aktivitu (vyšší poměr Ki67+ nádorových buněk) ve srovnání s karcinomy s mutantní formou kodonu 12 a wild type karcinomy. Mezi pacienty s mutantní formou kodonu 13 byly dále prokázány zásadní rozdíly v zastoupení imunitních buněk infiltrujících nádorovou tkáň. U pacientů s recidivou onemocnění bylo v nádorové tkáni (epitel, stroma) zastíženo pouze malé množství lymfocytů (TILs) a signifikantně vyšší poměr CD1a+/DC-LAMP+ buněk (nezralé/zralé dendritické buňky) ve srovnání s pacienty v remisi. Tyto výsledky podporují teorii protinádorového imunitního dohledu – podle něhož imunitní systém kontinuálně rozpoznává a odstraňuje maligní buňky v době jejich vzniku [22]. Nedávno publikovaná data získaná od pacientů s kolorektálním karcinomem prokazují, že právě přítomnost efektorových T lymfocytů v nádorové tkáni je asociována s příznivou prognózou onemocnění [14–18]. Naopak prognostický význam dendritických buněk infiltrujících nádorovou tkáň není stále objasněn [23]. Dendritické buňky patří mezi neúčinnější antigen prezentující buňky, které hrají klíčovou roli v procesu zahájení plnohodnotné imunitní reakce. V organismu se vyskytují ve dvou vývojových stádiích – jako zralé a nezralé dendritické buňky. Zralé dendritické buňky jsou jediné, které dokážou aktivovat naivní T lymfocyty a tím zahájit primární specifickou imunitní odpověď, naopak v nezralém stavu se podílejí na indukci regulačních T lymfocytů, které specificky potlačují imunitní odpověď proti vlastním tkáňím [24]. V souladu s výše uvedeným korelují výsledky i naší studie, u pacientů s recidivou onemocnění bylo v nádorové tkáni prokázáno malé množství zralých dendritických buněk (DC-LAMP+) a velké množství nezralých dendritických buněk (CD1a+) ve srovnání s pacienty v remisi. Pacienti s mutantní formou kodonu 13, nízkou densitou lymfocytů (TILs) a vysokým poměrem CD1a+/DC-LAMP+ buněk v nádorové tkáni mají vysoké riziko recurence onemocnění. Tito pacienti jsou vzhledem k přítomnosti K-ras mutace navíc rezistentní na léčbu inhibitory EGFR, a tudíž vystaveni vyššímu riziku úmrtí na nádorové onemocnění. Kombinací molekulárních biomarkerů s analýzou imunitních buněk in-

filtrujících nádorovou tkáň lze získat slibný prognostický faktor, pomocí kterého bude možné identifikovat rizikové pacienty s karcinomem kolon a racionalizovat adjuvantní onkologickou léčbu. S cílem porovnat infiltráty imunitních buněk u pacientů v remisi a s recidivou onemocnění, byli do souboru primárně vybráni pacienti s recidivou onemocnění (36,4 %) a soubor byl doplněn o pacienty ze stejného období bez recidivy. Pro statistiku bylo potřebné získání podobného počtu pacientů s recidivou a bez recidivy onemocnění.

ZÁVĚR

Pacienti s mutantní formou kodonu 13, nízkou densitou lymfocytů (TILs) a vysokým poměrem CD1a+/DC-LAMP+ buněk v nádorové tkáni mají vysoké riziko recurence onemocnění. Vzhledem ke skutečnosti, že tyto pacienti jsou rezistentní na léčbu inhibitory EGFR, a tudíž vystaveni vyššímu riziku úmrtí na nádorové onemocnění, měli by být po radikálním chirurgickém výkonu indikováni k adjuvantní onkologické léčbě a pečlivému follow-up.

Seznam zkratk:

CEA – carcinoembryonic antigen
EGFR – epidermal growth factor receptor
K-ras – Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
PCR – polymerase chain reaction
TILs – tumor infiltrating lymphocytes
TNM – tumor node metastasis

LITERATURA

1. Chau I, Cunningham D. Adjuvant therapy in colon cancer– what, when and how? *Ann Oncol* 2006;17(9):1347–59.
2. Chung KY, Saltz LB. Adjuvant therapy of colon cancer: current status and future directions. *Cancer J* 2007;13(3):192–7.
3. Van Cutsem E, Oliveira J. Primary colon cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, adjuvant treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2009;20 Suppl4:49–50.
4. Bazan V et al. Specific codon 13 K-ras mutations are predictive of clinical outcome in colorectal cancer patients, whereas codon 12 K-ras mutations are associated with mucinous histotype. *Ann Oncol* 2002;13(9):1438–46.
5. Bos JL et al. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 1987;327(6120):293–7.
6. Boughdady IS et al. K-ras gene mutations in adenomas and carcinomas of the colon. *Surg Oncol* 1992;1(4):275–82.
7. Benvenuti S et al. Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. *Cancer Res* 2007;67(6):2643–8.
8. De Roock W et al. KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Ann Oncol* 2008;19(3):508–15.
9. Di Fiore F et al. Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by Cetuximab plus chemotherapy. *Br J Cancer* 2007;96(8):1166–9.
10. Lieve A et al. KRAS mutations as an independent prognostic

- factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 2008;26(3):374–9.
11. Andersen SN et al. K-ras mutations and prognosis in large-bowel carcinomas. *Scand J Gastroenterol* 1997;32(1):62–9.
 12. Ince WL et al. Association of k-ras, b-raf, and p53 status with the treatment effect of bevacizumab. *J Natl Cancer Inst* 2005;97(13):981–9.
 13. Tortola S et al. p53 and K-ras gene mutations correlate with tumor aggressiveness but are not of routine prognostic value in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1999;17(5):1375–81.
 14. Galon J et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006;313(5795):1960–4.
 15. Chiba T et al. Intraepithelial CD8+ T-cell-count becomes a prognostic factor after a longer follow-up period in human colorectal carcinoma: possible association with suppression of micrometastasis. *Br J Cancer* 2004;91(9):1711–7.
 16. Naito Y et al. CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;58(16):3491–4.
 17. Ohtani H. Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human colorectal cancer. *Cancer Immun* 2007;7:4.
 18. Ropponen KM et al. Prognostic value of tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) in colorectal cancer. *J Pathol* 1997;182(3):318–24.
 19. Forrester K et al. Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis. *Nature* 1987;327(6120):298–303.
 20. Pretlow TP et al. K-ras mutations in putative preneoplastic lesions in human colon. *J Natl Cancer Inst* 1993;85(24):2004–7.
 21. Vogelstein B et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988;319(9):525–32.
 22. Dunn GP et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002;3(11):991–8.
 23. Dadabayev AR et al. Dendritic cells in colorectal cancer correlate with other tumor-infiltrating immune cells. *Cancer Immunol Immunother* 2004;53(11):978–86.
 24. Dhodapkar MV et al. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med* 2001;193(2):233–8.

*MUDr. Petr Kocián
U Dívčích hradů 3289/22
150 00 Praha 5, Smíchov
e-mail: kocian.cz@gmail.com*

5.4 Imunitní systém a kontrola nádorového bujení: Mechanismy zahájení imunitní odpovědi a role imunitního systému v obraně proti nádorům

V této práci jsou shrnuty recentní poznatky o mechanismech zahájení imunitní odpovědi. Dále byly shrnuty důkazy o tom, že imunitní systém je schopen kontrolovat a regulovat růst nádorových buněk, zejména v raných stádiích karcinogeneze. Výsledky ze studií na lidských modelech také potvrzují, že imunitní systém účinně potlačuje nádorové onemocnění v časných fázích, ve stádiu preneoplázie, a při úniku nádorových buněk imunitnímu dohledu je již imunitní reakce méně účinná. Tyto nálezy podporují ideu, že pokusy o aplikaci protinádorové imunoterapie v praxi mají největší naději na úspěch, jestliže bude imunoterapie aplikována v časných fázích onemocnění, nejlépe ve stádiu preneoplázie. Lze dokonce uvažovat o protinádorové imunoterapii u pacientů s vysokým rizikem vzniku nádoru dokonce ještě před rozvojem onemocnění - jako imunoprevence. Očkování proti virům, které způsobují nádorová onemocnění, jasně ukazuje, že imunoprevence může vést k zásadnímu snížení počtu nádorových onemocnění.

Imunitní systém a kontrola nádorového bujení

Mechanismy zahájení imunitní odpovědi a role imunitního systému v obraně proti nádorům

¹Doc. MUDr. Radek Špišek, Ph.D., ^{1,2}MUDr. Petr Kocián, ¹RNDr. Daniela Rožková, Ph.D.

¹Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta a Fakultní nemocnice Motol, Ústav imunologie

²Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta a Fakultní nemocnice Motol, chirurgická klinika

Souhrn

V této práci jsou shrnuty recentní poznatky o mechanismech zahájení imunitní odpovědi. Dále diskutujeme důkazy o tom, že imunitní systém je schopen kontrolovat a regulovat růst nádorových buněk, zejména v raných stadiích karcinogeneze. Výsledky ze studií na lidských modelech také potvrzují, že imunitní systém účinně potlačuje nádorové onemocnění v časných fázích, ve stadiu preneoplazie, a při úniku nádorových buněk imunitnímu dohledu je již imunitní reakce méně účinná. Tyto nálezy podporují ideu, že pokusy o aplikaci protinádorové imunoterapie v praxi mají největší naději na úspěch, jestliže bude imunoterapie aplikována v časných fázích onemocnění, nejlépe ve stadiu preneoplazie. Lze dokonce uvažovat o protinádorové imunoterapii u pacientů s vysokým rizikem vzniku nádoru dokonce ještě před rozvojem onemocnění – jako imunoprevenci. Očkování proti virům, které způsobují nádorová onemocnění, jasně ukazuje, že imunoprevence může vést k zásadnímu snížení počtu nádorových onemocnění.

Summary

In this review, we first summarize current knowledge about the initiation of the immune response. We then discuss recent findings on the role of immune system in protection from cancer. We discuss the current understanding of the interactions between tumours and cells of the immune system particularly at the early stages of carcinogenesis. A growing body of data suggests that these interactions help sculpt the eventual development of tumours. Recent data from human and mice studies clearly show that the immune system is capable of detecting and eliminating the smallest expansions of transformed cells, well before the development of clinical cancer. These advances suggest a need to change the current emphasis for harnessing anti-tumor immunity from therapy of advanced disease to the immunotherapy of early lesions preferably even to the prevention of cancers.

Klíčová slova

**nádorové onemocnění • imunitní systém • imunoterapie
• imunitní dohled proti nádorům**

Key words

**tumours • immune system • immunotherapy
• immune control of tumours**

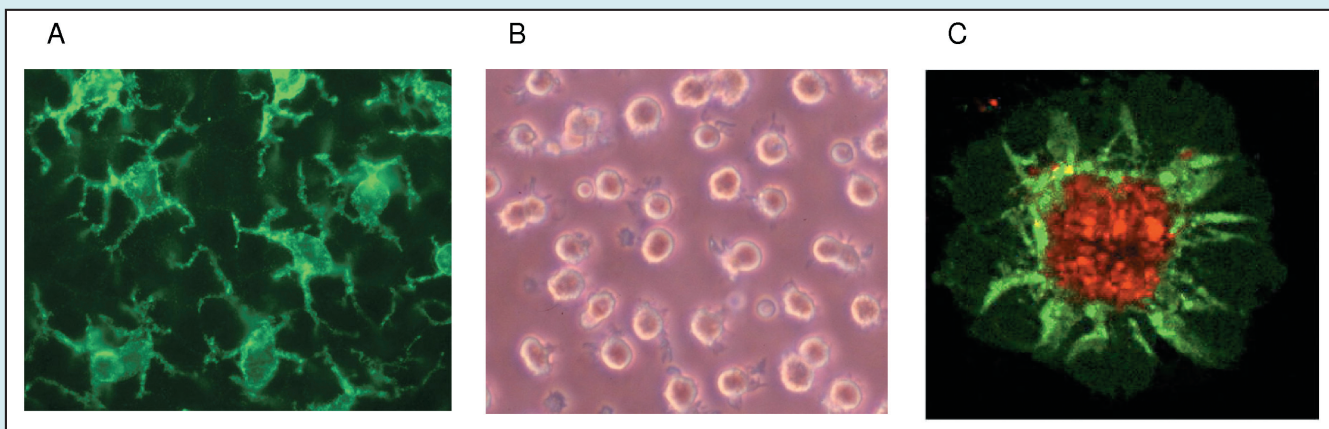
Úvod do problematiky

Hlavním úkolem imunitního systému je obrana proti infekcím. Infekce byly v historii lidstva až do objevu účinných antimikrobiálních léků nejčastější příčinou smrti. Obratlovci mají pro účinnou obranu proti infekcím k dispozici dvě hlavní složky imunitního systému – systém přirozené (nespecifické) imunity a systém imunity adaptivní (specifické).

Složky nespecifické imunity, ať již buněčné (makrofágy, NK buňky, granulocyty), nebo humorální (komplement, antimikrobiální peptidy, cytokiny) jsou schopny rychlé detekce přítomnosti patogenu v organismu. Obranná reakce je v případě nespecifické imunity velmi rychlá, uniformní a často vede k úplné eliminaci patogenního agens bez nutnosti zapojení specifické imunity. Důležitost přirozené imunitní reakce v obraně organismu proti infekcím je podložena studiem vrozených defektů imunity u lidí i na myších modelech.⁽¹⁾ Při poruše funkce některých složek vrozené imunity je značně zvýšena náchylnost organismu k infekcím, a to i tehdy, jsou-li složky specifické imunity plně funkční. Nespecifická imunita ovšem nemá mechanismy, které by zabezpečily vznik imunologické paměti.

Klíčovým mechanismem pro funkci specifické imunity je proces vzniku antigen-specifických receptorů na B a T lymfocytech. Výsledkem náhodného přeskupování genových segmentů u genů pro T a B buněčné receptory (TCR a BCR) je existence obrovského množství receptorů s přesně definovanou specifitou, což vede k faktu, že téměř pro každý antigen existuje v organismu specifický lymfocyt. Daní za tuto velkou zásobárnu antigen-specifických lymfocytů ovšem je, že lymfocytů pro jeden určitý antigen je velmi malé množství. Frekvence lymfocytů pro určitý antigen se nejčastěji pohybuje kolem 1–2krát 10^{-5} . Tak malý počet buněk specifických pro antigen je pro časnou obranu proti infekcím nepoužitelný. Pro aktivaci specifického lymfocytu musí nejprve dojít ke klonální expanzi a teprve po vytvoření dostatečné populace efektorových buněk dojde k rozvoji primární specifické imunitní reakce. Tento proces většinou trvá 4–7 dní a po tuto dobu je tedy potřeba, aby obranu zajistila nespecifická imunita. Při opakovaném setkání se stejným patogenem je již situace odlišná. V organismu jsou již vytvořeny paměťové T a B lymfocyty a sekundární imunitní odpověď je mnohem rychlejší.

Kromě toho, že rozvoj primární specifické imunitní odpovědi trvá dlouho, je ještě důležité zdůraznit, že samotná aktivace antigen specifických T lymfocytů je poměrně složitý proces, který je pod velmi přísnou kontrolou. Je to nezbytné proto, že aktivace nesprávných lymfocytů může mít fatální následky, např. v podobě autoimunitních onemocnění. Během vývoje T i B lymfocytů je řa-



Obr. 1 – Morfologie dendritických buněk. A. Fluorescenčně obarvené dendritické buňky v kůži. B. Morfologie *in vitro* připravených dendritických buněk. Obrázek ze světelného mikroskopu. C. Dendritická buňka označená protilátkou proti HLA II. třídy (zeleně), která pohltila apoptotické nádorové buňky (červeně).

da autoreaktivních buněk eliminována, ale přesto lze v periferní krvi detekovat významná množství T i B lymfocytů, které nesou receptory specifické pro autoantigeny. Tyto potenciálně nebezpečné buňky drží pod kontrolou několik mechanismů. Jde především o síť regulačních T lymfocytů, které lze identifikovat podle přítomnosti transkripčního faktoru FoxP3.⁽²⁾ Dalším klíčovým kontrolním mechanismem je fakt, že T lymfocytům pro aktivaci nestačí pouhá přítomnost antigenu. Pro účinnou aktivaci musí být antigen předkládán v lymfatických uzlinách antigen prezentujícími buňkami (APC), které na svém povrchu nesou fragmenty antigenů v komplexu s MHC molekulami I. a II. třídy v přítomnosti tzv. kostimulačních molekul. Nejúčinnějším představitelem APC jsou dendritické buňky, které jediné dokáží aktivovat naivní (panenské) T lymfocyty. V posledních 15 letech byla objasněna řada mechanismů, jež buňkám umožní rozpoznat přítomnost mikroba či jiného nebezpečí v periferních tkáních a zajistí, že je zmíněná informace přenesena do lymfatických uzlin, kde jsou poté stimulovány specifické T lymfocyty.

Dendritické buňky tedy plní roli jakéhosi prostředníka mezi systémy nespecifické a specifické imunity, bez kterého nedojde k rozvoji plnohodnotné imunitní reakce.⁽³⁾

Základní charakteristiky a životní cyklus dendritických buněk

Dendritické buňky mají mezi APC výsadní postavení, protože jediné mohou aktivovat naivní T lymfocyty, a tím zahájit primární specifickou imunitní odpověď. Dendritické buňky byly pojmenovány podle charakteristické morfologie s množstvím výběžků, dendritů.⁽⁴⁾ (Obr. 1) V periferní krvi cirkulují dendritické buňky také ve velmi malém množství. Zásadní zlom ve studiu dendritických buněk nastal v polovině 90. let, kdy byly publikovány protokoly, popisující kultivaci dendritických buněk z monocytů nebo kmenových hematopoetických buněk zdravých dárců za přítomnosti různých cytokinů, především GM-CSF (Granulocyte-Monocyte-Colony stimulating factor) a IL-4.

Dendritické buňky se diferencují z kmenových hematopoetických buněk v kostní dřeni, odkud jsou již jako nedělicí se buňky vyplavovány do krevního oběhu. Z krevního oběhu vstupují do tkání, kde se vyskytují především v takzvaném **nezralém stavu**. Nezralé dendritické buňky exprimují na svém povrchu velké množství molekul umožňujících pohlcování nejrůznějších antigenních částic (viry, bakterie, infikované, nádorové či odumřelé buňky). V tomto nezralém stavu mají na svém povrchu pouze malé množství MHC a kostimulačních molekul, které ne-

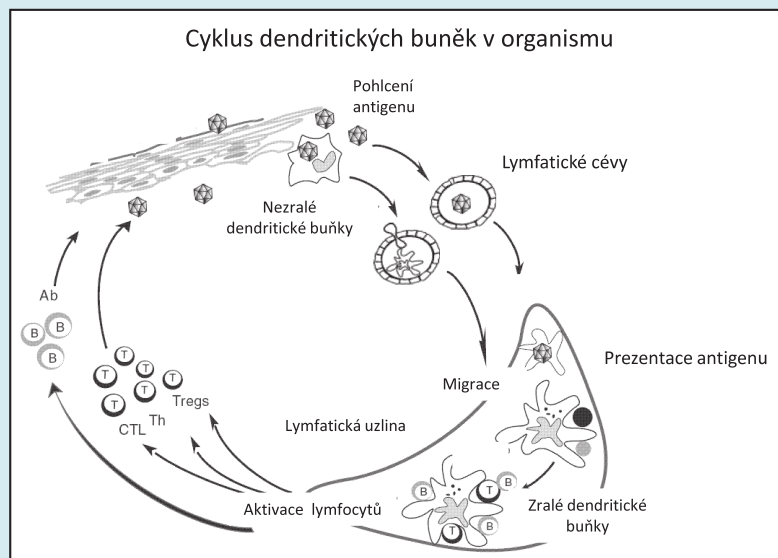
dostačuje k zahájení imunitní odpovědi. Navíc antigen specifické lymfocyty jsou lokalizovány v sekundárních lymfatických orgánech a pro jejich aktivaci je tedy nutné, aby se dendritické buňky prezentující antigen přesunuly z periferie např. do lymfatických uzlin.⁽⁵⁾

Proces, během kterého se z nezralé dendritické buňky stane profesionální APC, je nazýván **maturace** (zrání) dendritické buňky. Tento proces je zahájen poté co dendritická buňka pomocí specifických receptorů rozpozná hrozící nebezpečí, nejčastěji průnik infekčního agens do organismu. Proces maturace je charakterizován vymizením schopnosti fagocytovat antigeny. Dochází k výraznému zvýšení exprese MHC molekul I. a II. třídy, CD83 a kostimulačních molekul CD80, CD86. Na povrchu dendritických buněk se objevuje molekula CCR7, která je receptorem pro chemokin MIP-3 β , který se vyskytuje v lymfatických uzlinách. Zrající aktivovaná dendritická buňka migruje do lymfatických uzlin, kde účinně předkládá antigeny na svém povrchu T lymfocytům, aktivuje je a zahajuje imunitní reakci, která v optimálním případě vede k eliminaci patogenu (Obr. 2).

Subpopulace dendritických buněk

Stejně jako v případě lymfocytů, i mezi dendritickými buňkami lze rozlišit řadu subpopulací. Situace je poněkud odlišná u myši a v lidském organismu. U obou druhů lze nicméně odlišit funkčně i morfologicky dva základní podtypy. **Plazmacytoidní dendritické buňky** byly pojmenovány podle morfologie připomínající plazmatické buňky. Lze je identifikovat podle exprese CD123 (receptoru pro IL-3) a jejich hlavní funkcí je rozpoznání virových infekcí a obrana proti nim. IL-3 je také důležitým růstovým faktorem plazmacytoidních dendritických buněk.⁽⁶⁾

Myeloidní dendritické buňky jsou druhou subpopulací a patří mezi ně také Langerhansovy buňky v epidermis. Jejich charakteristickým znakem je exprese CD11c a absence molekuly CD14, charakteristického markeru monocytů a makrofágů. Langerhansovy buňky se vyznačují expresí langerinu (CD207) a molekuly DEC-205 (CD205). Nejpočetnější populací myeloidních dendritických buněk jsou intersticiální dendritické buňky, které lze nalézt ve všech tkáních. Tyto buňky jsou nejvíce podobné dendritickým buňkám připraveným *in vitro* diferenciací z monocytů v přítomnosti GM-CSF a IL-4, a proto je o nich nejvíce informací. Jednotlivé subpopulace dendritických buněk mají různou výbavu pro rozpoznání patogenů a každá je tedy specializována v obraně proti různým infekcím.



Obr. 2 – Schematické znázornění životního cyklu dendritických buněk v organismu

Nezralé dendritické buňky

Pohlcování antigenů

Ve většině tkání se dendritické buňky vyskytují v tzv. nezralém stavu a na svém povrchu nemají molekuly nezbytné pro aktivaci T lymfocytů, jako např. CD40, CD54, CD80, CD86 a znaky typické pro zralé dendritické buňky. Jejich úkolem v tomto stadiu není účinná stimulace T lymfocytů. Důležitější je, aby byly schopny předat organismu informaci o skladbě vnitřního prostředí a aby včas upozornily na hrozící nebezpečí. Pro tento úkol jsou nadmíru dobře vybaveny.

Nezralé dendritické buňky jsou v organismu lokalizovány v periferních tkáních a na sliznicích, tedy v místech, kde je nebezpečí vstupu infekce. Lze je nalézt v kůži, faryngu, jícnu, sliznicích gastrointestinálního i respiračního ústrojí. Síť dendritických buněk zde funguje jako senzor pro případné nebezpečí. Nezralé dendritické buňky mají vysokou schopnost fagocytózy a kontinuálně monitorují okolní prostředí. Exprimují na svém povrchu velké množství receptorů umožňujících pohlcování nejružnějších antigenních částic (viry, bakterie, infikované, nádorové či odumřelé buňky).

Dendritické buňky velmi účinně pohlcují okolní antigeny několika různými procesy. Základním procesem je fagocytóza. Mohou také tvořit velké pinocytární vezikuly obsahující látky rozpuštěné v extracelulární tekutině. Pro řadu mikroobů exprimují dendritické buňky na svém povrchu receptory umožňující specifickou endocytózu. Do této skupiny receptorů patří především zástupci skupiny C-lektinů, které rozpoznávají sacharidové molekuly. Nejvíce studovanými C-lektiny jsou DEC-205 (CD205), manózoový receptor (CD206), DC-SIGN (CD209) a langerin (CD207). DC-SIGN je například receptorem pro HIV, virus dengue, cytomegalovirus, mykobakterie a kandidy.⁽⁷⁾

Dendritické buňky mohou také fagocytovat umírající a mrtvé buňky ve svém okolí, ať už jde o buňky nádorově transformované, infikované viry nebo buňky podléhající apoptóze během homeostatické obnovy tkání. Receptory specifické pro proces pohlcování apoptotických a nekrotických buněk nejsou ovšem dosud identifikovány. Dále mohou dendritické buňky pohlcovat komplexy antigen-protilátka pomocí aktivčních a inhibičních Fc receptorů, CD64 a CD32.

Zpracování a prezentace antigenů

Po pohlcení jsou antigeny zpracovávány a prezentovány klasickými cestami na MHC molekulách I. a II. třídy. Dendritické buňky ovšem disponují také specifickým mechanismem, který umožňuje zpracování exogenních antigenů a jejich prezentaci na molekulách MHC I. třídy. Tento proces je dnes nejčastěji označován jako zkřížená prezentace (cross-presentation), protože jde vlastně proti klasickým imunologickým dogmatům. Z terminologického hlediska je důležité dále zmínit, že termín cross-presentation neříká nic o konečném výsledku imunitní odpovědi. Pro rozlišení aktivace imunitní reakce nebo naopak jejího potlačení se užívají výrazy cross-priming a cross-tolerance.

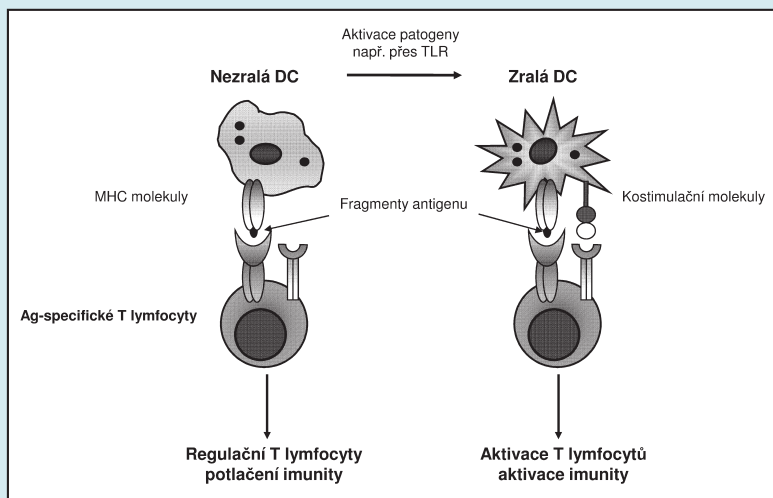
Role nezralých buněk v indukcii periferní tolerance

Nezralé dendritické buňky tedy neustále monitorují složení vnitřního prostředí a v nepřítomnosti aktivčních signálů nejsou schopny aktivovat imunitní odpověď. Nejsou ovšem inaktivní, jak by se mohlo zdát.

I v nepřítomnosti aktivčních signálů migruje určité množství nezralých dendritických buněk do lymfatických uzlin a prezentuje antigeny pocházející z vlastních tkání. Tím se účastní na indukcii regulačních T lymfocytů, které specificky potlačují imunitní odpověď proti vlastním tkáním.⁽⁸⁾ Tento proces je zodpovědný za mechanismus periferní tolerance. V kombinaci s mechanismem centrální tolerance, tj. eliminací většiny autoreaktivních T a B lymfocytů v thymu a v kostní dřeni, brání regulační T lymfocyty rozvoji autoimunitních reakcí. V případě, že nezralé dendritické buňky prezentují antigeny pocházející z patogenů, dochází rovněž k anergizaci T lymfocytů specifických pro prezentovaný antigen a indukcii regulačních T lymfocytů (Obr. 3). Například bylo prokázáno snížení frekvence T lymfocytů specifických proti viru chřipky po injekci nezralých dendritických buněk prezentujících antigeny pocházející z chřipkového viru. Tento mechanismus je zřejmě důležitý při kontrole aktivovaných T lymfocytů poté, co byla eliminována infekce a další aktivace imunitního systému je nežádoucí. Nezralé dendritické buňky nelze tedy vnímat jako pouhé pasivní fagocyty, ale jako buňky, které mají velmi důležitou funkci v regulaci homeostázy imunitního systému.

Aktivace dendritických buněk, proces maturace

V nezralém stavu dendritická buňka vystavuje na svém povrchu celý soubor antigenů poskytující reprezentativní vzorek látek přítomných v jejím okolí. Pro efektivní aktivaci T lymfocytů její výbava ovšem nedostačuje. Tento mechanismus je pro organismus velmi důležitý. Kdyby totiž docházelo ke stimulaci imunitní reakce i za klidového stavu, značně by se zvýšilo riziko vzniku autoreaktivních klonů T i B lymfocytů a z toho pramenící nebezpečí vzniku autoimunitních onemocnění. Jiná situace ovšem nastává, je-li organismus konfrontován se situací, která narušuje jeho integritu či která je nebezpečná pro jeho další vývoj. Nebezpečí může být reprezentováno řadou situací a pro každou z nich mají dendritické buňky rozpoznávací mechanismy. Rozpoznání signálů nebezpečí vede k aktivaci dendritických buněk, která se projeví celou řadou fenotypických a funkčních změn. Soubor těchto změn je označován jako maturace a vede ke vzniku dendritických buněk vybavených k aktivaci antigen specifických T lymfocytů.⁽⁹⁾



Obr. 3 – Vliv stadia aktivace dendritických buněk na výsledek imunitní odpovědi

Signály spouštějící maturaci

Signály, které vedou k aktivaci dendritických buněk, lze rozdělit do následujících skupin:

- Mikrobiální produkty – aktivace přes Toll-like receptory, NOD, RIG-I, Mda5 receptory
- Signály zprostředkované aktivovanými T lymfocyty a cytokiny – aktivace molekulou CD40L a cytokinovými receptory
- Imunokomplexy – rozpoznání Fc fragmentu protilátkové molekuly pomocí aktivačních Fc receptorů
- Endogenní signály – proteiny teplotního šoku, kyselina močová, histamin, defenziny, ATP

Každý z těchto zmíněných signálů spouští odlišný typ aktivace, ale základní mechanismy jsou všem skupinám společné. Nejúčinnějšími aktivátory jsou struktury pocházející z patogenů, což souvisí s tím, že evolučně nejdůležitější funkcí imunitního systému je obrana proti infekcím.

Toll-like receptory

V 90. letech představil Ch. Janeway teorii, kde se zamýšlel nad způsobem, jakým by mohly antigen prezentující buňky pomocí omezeného počtu receptorů detekovat extrémně rozmanitou říši patogenních organismů. Definoval několik kritérií, která by takové receptory měly splňovat.

- Rozpoznávané struktury by měly být specifické pro mikroby.
- Receptory by měly rozpoznávat struktury (pathogen associated molecular patterns, PAMPs), které jsou sdílené velkou skupinou mikroorganismů, aby jeden receptor zabezpečil obranu před velkým množstvím infekcí.
- Rozpoznávané struktury by měly být nezbytné pro přežití mikroba, aby nedocházelo při selekčním tlaku k jejich mutacím.

Tyto receptory označil jako PRR (pattern recognition receptors) a v roce 1997 byl v jeho laboratoři identifikován první takový receptor. Šlo o první receptor ze skupiny **Toll-like receptorů** (TLR), dnes označený jako TLR-4. Tento objev byl absolutním přelomem v poznání způsobu, jakým dendritické buňky rozpoznávají pronikající patogen, jak je zahájena aktivace dendritických buněk a jakým způsobem je koordinována aktivace specifické imunitní odpovědi. TLR-4 specificky rozpoznává lipopolysacharid (LPS) a díky tomuto receptoru tedy dendritické buňky mohou rozpoznat všechny gramnegativní bakterie. V rychlém sledu bylo do dnešní doby u člověka popsáno deset TLR a pro většinu z nich jsou dnes známy rozpoznávané struktury (Tab. 1).

Toll-like receptory jsou membránové glykoproteiny typu I. Cytoplazmatická část je podobná cytoplazmatické části receptoru pro IL-1 a je označována jako TIR (Toll/IL-1R). Extracelulární část obsahuje tandemové kopie repetitivních bohatých na aminokyselinu leucin (tzv. leucin rich repeats, LRR). Tyto sekvence vytvářejí specifické struktury podkovitého tvaru, o kterých se předpokládá, že se přímo podílí na rozpoznávání a vazbě ligandů.

TLR dovolují dendritickým buňkám rozpoznat v podstatě jakoukoli infekci. Zajímavé také je, že exprese jednotlivých TLR vysvětluje specializaci podtypů dendritických buněk v obraně proti různým skupinám patogenů. Plazmacytoidní dendritické buňky například exprimují TLR-7 a TLR-9, které jsou aktivované po stimulaci virovými nukleovými kyselinami. Toto zjištění koreluje s experimentálním zjištěním, že plazmacytoidní dendritické buňky hrají roli v aktivaci protivirové imunitní odpovědi. Myeloidní dendritické

buňky exprimují zbylé TLR a zahajují imunitní odpověď proti virům, bakteriím, plísním i parazitům. Většina patogenů je navíc rozpoznávána více TLR, čímž je zajištěna lepší obrana proti infekci.

Buněčná lokalizace TLR také koreluje s charakterem jejich agonistů. TLR1, TLR2 a TLR4 jsou lokalizovány na buněčném povrchu a po aktivaci svými agonisty (většinou složkami povrchových struktur patogenů) se dostávají do fagozomů. Na druhé straně TLR3, TLR7, TLR9, které všechny rozpoznávají virové nukleové kyseliny, jsou lokalizovány v membránách intracelulárních kompartmentů, které fúzí s fagozomy. Tato lokalizace pravděpodobně omezuje aktivaci buněčnými nukleovými kyselinami a naopak usnadňuje přístup k ligandům patogenního původu.

Po identifikaci TLR byly postupně identifikovány další receptory, pomocí kterých dendritické buňky rozpoznávají patogeny, jako např. lektiny typu C, proteiny ze skupiny NOD a NALP.

Signály zprostředkované cytokiny

Byly zmíněny nejrůznější receptory, pomocí nichž dendritické buňky detekují přítomnost složek patogenů. Dendritické buňky mohou však rozpoznávat přítomnost „nebezpečí“ i nepřímo – detekcí prozánětlivých cytokinů (např. TNF, IL-1 β , IFN α a IFN β) produkovaných různými buňkami, makrofágy, NK buňkami, NKT buňkami, žírnými a endotelialními buňkami, které se v přítomnosti patogenu aktivovaly. Tímto způsobem je dále zvyšována aktivace dendritických buněk a mohou tak být aktivovány i buňky, které přímo nerozpoznaly patogen přes jejich PRR.

Je ovšem třeba zdůraznit, že dendritické buňky aktivované pouze zánětlivými mediátory bez přítomnosti TLR ligandu nejsou kompletně maturované, neboť T buňkám nejsou schopny poskytnout polarizační signál. Nejzřejmější je to v případě cytokinu IL-12 p70, který je hlavním diferenciačním faktorem Th₁ buněk, a bylo ukázáno, že jeho produkce může být vyvolána pouze PAMPs (ligandy TLR) a nikdy ne pouze působením zánětlivých cytokinů.⁽¹⁰⁾

Signály zprostředkované aktivovanými lymfocyty

Aktivované T lymfocyty exprimují molekulu CD40L a ta po vazbě na CD40 aktivuje dendritické buňky, včetně produkce IL-12p70.

Tab. 1 – Mikrobiální komponenty rozpoznávané Toll-like receptory

Mikrobiální komponenta	Druh patogenu	Receptor
Baktérie		
LPS	gramnegativní bakterie	TLR4
triacyl lipopeptidy	mykoplazmy	TLR6/TLR2
triacyl lipopeptidy	bakterie a mykobakterie	TLR1/TLR2
LTA	streptokoky skup. B	TLR6/TLR2
peptidoglykan	grampozitivní bakterie	TLR2
Poriny	<i>Neisseria</i>	TLR2
lipoarabinomanan	mycobakterie	TLR2
flagelin	bičikáté bakterie	TLR5
CpG-DNA	bakterie a mykobakterie	TLR9
ND	uropatogenní bakterie	TLR11
Plísně a houby		
zymosan	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	TLR6/TLR2
fosfolipomanan	<i>Candida albicans</i>	TLR2
Manan	<i>Candida albicans</i>	TLR4
glukuronoxylomanan	<i>Cryptococcus neoformans</i>	TLR2 and TLR4
Paraziti		
tGPI-mutin	<i>Trypanosoma</i>	TLR2
glykoinositolfosfolipidy	<i>Trypanosoma</i>	TLR4
Hemozoin	<i>Plasmodium</i>	TLR9
profilin-like molecule	<i>Toxoplasma gondii</i>	TLR11
Viry		
DNA	DNA-viry	TLR9
dsRNA	viry	TLR3
ssRNA	RNA viry	TLR7 and TLR8
proteiny obalu	RSV, MMTV	TLR4
hemaglutinin protein	Virus spalniček	TLR2
ND	HCMV, HSV1	TLR2
Hostitel		
Heat-shock proteiny 60, 70		TLR4
Fibrinogen		TLR4

ND = neurčeno

NK, NKT buňky a určité subpopulace $\gamma\delta$ T buněk, tedy populace tzv. „lymfocytů přirozené imunity“, mají rovněž potenciál vyvolat maturaci dendritických buněk, přestože přesný mechanismus aktivace není v tomto případě znám.

Endogenní signály

Důležitým a intenzivně řešeným problémem je otázka, zda-li mohou být dendritické buňky aktivovány i endogenními signály. To je velmi důležité například v případě indukce imunitní reakce proti nádorově transformovaným buňkám.

V literatuře bylo publikováno několik skupin molekul, které vedou k aktivaci dendritických buněk při tkáňovém poškození, případně při nefyziologické smrti buňky např. nekrotizací. Jde např. o kyselinu močovou, hyaluran, ATP, proteiny teplotního šoku. Jde ovšem

stále ještě o nevyřešenou a kontroverzní oblast. V každém případě je indukce imunitní odpovědi například proti nádorovým buňkám mnohem složitější než indukce imunitní reakce proti infekci. Existují práce prokazující, že buňky, které zahynuly nekrotickou smrtí, dokáží předat dendritickým buňkám tzv. „danger signal“, a tak je aktivovat. Mezi kandidátní molekuly zodpovědné za aktivaci dendritických buněk mrtvými buňkami jsou nejčastěji zmiňovány bílkoviny tepelného šoku.

Charakteristika procesu maturace

Maturační proces (spuštěný maturačním signálem, např. ligandem TLR) je komplexní v čase probíhající proces, během něhož dojde ke změnám v expresi téměř tisíce genů a který vede ke vzniku zralé dendritické buňky, schopné aktivovat antigen specifické T lymfocyty.⁽¹¹⁾ (Obr. 3)

Migrace dendritických buněk

Během maturace dochází k přesmyku v produkci chemokínových receptorů. Nezralé dendritické buňky exprimují především CCR5 a jsou atrahovány do periferních tkání chemokínem MIP-3 β . Po aktivaci dojde ke snížení jeho exprese a na povrchu dendritických buněk se objevuje především receptor CCR7 (v menší míře CXCR4), specifický pro chemokiny secernované v sekundárních lymfatických orgánech ELC (CCL19) a SLC(CCL21). Následně tedy dendritická buňka uniká z lokálního gradientu MIP-3 β a přesunuje se do T zóny lymfatických uzlin. CCR7 je také exprimován naivními T lymfocyty a hraje tedy důležitou úlohu ve směrování těchto dvou buněčných populací do stejného místa, čímž je zabezpečena jejich interakce.

Zpracování antigenů

Dendritická buňka procházející maturací přestává velmi rychle pohlcovat okolní antigeny a soustředí se na zpracování těch fragmentů, které ji aktivovaly. Zvýšená transkripce genů pro MHC I. a II. třídy má za následek vyšší syntézu těchto molekul a jejich zvýšený transport na membránu. Spolu se zvýšenou syntézou se na jejich zmnožení po aktivaci podílí také fakt, že se prodlužuje jejich stabilita. Exprese MHC molekul na dendritických buňkách je 10–100krát vyšší než na makrofázích.

Kostimulační a adhezivní molekuly

Zralé dendritické buňky exprimují celou řadu dosud známých kostimulačních molekul. Dobře popsané jsou změny v expresi molekul B7.1 (CD80), B7.2 (CD86), které váží CD28 a CTLA-4 na T lymfocytech. Nedávno byly popsány další členové rodiny B7 molekul: B7H-1 a B7-DC. Zralé dendritické buňky mají také vysokou expresi adhezivních molekul podílejících se na interakci s T lymfocyty.

Produkce cytokinů

Maturací dendritických buněk je spuštěna produkce mnoha cytokinů, jednak zánětlivých, které primárně fungují jako systémové nebo lokální signalizátory zánětu (TNF α , IL-1, IL-6), a dále cytokinů imunoregulačních (IL-12, IL-18, IFN α , IL-6, IL-10), které ovlivňují T-buňky a ve výsledku určují typ T-buněčné odpovědi. Zřejmě nejzásadnější je schopnost maturovaných dendritických buněk produkovat bioaktivní formu IL-12, heterodimer IL-12 p70, který směřuje diferenciaci nediferencovaných Th0 CD4+ buněk do fenotypu Th₁. Sekreci IL-12 p70 indukují některé TLR ligandy a signály T buněk (CD40L). Produkce cytokinů je klíčová pro určení typu imunitní reakce, kterou dendritická buňka aktivuje. Aktivace většiny TLRs například vede k produkci IL-12, IL-18 a IFN α , což jsou cytokiny, které polarizují imunitní odpověď směrem k typu Th₁. Méně je známo o faktorech polarizujících imunitní odpověď ve směru Th₂. Elegantní práce provedená na myším modelu prokázala, že k Th₂ typu imunitní odpovědi dochází v nepřítomnosti stimulace přes TLRs.⁽¹²⁾ Dendritické buňky, které produkují IL-10, jsou důležité pro indukci regulačních T lymfocytů. Zcela recentní publikace také identifikovala IL-23, produkováný po stimulaci receptoru Dectin-1 některými kvasinkami, jako důležitý polarizační faktor pro nově identifikované **Th17 T lymfocyty**.⁽¹³⁾

Dendritické buňky a určení typu buněčné odpovědi

Rozhodnutí o typu buněčné odpovědi je mnohem složitější, než

by se mohlo zdát z předchozí kapitoly, a je intenzivně zkoumáno. V současné době jde možná o vůbec najaktraktivnější oblast výzkumu v oblasti buněčné imunologie. T lymfocyty se po své aktivaci mohou diferencovat do celé řady funkčně odlišných buněk. Dobře popsány jsou pomocné lymfocyty typu Th₁, Th₂, regulační T lymfocyty a Th₁₇ lymfocyty. Aktivované CD4 i CD8 T lymfocyty se mohou dále diferencovat v centrální nebo efektorové paměťové buňky. Charakter T buněčné odpovědi proti určitému antigenu tedy ovlivňuje soubor faktorů působících v okamžiku rozpoznávání antigenu na dendritické buňce. Výsledná aktivace T buňky závisí na kvantitě a kvalitě signálů, které přijmou od dendritické buňky, tj. např. na hustotě MHC-peptidových komplexů (dávce antigenu), expresi kostimulačních molekul na povrchu dendritické buňky, produkci cytokinů dendritickou buňkou, ale i dalšími buňkami, které utvářejí specifické mikroprostředí v okolí imunologické synapse. Rozhodující je rovněž doba trvání interakce mezi dendritickou buňkou a T lymfocitem.

Všechny tyto faktory jsou zčásti dány základními vlastnostmi subpopulace dendritické buňky, na které je antigen vystaven (jejím genetickým programem), a zčásti aktivacím stavem této dendritické buňky. Aktivace dendritické buňky závisí na kontextu, v němž byl antigen rozpoznán, především pak na typu PAMPs, které patogen obsahuje.

Navrženy byly tři možné modely, které vysvětlují, jakým způsobem dendritické buňky modulují typ buněčné odpovědi. V praxi je zřejmě polarizace imunitní odpovědi výsledkem kombinace všech těchto scénářů.

1. Různé populace dendritických buněk jsou specializované na indukci kvalitativně odlišných imunitních odpovědí, např. Th₁ nebo Th₂.

Některé práce prosazovaly hypotézu, že myeloidní dendritické buňky indukují Th₁ a lazmacytooidní dendritické buňky Th₂ typ buněčné odpovědi. Jak již bylo zmíněno, obě subpopulace exprimují různé TLRs a jsou specializovány na indukci imunitní reakce proti různým antigenům.

2. Během procesu maturace se nejprve z nezralých dendritických buněk vyvinou zralé dendritické buňky produkující vysoká množství IL-12 p70 a indukují Th₁ odpověď. Po určité době produkce IL-12 p70 odezní a dendritické buňky profilují odpověď směrem k Th₂.

3. Jediná populace dendritických buněk může dávat vznik různým typům maturovaných buněk s odlišnou schopností indukce Th₁ nebo Th₂ odpovědi v závislosti na typu maturačního signálu.

Využití dendritických buněk v imunoterapii nádorových onemocnění

Imunoterapie nádorových onemocnění

V první části této práce byla shrnuta známá fakta o biologii dendritických buněk. Poznání klíčové role dendritických buněk v procesu zahájení imunitní reakce a možnost jejich přípravy ve velkém množství *in vitro* vedly k úvahám o jejich využití v imunoterapii nádorových onemocnění. Aktivace imunitní reakce proti nádorovým buňkám by byla významným přínosem pro terapii nádorů. Může však být protinádorová imunoterapie úspěšná? Nádorové buňky exprimují některé antigeny, které se na jiných buněčných typech nevyskytují. Těchto tzv. nádorově specifických, resp. asociovaných antigenů, je již popsáno velké množství. Problémem je, že nádorové buňky samy nemohou fungovat jako antigen prezentující buňky, protože neexprimují kostimulační molekuly. Nádorové buňky mají navíc celou řadu mechanis-

mů, kterými mohou uniknout imunitnímu dohledu. Pro aktivaci imunitní odpovědi je nutné, aby byla nádorová buňka pohlcena dendritickou buňkou a aby byly fragmenty nádorových antigenů následně prezentovány v lymfatických uzlinách zralými dendritickými buňkami. Jak bylo ovšem zmíněno v kapitole o signálech schopných aktivovat dendritické buňky, neúčinnějšími aktivátory jsou struktury pocházející z infekčních agens. Jako endogenní signály, které mohou způsobit aktivaci dendritických buněk při interakci s nádorovou buňkou, byly identifikovány kyselina močová a proteiny teplotního šoku.^(14, 15) Jejich aktivační potenciál je ovšem mnohem nižší než aktivační potenciál např. ligandů Toll-like receptorů. Aktivace imunitní reakce proti nádorům je tedy složitější než zahájení imunitní odpovědi proti infekčním agens.

Při imunoterapii dendritickými buňkami by byly pacientům podávány dendritické buňky prezentující nádorové antigeny (Obr. 1c). Aktivace by proběhla při přípravě vakcíny pomocí exogenně přidaných aktivátorů. V optimálním případě by po vakcinaci takovou protinádorovou vakcínou došlo k aktivaci komplexní imunitní reakce, která by vedla k eliminaci populace nádorových buněk (Obr. 4).

V této části práce jsou shrnuty současné znalosti o roli imunitního systému v obraně proti nádorům. Dále jsou diskutovány předpoklady, které by měly být splněny, aby imunoterapie nádorových onemocnění měla co největší šanci na úspěch.

Role imunitního systému v obraně proti nádorům

Zásadní pro racionální využití imunitního systému v léčbě nádorů je předpoklad, že imunitní systém je schopen rozeznat neoplastické buňky a zničit je dříve, než se klinicky projeví jako závažné onemocnění. Myšlenka, že imunitní systém je schopen rozeznat a odpovídat na nádorové bujení, byla poprvé formulována na počátku dvacátého století, když americký chirurg W. Coley zaznamenal vzácné regrese nádorů v průběhu bakteriálních infekcí. V roce 1950 byly publikovány studie, které ukázaly, že inbrední myši mohou být imunizovány proti nádorům indukovaným karcinogeny a že protilátky vytvořené proti odvrženému tumoru byly specifické. Tyto objevy vedly v roce 1957 k formulaci hypotézy o protinádorovém imunitním dohledu. Hypotéza byla vyslovena Thomasem a Burnetem a předpokládala existenci strážných buněk pocházejících z thymu, které trvale monitorují přítomnost transformovaných nádorových buněk.⁽¹⁶⁾

Existence protinádorového dohledu by tedy měla znamenat, že imunodeficitní jedinci mají vyšší frekvenci nádorových onemocnění. Rozhodující důkaz o roli imunitního systému v obraně proti nádorům poskytly studie na myších bez funkčních genů pro rekombinaci T a B buněčných receptorů RAG1 a RAG2 (RAG -/-). Tyto myši nemají T a B lymfocyty, protože nemohou přestavit antigenně specifické receptory. RAG -/-myši nejenže vyvinou chemicky indukované nádory rychleji a s větší frekvencí než imunokompetentní kontroly, ale také tvoří mnohem více spontánních tumorů, když pokus probíhá po dostatečně dlouhou dobu.⁽¹⁷⁾

Analogické studie na dalších myších modelech identifikovaly roli dalších buněčných komponent imunitního systému v prevenci nádorového onemocnění. Selektivní eliminace NK buněk u myší, jimž byly podány anti-asialo-GM1 protilátky, je činí třikrát vnímavější k chemicky indukovaným tumorům. Podobně kmen myší, které nemají NKT buňky, má vyšší incidenci chemicky indukovaných tumorů.

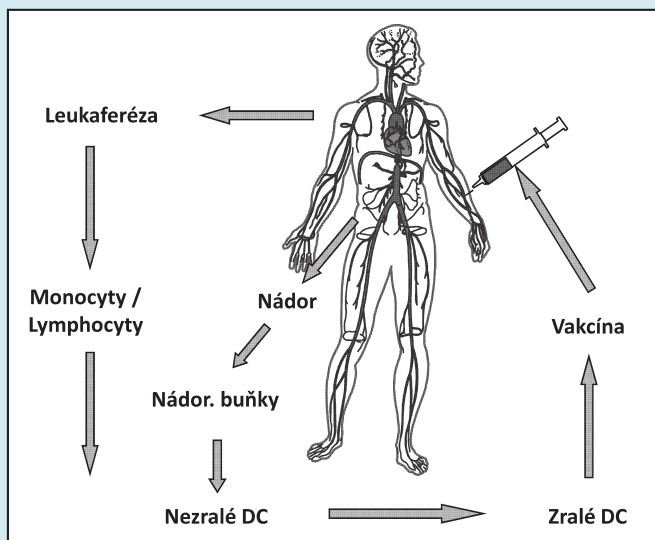
Podávání α -galactosylceramidu, jenž je aktivačním ligandem NKT buněk, v modelech chemicky indukované tumorigenese snížilo výskyt nádorů ve srovnání s kontrolní skupinou. Tyto studie nejenže podporují teorii o roli imunitního systému v kontrole tvorby nádorů, ale také odhalují důležitou roli specifické i nespecifické imunity v tomto procesu.

Průkopnické studie v laboratoři prof. Schreiber na univerzitě ve Washingtonu ukázaly zásadní roli interferonu γ (IFN- γ) v imunitním dohledu. Ztráta funkce IFN- γ pomocí neutralizace monoklonálními protilátkami nebo pomocí genetické manipulace zvyšuje vnímavost k chemicky indukovaným i spontánním tumorům. IFN- γ podporuje tvorbu antigen-specifických CD4 Th1 buněk a cytotoxických T lymfocytů (CTL), podporuje aktivaci dendritických buněk a makrofágů a inhibuje angiogenezi. Dokonce samotné nádorové buňky se ukázaly být významným buněčným cílem účinku IFN- γ , protože tento cytokin indukuje zvýšení exprese některých složek MHC I. V dalších experimentech byl jako důležitá molekula protinádorové obrany identifikován také perforin.

„Cancer Immune Editing“ – editace nádoru imunitním systémem

V rámci diskuse o existenci imunitního dohledu proti nádorovým buňkám je třeba zmínit novou hypotézu Dunna et al., nazývanou „Cancer immune editing“, tj. editace nádoru imunitním systémem.⁽¹⁸⁾ Jde o rozvinutí původní teorie Thomase a Burneta o poznatky získané během posledních let při pokusech s RAG deficitními modely. Tyto pokusy odhalily významné rozdíly v imunogenicitě nádorů v závislosti na hostiteli, ve kterém rostly. Pokud byl tumor izolovaný z RAG-2 -/- myši bez funkčního imunitního systému, transplantován do myši stejného kmene, rostl se stejnou kinetikou. Stejně tak přenos nádoru rostoucího v imunokompetentní myši do kontrolní myši téhož kmene také vedl k rychlé implantaci a rozvoji všech tumorů. Zajímavé a nečekané je ovšem zjištění, že téměř 50 % tumorů rostoucích v RAG-2 -/- imunokompromitovaných myších bylo odvrženo po přenosu do imunokompetentního hostitele. Nádory, které rostou v nepřítomnosti funkčního imunitního systému, jsou tedy více imunogenní než tumory vytvořené v imunokompetentních hostitelích. Výše uvedené výsledky naznačují, že imunitní systém vyvíjí na nádorové buňky neustálý selekční tlak, který vede k selekci takových variant transformovaných buněk, které dokáží uniknout efektorovým mechanismům imunitního systému. Dunn navrhuje rozlišovat tři odlišné úrovně v procesu boje imunitního systému proti nádorovým buňkám – **eliminaci** transformované buňky (elimination), **ustanovení rovnováhy** mezi transformovanou buňkou a organismem (equilibrium) a **únik** transformované buňky před kontrolou imunitního systému (escape).

Ve většině případů je nádorová buňka rozpoznána v časných stadiích transformace a zničena imunitním systémem. Celý proces zde může skončit nebo přejít do dalších fází. Ve fázi ustanovení rovnováhy hostitelský imunitní systém a přežívající nádorové buňky vcházejí do stadia dynamické rovnováhy. Nesmírná přizpůsobivost nádorových buněk vyplývající z rostoucí genetické nestability nakonec dá vzniknout novým genotypům, které zmenší imunogenicitu a může dojít k fázi úniku této buňky před vlivem imunitního systému. Fáze ustanovení rovnováhy je nejdelší z těchto tří procesů a klinicky se nejvíce shoduje s preneoplastickým onemocněním, které nejčastěji zůstává nedignostikované. Výsledkem stadia rovnováhy mohou být tři různé situace: 1. kompletní eliminace nádorových buněk; 2. dlouhodobé, možná stálé udržení dynamické rovnováhy mezi aktivní imunitní odpovědí



Obr. 4 – Obecné schéma protinádorové imunoterapie pomocí vakcíny z dendritických buněk

a vymezenou populací nádorových buněk; 3. únik před kontrolou imunitní reakce a rozvoj klinického onemocnění.

Mechanismy úniku nádorových buněk před imunitním systémem

Nádorové buňky vyvinuly řadu strategií, pomocí nichž jsou schopné uniknout kontrole imunitního systému. Nádorové buňky často produkují transformující růstový faktor β (TGF- β) a interleukin 10, tedy cytokiny, které inhibují protinádorovou imunitní reakci. Dalším únikovým mechanismem jsou časté mutace v genech, které kódují bílkoviny důležité pro prezentaci antigenů v antigen prezentujících buňkách. Jde např. o mutace v genech pro β_2 -mikroglobulin nebo v genech kódujících podjednotky proteazomu. Tyto mutace vedou ke vzniku rezistence k CD8 T lymfocytům. Tento fakt je obtížné překonat navzdory skutečnosti, že snížená exprese MHC I vede k vyšší vnímavosti nádorových buněk k NK buňkám. Předpokládá se, že komplexní stimulace imunitní reakce, zahrnující aktivaci CD4 T buněk a protilátek produkovaných B buňkami, může tento nedostatek vyrovnat, jak bylo dokázáno ve studiích na myším modelu. Kromě tohoto mechanismu je růst nádorových buněk samozřejmě také ovlivňován okolním stromatem. Imunizace proti produktům specifickým pro stromální buňky také může ovlivnit růst nádoru. Příkladem může být indukce imunitní odpovědi proti proteinům, které se účastní angiogeneze, jako je VEGFR2 (receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor).

Preneoplastický stav rozeznáný imunitním systémem

Pokud chceme uvažovat o imunoterapii nádorů, je třeba získat důkazy o tom, že preneoplastické a nádorové buňky jsou i u lidí cílem specifické imunitní odpovědi. Studium imunitní reakce během rozvoje nádoru je u lidí nesmírně komplikované, protože většina preneoplastických lézí není rozpoznána a diagnostikována je až klinicky detekovatelný nádor. A přitom právě studium preneoplastických lézí může poskytnout velmi cenná data. První otázkou je, zda-li je u pacientů s preneplazií detekovatelná imunitní odpověď proti transformovaným buňkám. Pokud ano, pak by studium antigenů, proti kterým je namířena, mohlo pomoci identifikovat antigeny, které jsou skutečně efektivní pro eliminaci nádorových buněk. Preneplazie často zůstává po dlouhou dobu, někdy i doživotně, stacionární, a je možné,

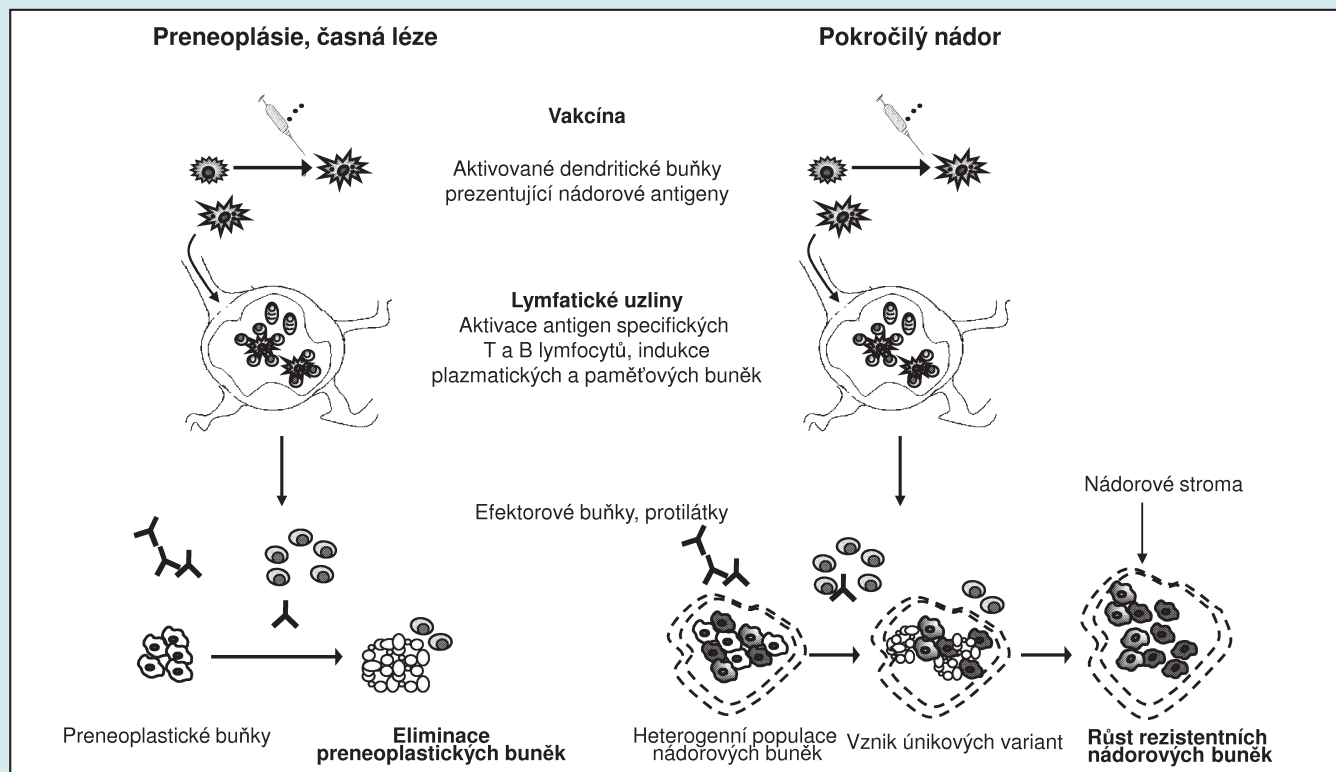
že imunitní reakce je u ní namířena proti jiným antigenům než u pokročilých nádorů. Rozdíl v kvalitě imunitní reakce by pak byl zodpovědný za nekontrovaný růst nádorových buněk u pacientů s klinicky rozvinutým onemocněním a stálou dynamickou rovnováhou mezi preneoplastickými buňkami a imunitním systémem u preneplazie.

Nejucelenější soubor dat o roli a charakteru imunitní reakce u lidské preneplazie byl získán u pacientů s monoklonální gamapatií nejasného významu (monoclonal gammopathy of unknown significance, MGUS).⁽¹⁹⁾ Pacienti s MGUS mají v kostní dřeni klonální expenzi plazmatických buněk, které jsou podle všech parametrů (cytogenetika, fenotyp, expresní profilování genovými čipy) téměř totožné s nádorovými buňkami u mnohočetného myelomu. Zatímco MM je ovšem onemocněním s velmi špatnou prognózou a bez léčby zcela infaustní, pacienti s MGUS zpravidla zůstávají klinicky stabilní po mnoho let, bez rozvoje MM. Studium MGUS a MM je technicky jednodušší než studium solidních nádorů, protože nádorové buňky i buňky imunitního systému mohou být poměrně jednoduše izolovány z kostní dřeni.

Bylo zjištěno, že pacienti s MGUS mají v kostní dřeni i v periferní krvi lymfocyty, které jsou schopny rozpoznávat autogenní nádorové buňky a reagovat produkcí IFN γ . U MM takové buňky detekovat nelze a nádorově specifické lymfocyty je možno stimulovat až po minimálně dvou týdnech *in vitro* stimulace. Tyto skutečnosti ukazují, že lidský imunitní systém je schopen rozpoznávat a odpovídat na preneoplastické stadium. Prvním z antigenů, který je navíc specificky rozpoznáván pouze u MGUS, je transkripční regulátor SOX2. Jde o jeden ze čtyř transkripčních faktorů, které jsou zcela klíčové pro funkci kmenových buněk, a je často exprimován v nádorových kmenových buňkách.⁽²⁰⁾ Tato populace buněk je v nádorové tkáni jako jediná schopna sebeobnovy a dává vznik všem dalším, více diferencovaným nádorovým buňkám. Zdá se tedy, že u MGUS je populace nádorových buněk „držena“ pod kontrolou díky imunitní reakci, která specificky potlačuje progenitorovou populaci kmenových nádorových buněk. V dalších studiích je třeba rozhodnout, zda podobná odpověď existuje i u dalších preneoplastických stavů a identifikovat další antigenní cíle takové odpovědi.

Klinické aplikace imunoprevence nádorových onemocnění

Existuje mnoho skupin pacientů a klinických situací, v nichž je možné uvažovat o klinické aplikaci protinádorové imunoterapie. Primární prevence vyžaduje identifikaci osob s vysokým rizikem rozvoje nádorového onemocnění. To je dnes nejčastěji možné u pacientů s dědičnými syndromy, které zvyšují zásadním způsobem riziko rozvoje nádorů. Jde např. o pacienty s Li-Fraumeni syndromem, mutacemi v BRCA apod., u kterých mohou být detekovány specifické mutace, a také zvýšené riziko rakoviny.⁽²¹⁾ Další skupinu kandidátů na imunoprevenci nádorů představují pacienti s již detekovaným preneoplastickým onemocněním.^(22, 23) U těchto pacientů je důležitá prevence progresu do stadia maligního tumoru. Jde například o pacienty s kolo- rektálními polypy, orální leukoplakii, cervikální intraepiteliální neoplazií či MGUS. Nejpočetnější skupinu pacientů, u kterých bude zvažována protinádorová terapie, budou vždy tvořit pacienti s již diagnostikovaným nádorem. V dosud proběhlých studiích byla imunoterapie testována jako poslední přístup u pacientů, kteří byli ve velmi pokročilém stadiu disseminovaného onemocnění a kteří podstoupili chemoterapii. Není překvapující, že za takových podmínek je naděje na trvalý efekt imunoterapie malá. Je spíše překvapující a povzbudivé, že většinou došlo k indukci detekovatelné imunitní odpovědi. Je třeba, aby



Obr. 5 – Rozdíl v načasování protinádorové imunoterapie do časně nebo pozdní fáze nádorového onemocnění.

byla imunoterapie zařazena do současných léčebných schémat, nejlépe u pacientů ve stadiu minimální reziduální nemoci, např. po radikálním chirurgickém výkonu. Rozdíl v charakteru imunitní reakce při imunoterapii časných a pozdních stadií onemocnění je znázorněn na Obr. 5.

V optimálním případě prezentují dendritické buňky nádorové antigeny v lymfatických uzlinách a aktivují antigen specifické T lymfocyty. Následně jsou aktivovány B lymfocyty a výsledkem je klonální expanze nádorově specifických T lymfocytů a produkce specifických protilátek.

V případě protinádorové vakcinace ve stadiu preneoplázie následuje v další fázi tvorba paměťových buněk. Jestliže poté začne nádor růst, vyvolá aktivaci mohutné sekundární imunitní reakce s rychlou expanzí velkého množství efektorových buněk a tvorbou vysokých titrů protilátek.

Má-li být úspěšná imunoterapie nádorového onemocnění v pokročilém stadiu, musí dojít k rychlé indukci velkého množství efektorových buněk, což je velmi nesnadný úkol. Efektorové buňky musí poté migrovat do nádorové tkáně, což je znesnadněno přítomností imunosupresivních látek, které produkuje nádorová tkáň, a také nádorovým stromatem. V pokročilém stadiu onemocnění je navíc populace nádorových buněk heterogenní a některé buňky již nemusí exprimovat nádorové antigeny. Tyto buňky nemohou být rozpoznány antigen specifickými T lymfocyty a protinádorovými protilátkami a jsou rezistentní k destrukci mechanismy imunitního systému. Populace rezistentních nádorových buněk roste nezávisle na přítomnosti imunitní reakce a dává vzniknout nádoru, který je zcela rezistentní k protinádorové imunoterapii.

Imunoterapie nádorových onemocnění dendritickými buňkami

V souladu s výše uvedenými fakty je zřejmé, že v optimálním případě by měla být protinádorová imunoterapie zahájena v co

nejčasnějším stadiu onemocnění, eventuálně ve fázi, kdy je v organismu přítomno malé množství nádorových buněk. Současné terapeutické protokoly používané v onkologii (chirurgie, chemoterapie, radioterapie) jsou relativně velmi účinné ve své schopnosti zredukovat množství nádorových buněk. U mnoha typů malignit ovšem zůstává problémem perzistence malého množství buněk rezistentních na použité léky. Tento stav se nazývá minimální reziduální nemoc (MRN) a existuje závislost mezi hladinou MRN a prognózou pacienta. Přežívající buňky dají v dalším průběhu choroby vznik nové, terapeuticky již těžko ovlivnitelné nádorové populace. Pacienti ve stadiu MRN by tedy mohli být vhodnými kandidáty pro protinádorovou imunoterapii, protože aktivace specifické protinádorové imunitní reakce by v této fázi mohla vést ke zlepšení prognózy onemocnění.

Obečné schéma imunoterapie dendritickými buňkami je znázorněno na Obr. 3. Po výběru pacientů, kteří jsou zařazeni do studie, je připraveno velké množství nezralých dendritických buněk z monocytů v periferní krvi v přítomnosti cytokinů GM-CSF a IL-4. Po pěti dnech dojde k diferenciaci monocytů v nezralé dendritické buňky. Další postup závisí na typu nádorového antigenu, který je pro imunoterapii plánován. Při použití mrtvých nádorových buněk jako zdroje celého spektra nádorových antigenů je prvním krokem inkubace dendritických buněk s nádorovými buňkami.^(24, 25) Po pohlcení nádorových buněk jsou následně dendritické buňky aktivovány a zralé dendritické buňky, které prezentují nádorové antigeny, jsou poté jako protinádorová vakcína podány zpět pacientovi.

Při použití přesně definovaných epitopů nádorových antigenů ve formě krátkých peptidů jsou dendritické buňky nejprve maturovány a teprve zralé dendritické buňky, které exprimují velké množství HLA molekul, jsou inkubovány s nádorovým antigenem. Další testované formy nádorových antigenů jsou transfekce dendritických buněk RNA izolovanou z nádorových buněk nebo plazmidy kódujícími nádorový antigen.

Rychle po objasnění role dendritických buněk v indukci imunitní

reakce a publikaci protokolů pro jejich přípravu z monocytů bylo provedeno několik klinických studií u řady nádorových onemocnění (např. maligní melanom, renální karcinom, non-Hodgkinský lymfom a další). U řady těchto studií došlo k laboratorně detekovatelné indukci protinádorové imunitní odpovědi, ale i přes několik popsaných regresí nádorových lézí, nebyl klinický efekt většinou dlouhodobý.

Jak bylo uvedeno v předchozí kapitole, zásadním problémem provedených studií je, že do nich byly výlučně zahrnuti pacienti ve velmi pokročilých fázích onemocnění, u kterých byly již vyčerpány všechny ostatní terapeutické modality. Imunitní systém byl tedy výrazně poškozen jak proběhlou chemoterapií, tak imunosupresivními mechanismy nádorové tkáně. Je také nutné zdůraznit, že v těchto studiích byly použity nezralé či pouze nedokonale aktivované dendritické buňky. Je opět nutno zdůraznit, že v souladu s teoretickými předpoklady i experimentálními daty má protinádorová imunoterapie největší šanci na úspěch v případech, že bude aplikována pacientům v časných fázích onemocnění, případně pacientům po radikálním chirurgickém výkonu ve fázi minimální reziduální nemoci.

Nově plánované klinické studie, včetně studií plánovaných na 2. LF UK a FN Motol, také počítají s použitím dendritických buněk, které budou aktivovány ligandy TLR. Předmětem intenzivního výzkumu je ovšem řada dalších parametrů. Jde především o množství podávaných dendritických buněk a frekvenci a celkovou dobu podávání protinádorové vakcíny. Roli v efektivitě podávané vakcíny zřejmě hraje také způsob podání vakcíny. Jako nejlepší se zatím jeví subkutánní nebo intradermální injekce, ale stále je zapotřebí hledat strategie, které zaručí, že se většina injikovaných buněk dostane do lymfatických uzlin. Neméně důležitým problémem je také typ testů, které budou používány pro monitoraci efektu terapie.

Závěr

Během posledních let byl učiněn zásadní pokrok v porozumění mechanismům zahájení imunitní odpovědi. Cílem protinádorové imunoterapie je využití těchto poznatků pro vývoj imunoterapeutických strategií, které by se staly součástí standartních protokolů onkologické léčby a přispěly by ke zlepšení prognózy nádorových onemocnění.

Výzkum nádorové imunologie na Ústavu imunologie, UK 2. LF je podpořen Výzkumným záměrem Ministerstva školství MSM 0021620812.

Literatura

- CASANOVA, J.L., ABEL, L. *Inborn errors of immunity to infection: the rule rather than the exception.* J Exp Med, 2005, 202, No. 2, p. 197–201.
- FONTENOT, J.D., GAVIN, M.A., RUDENSKY, A.Y. *Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells.* Nat Immunol, 2003, 4, No. 4, p. 330–336.
- BANCHEREAU, J., BRIERE, F., CAUX, C., et al. *Immunobiology of dendritic cells.* Annu Rev Immunol, 2000, 18, p. 767–811.
- STEINMAN, R.M., COHN, Z.A. *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro.* J Exp Med, 1974, 139, No. 2, p. 380–397.
- BANCHEREAU, J., STEINMAN, R.M. *Dendritic cells and the control of immunity.* Nature, 1998, 392(6673), p. 245–252.
- SHORTMAN, K., LIU, Y.J. *Mouse and human dendritic cell subtypes.* Nat Rev Immunol, 2002, 2, No. 3, p. 151–161.
- GEIJTENBEEK, T.B., TORENSMA, R., Van VLIET, S.J., et al. *Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses.* Cell, 2000, 100, No. 5, p. 575–585.
- DHODAPKAR, M.V., STEINMAN, R.M., KRASOVSKY, J., et al. *Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells.* J Exp Med, 2001, 193, No. 2, p. 233–238.
- STEINMAN, R.M. *Dendritic cells: versatile controllers of the immune system.* Nat Med, 2007, 13, No. 10, p. 1155–1159.
- SPORRI, R., REIS, E., SOUSA, C. *Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4+ T cell populations lacking helper function.* Nat Immunol, 2005, 6, No. 2, p. 163–170.
- GRANUCCI, F., VIZZARDELLI, C., PAVELKA, N., et al. *Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis.* Nat Immunol, 2001, 2, No. 9, p. 882–888.
- SCHNARE, M., BARTON, G.M., HOLT, A.C., et al. *Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses.* Nat Immunol, 2001, 2, No. 10, p. 947–950.
- ACOSTA-RODRIGUEZ, E.V., RIVINO, L., GEGINAT, J., et al. *Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells.* Nat Immunol, 2007, 8, No. 6, p. 639–646.
- SPISEK, R., CHARALAMBOUS, A., MAZUMDER, A., et al. *Bortezomib enhances dendritic cell (DC)-mediated induction of immunity to human myeloma via exposure of cell surface heat shock protein 90 on dying tumor cells: therapeutic implications.* Blood, 2007, 109, No. 11, p. 4839–4845.
- SPISEK, R., DHODAPKAR, M.V. *Towards a better way to die with chemotherapy: role of heat shock protein exposure on dying tumor cells.* Cell Cycle, 2007, 6(16), p. 1962–1965.
- BURNET, F.M. *The concept of immunological surveillance.* Prog Exp Tumor Res, 1970, 13, p. 1–27.
- SHANKARAN, V., IKEDA, H., BRUCE, A.T., et al. *IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity.* Nature, 2001, 410, No. 6832, p. 1107–1111.
- DUNN, G.P., OLD, L.J., SCHREIBER, R.D. *The three Es of cancer immunoediting.* Annu Rev Immunol, 2004, 22, p. 329–360.
- DHODAPKAR, M.V. *Harnessing host immune responses to preneoplasia: promise and challenges.* Cancer Immunol Immunother, 2005, 54, No. 5, p. 409–413.
- SPISEK, R., KUKREJA, A., CHEN, L.C., et al. *Frequent and specific immunity to the embryonal stem cell-associated antigen SOX2 in patients with monoclonal gammopathy.* J Exp Med, 2007, 204, No. 4, p. 831–840.
- FINN, O.J., FORNI, G. *Prophylactic cancer vaccines.* Curr Opin Immunol, 2002, 14, No. 2, p. 172–7.
- SPISEK, R. *Immunoprevention of cancer: time to reconsider timing of vaccination against cancer.* Expert Rev Anticancer Ther, 2006, 6, No. 12, p. 1689–1691.
- SPISEK, R., DHODAPKAR, M.V. *Immunoprevention of cancer.* Hematol Oncol Clin North Am, 2006, 20, No. 3, p. 735–750.
- SPISEK, R., CHEVALLIER, P., MORINEAU, N., et al. *Induction of leukemia-specific cytotoxic response by cross-presentation of late-apoptotic leukemic blasts by autologous dendritic cells of nonleukemic origin.* Cancer Res, 2002, 62, No. 10, p. 2861–2868.
- TOBIAŠOVA, Z., POSPISILOVA, D., MILLER, A.M., et al. *In vitro assessment of dendritic cells pulsed with apoptotic tumor cells as a vaccine for ovarian cancer patients.* Clin Immunol, 2007, 122, No. 1, p. 18–27.

Seznam zkratk

- APC – antigen prezentující buňka
 BCR – B buněčný receptor
 Btk – Brutonova tyrozinokináza
 CTL – cytotoxický T lymfocyt
 GM-CSF – granulocyty monocyty kolonie stimulující faktor
 IL – interleukin
 IFN – interferon
 LPS – lipopolysacharid
 LTA – kyselina lipoteichoová
 MGUS – monoclonal gammopathy of unknown significance
 MHC – hlavní histokompatibilní komplex
 MM – mnohočetný myelom
 MRN – minimální reziduální nemoc
 MyD88 – myeloid differentiation primary response protein
 NK buňky – natural killers (přirození zabíječi)
 NOD – nucleotide oligomerization domain
 PAMPs – molekulární struktury asociované s patogeny
 PRR – receptor rozpoznávající molekulární struktury asociované s patogeny
 RAG – gen aktivující rekombinaci
 RNA – ribonukleová kyselina
 TAP – transportér sdružený s antigenní prezentací
 TCR – T buněčný receptor
 Th – pomocný T lymfocyt
 TLR – Toll-like receptor

e-mail: radek.spisek@lfmotol.cuni.cz

6 Závěr

Diagnostika a léčba nádorového onemocnění prošla zejména v průběhu posledních dvaceti let podstatným vývojem. V diagnostice se využívají zobrazovací metody, metody nukleární medicíny, laboratorní vyšetření a v případě kolorektálního karcinomu především endoskopie, umožňující detekci i velmi časných lézí. Základním a dosud nenahraditelným způsobem léčby solidních nádorů je radikální chirurgické odstranění nádoru (R0 resekce) včetně spádové lymfatické oblasti. Zvýšení chirurgické radikality léčby, zvýšení bezpečnosti operací a účinnější adjuvantní a neoadjuvantní léčba umožnily zvýšit podíl vyléčených a prodloužit přežití. Přesto je hledání dalších léčebných a prognostických možností naléhavým úkolem. Podstatné změny lze očekávat v časnější diagnostice, detekci geneticky podmíněné tumorigenezy, některých momentech chirurgické léčby a řadě aspektů neoperačně vedené onkoterapie. Tam patří kromě účinnějších cytostatik také určení prognostických a prediktivních biomarkerů, které povedou k dalšímu zdokonalování v oblasti optimalizace a individuální specifikace adjuvantní chemoterapie. Jinými slovy na základě laboratorního vyšetření těchto biomarkerů předurčit, zda bude další onkologická léčba pro pacienta přínosná ve srovnání s pouhým sledováním po radikální chirurgické resekci.

6.1 Význam imunitního infiltrátu u kolorektálního karcinomu a jeho korelace s K-ras mutacemi pro prognózu onemocnění

Výsledky této práce u pacientů s kolorektálním karcinomem prokázaly, že kombinací molekulárních biomarkerů s imunologickými daty lze získat slibný prognostický faktor, pomocí kterého bude možné identifikovat rizikové pacienty ohrožené relapsem onemocnění.

- Jedná se o pacienty s mutací v onkogenu K-ras v kodonu 13, nízkou denzitou TILs a vysokým poměrem CD1a+/DC-LAMP+ buněk v nádorové tkáni.

Vzhledem ke skutečnosti, že tito pacienti jsou navíc rezistentní na léčbu inhibitory EGFR, a tudíž vystaveni vyššímu riziku úmrtí na nádorové onemocnění, mají být po

radikálním chirurgickým výkonu indikování k adjuvantní onkologické léčbě a pečlivému follow-up.

6.2 Sledování dynamiky imunitního infiltrátu v závislosti na stádiu ovariálního karcinomu

Tato práce potvrdila výraznou dynamiku imunitní reakce v mikroprostředí ovariálního karcinomu v závislosti na pokročilosti onemocnění.

- Výsledky získané od pacientek s ovariálním karcinomem prokázaly změnu imunitní reakce v průběhu nádorové progresy od efektorových Th17 lymfocytů směrem k regulačním T lymfocytům.
- Regulační T lymfocyty v nádoru byly charakterizovány stabilní expresí FoxP3 (přítomnost demetylase v oblasti TSDR) a expresí transkripčního faktoru Helios, které potvrzují jejich stabilitu a vysoký aktivační stav. Tyto výsledky dokazují významný podíl Treg na imunosupresivním mikroprostředí nádoru v pokročilém stádiu ovariálního karcinomu.
- Regulační T lymfocyty nebyly v nádoru indukovány in situ z naivních T lymfocytů, ale pocházely z periferní krve. Chemotaxe regulačních T lymfocytů z periferní krve byla zprostředkována pomocí interakce CCR4/CCL22. Chemokin CCL22 byl v nádoru produkován zejména nádorovými buňkami, monocyty/makrofágy a mDC pod vlivem IFN- γ .

Hlavní úlohou Treg je zjevně zabezpečovat periferní toleranci a bránit vzniku autoimunitních onemocnění, na druhou stranu Treg dokáží inhibovat protinádorovou imunitní odpověď a tím se významně podílí na imunosupresivním mikroprostředí nádoru. Taková inhibice poté může mít pro onkologické pacienty fatální následky, neboť jejich imunitní systém nedokáže s nádorovými buňkami efektivně bojovat. Tyto poznatky lze využít při vývoji imunoterapeutických postupů, které by se staly součástí standardních protokolů onkologické léčby. Důraz by neměl být kladen pouze na posílení protinádorových mechanismů imunity, ale také zejména na potlačení imunosupresivního mikroprostředí nádoru.

7 Poděkování

Tato práce by nikdy nevznikla bez podpory mých učitelů, kolegů a přátel. Rád bych upřímně poděkoval všem současným a bývalým kolegům a spolupracovníkům na Ústavu imunologie UK 2. LF a FN v Motole, kteří mi průběžně pomáhali s experimentální částí projektu. Dále bych velmi rád poděkoval konzultantům Prof. MUDr. Jiřině Bartůňkové, DrSc. a Prof. MUDr. Radku Špíškovi, Ph.D. za odborné vedení, příjemné pracovní prostředí a jejich všestrannou pomoc. Zvláštní poděkování patří mému školiteli Prof. MUDr. Jiřímu Hochovi, CSc., který mi umožnil pracovat na Chirurgické klinice UK 2. LF a FN v Motole. Rád bych poděkoval zejména za jeho lidský přístup a trpělivost při vykonávání každodenní chirurgické praxe a za jeho předané zkušenosti a cenné rady, které mi pomohly v mém dalším profesním rozhodování. V neposlední řadě můj největší dík patří mé rodině, bez jejíž vytrvalé podpory bych nemohl tuto práci dokončit.

8 Seznam citované literatury

1. Finn, O.J., *Cancer immunology*. N Engl J Med, 2008. **358**(25): p. 2704-15.
2. Schreiber, R.D., L.J. Old, and M.J. Smyth, *Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion*. Science. **331**(6024): p. 1565-70.
3. Galon, J., et al., *Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome*. Science, 2006. **313**(5795): p. 1960-4.
4. Mlecnik, B., et al., *Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction*. J Clin Oncol. **29**(6): p. 610-8.
5. Burnet, F.M., *The concept of immunological surveillance*. Prog Exp Tumor Res, 1970. **13**: p. 1-27.
6. Shankaran, V., et al., *IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity*. Nature, 2001. **410**(6832): p. 1107-11.
7. Smyth, M.J., N.Y. Crowe, and D.I. Godfrey, *NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma*. Int Immunol, 2001. **13**(4): p. 459-63.
8. Smyth, M.J., et al., *Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells*. J Exp Med, 2000. **191**(4): p. 661-8.
9. Kaplan, D.H., et al., *Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(13): p. 7556-61.
10. Dighe, A.S., et al., *Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors*. Immunity, 1994. **1**(6): p. 447-56.
11. Bach, E.A., M. Aguet, and R.D. Schreiber, *The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 563-91.
12. Hayakawa, Y., et al., *IFN-gamma-mediated inhibition of tumor angiogenesis by natural killer T-cell ligand, alpha-galactosylceramide*. Blood, 2002. **100**(5): p. 1728-33.

13. van den Broek, M.E., et al., *Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice*. J Exp Med, 1996. **184**(5): p. 1781-90.
14. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The three Es of cancer immunoediting*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 329-60.
15. Hussain, S.P., L.J. Hofseth, and C.C. Harris, *Radical causes of cancer*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(4): p. 276-85.
16. Kripke, M.L., *Antigenicity of murine skin tumors induced by ultraviolet light*. J Natl Cancer Inst, 1974. **53**(5): p. 1333-6.
17. Srivastava, P.K. and L.J. Old, *Individually distinct transplantation antigens of chemically induced mouse tumors*. Immunol Today, 1988. **9**(3): p. 78-83.
18. Schultze, J.L. and R.H. Vonderheide, *From cancer genomics to cancer immunotherapy: toward second-generation tumor antigens*. Trends Immunol, 2001. **22**(9): p. 516-23.
19. Stockley, R.A., et al., *Effect of cigarette smoking, pulmonary inflammation, and lung disease on concentrations of carcinoembryonic antigen in serum and secretions*. Thorax, 1986. **41**(1): p. 17-24.
20. Go, V.L., *Carcinoembryonic antigen: clinical application*. Cancer, 1976. **37**(1 suppl): p. 562-6.
21. Loewenstein, M.S. and N. Zamcheck, *Carcinoembryonic antigen (CEA) levels in benign gastrointestinal disease states*. Cancer, 1978. **42**(3 Suppl): p. 1412-8.
22. McCall, J.L., et al., *The value of serum carcinoembryonic antigen in predicting recurrent disease following curative resection of colorectal cancer*. Dis Colon Rectum, 1994. **37**(9): p. 875-81.
23. Wanebo, H.J., et al., *Prospective monitoring trial for carcinoma of colon and rectum after surgical resection*. Surg Gynecol Obstet, 1989. **169**(6): p. 479-87.
24. Moertel, C.G., et al., *An evaluation of the carcinoembryonic antigen (CEA) test for monitoring patients with resected colon cancer*. JAMA, 1993. **270**(8): p. 943-7.
25. Grotowski, M., *[Antigens (CEA and CA 19-9) in diagnosis and prognosis colorectal cancer]*. Pol Merkur Lekarski, 2002. **12**(67): p. 77-80.
26. Whitehouse, C. and E. Solomon, *Current status of the molecular characterization of the ovarian cancer antigen CA125 and implications for its use in clinical screening*. Gynecol Oncol, 2003. **88**(1 Pt 2): p. S152-7.

27. Lenhard, M., et al., *The diagnostic accuracy of two human epididymis protein 4 (HE4) testing systems in combination with CA125 in the differential diagnosis of ovarian masses*. Clin Chem Lab Med. **49**(12): p. 2081-8.
28. Chang, X., et al., *Human epididymis protein 4 (HE4) as a serum tumor biomarker in patients with ovarian carcinoma*. Int J Gynecol Cancer. **21**(5): p. 852-8.
29. Steffensen, K.D., et al., *The Prognostic and Predictive Value of Combined HE4 and CA-125 in Ovarian Cancer Patients*. Int J Gynecol Cancer. **22**(9): p. 1474-82.
30. Chan, K.K., et al., *The use of HE4 in the prediction of ovarian cancer in Asian women with a pelvic mass*. Gynecol Oncol.
31. Novotny, Z., et al., *HE4 and ROMA index in Czech postmenopausal women*. Anticancer Res. **32**(9): p. 4137-40.
32. Presl, J., et al., *[HE4 a biomarker of ovarian cancer]*. Ceska Gynekol. **77**(5): p. 445-9.
33. Patriarca, C., et al., *Epithelial cell adhesion molecule expression (CD326) in cancer: a short review*. Cancer Treat Rev. **38**(1): p. 68-75.
34. Winter, M.J., et al., *The epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) as a morphoregulatory molecule is a tool in surgical pathology*. Am J Pathol, 2003. **163**(6): p. 2139-48.
35. Nabarro, S., et al., *Coordinated oncogenic transformation and inhibition of host immune responses by the PAX3-FKHR fusion oncoprotein*. J Exp Med, 2005. **202**(10): p. 1399-410.
36. Stassi, G., et al., *Thyroid cancer resistance to chemotherapeutic drugs via autocrine production of interleukin-4 and interleukin-10*. Cancer Res, 2003. **63**(20): p. 6784-90.
37. Todaro, M., et al., *Apoptosis resistance in epithelial tumors is mediated by tumor-cell-derived interleukin-4*. Cell Death Differ, 2008. **15**(4): p. 762-72.
38. Todaro, M., et al., *Autocrine production of interleukin-4 and interleukin-10 is required for survival and growth of thyroid cancer cells*. Cancer Res, 2006. **66**(3): p. 1491-9.
39. Rubtsov, Y.P. and A.Y. Rudensky, *TGFbeta signalling in control of T-cell-mediated self-reactivity*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(6): p. 443-53.

40. Larmonier, N., et al., *Tumor-derived CD4(+)CD25(+) regulatory T cell suppression of dendritic cell function involves TGF-beta and IL-10*. *Cancer Immunol Immunother*, 2007. **56**(1): p. 48-59.
41. Ghiringhelli, F., et al., *Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation*. *J Exp Med*, 2005. **202**(7): p. 919-29.
42. Gorelik, L. and R.A. Flavell, *Transforming growth factor-beta in T-cell biology*. *Nat Rev Immunol*, 2002. **2**(1): p. 46-53.
43. Green, D.R. and G. Kroemer, *The pathophysiology of mitochondrial cell death*. *Science*, 2004. **305**(5684): p. 626-9.
44. Debatin, K.M. and P.H. Krammer, *Death receptors in chemotherapy and cancer*. *Oncogene*, 2004. **23**(16): p. 2950-66.
45. Ichiki, Y., et al., *Simultaneous cellular and humoral immune response against mutated p53 in a patient with lung cancer*. *J Immunol*, 2004. **172**(8): p. 4844-50.
46. Boles, K.S., et al., *The tumor suppressor TSLC1/NECL-2 triggers NK-cell and CD8+ T-cell responses through the cell-surface receptor CRTAM*. *Blood*, 2005. **106**(3): p. 779-86.
47. Zitvogel, L., A. Tesniere, and G. Kroemer, *Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion*. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(10): p. 715-27.
48. Marincola, F.M., et al., *Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance*. *Adv Immunol*, 2000. **74**: p. 181-273.
49. Zamanakou, M., A.E. Germenis, and V. Karanikas, *Tumor immune escape mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase*. *Immunol Lett*, 2007. **111**(2): p. 69-75.
50. Uyttenhove, C., et al., *Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase*. *Nat Med*, 2003. **9**(10): p. 1269-74.
51. De Roock, W., et al., *KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab*. *Ann Oncol*, 2008. **19**(3): p. 508-15.

52. Di Fiore, F., et al., *Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by Cetuximab plus chemotherapy*. Br J Cancer, 2007. **96**(8): p. 1166-9.
53. Lievre, A., et al., *KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab*. J Clin Oncol, 2008. **26**(3): p. 374-9.
54. Pretlow, T.P., et al., *K-ras mutations in putative preneoplastic lesions in human colon*. J Natl Cancer Inst, 1993. **85**(24): p. 2004-7.
55. Vogelstein, B., et al., *Genetic alterations during colorectal-tumor development*. N Engl J Med, 1988. **319**(9): p. 525-32.
56. Forrester, K., et al., *Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis*. Nature, 1987. **327**(6120): p. 298-303.
57. Bhargava, A., et al., *Dendritic cell engineering for tumor immunotherapy: from biology to clinical translation*. Immunotherapy. **4**(7): p. 703-18.
58. Simon, T., J.F. Fonteneau, and M. Gregoire, *Dendritic cell preparation for immunotherapeutic interventions*. Immunotherapy, 2009. **1**(2): p. 289-302.
59. Osada, T., et al., *Dendritic cell-based immunotherapy*. Int Rev Immunol, 2006. **25**(5-6): p. 377-413.
60. Hirota, K., B. Martin, and M. Veldhoen, *Development, regulation and functional capacities of Th17 cells*. Semin Immunopathol. **32**(1): p. 3-16.
61. Predina, J., et al., *Changes in the local tumor microenvironment in recurrent cancers may explain the failure of vaccines after surgery*. Proc Natl Acad Sci U S A.
62. Sakaguchi, S., K. Wing, and M. Miyara, *Regulatory T cells - a brief history and perspective*. Eur J Immunol, 2007. **37 Suppl 1**: p. S116-23.
63. Sakaguchi, S., et al., *Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease*. Immunol Rev, 2006. **212**: p. 8-27.
64. Takahashi, T. and S. Sakaguchi, *Naturally arising CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in maintaining immunologic self-tolerance and preventing autoimmune disease*. Curr Mol Med, 2003. **3**(8): p. 693-706.
65. Takahashi, T. and S. Sakaguchi, *The role of regulatory T cells in controlling immunologic self-tolerance*. Int Rev Cytol, 2003. **225**: p. 1-32.

66. Chiba, T., et al., *Intraepithelial CD8+ T-cell-count becomes a prognostic factor after a longer follow-up period in human colorectal carcinoma: possible association with suppression of micrometastasis*. Br J Cancer, 2004. **91**(9): p. 1711-7.
67. Naito, Y., et al., *CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer*. Cancer Res, 1998. **58**(16): p. 3491-4.
68. Pages, F., et al., *Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer*. N Engl J Med, 2005. **353**(25): p. 2654-66.
69. Suzuki, H., et al., *Intratumoral CD8(+) T/FOXP3 (+) cell ratio is a predictive marker for survival in patients with colorectal cancer*. Cancer Immunol Immunother. **59**(5): p. 653-61.
70. Suzuki, H., et al., *Intratumoral FOXP3(+)VEGFR2(+) regulatory T cells are predictive markers for recurrence and survival in patients with colorectal cancer*. Clin Immunol. **146**(1): p. 26-33.
71. Nagorsen, D., et al., *Tumor-infiltrating macrophages and dendritic cells in human colorectal cancer: relation to local regulatory T cells, systemic T-cell response against tumor-associated antigens and survival*. J Transl Med, 2007. **5**: p. 62.
72. Dadabayev, A.R., et al., *Dendritic cells in colorectal cancer correlate with other tumor-infiltrating immune cells*. Cancer Immunol Immunother, 2004. **53**(11): p. 978-86.
73. Ozols, R.F., et al., *Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study*. J Clin Oncol, 2003. **21**(17): p. 3194-200.
74. Zou, W., *Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(4): p. 263-74.
75. Labidi-Galy, S.I., et al., *Quantitative and functional alterations of plasmacytoid dendritic cells contribute to immune tolerance in ovarian cancer*. Cancer Res. **71**(16): p. 5423-34.
76. Kryczek, I., et al., *Relationship between B7-H4, regulatory T cells, and patient outcome in human ovarian carcinoma*. Cancer Res, 2007. **67**(18): p. 8900-5.
77. Murugaiyan, G. and B. Saha, *Protumor vs antitumor functions of IL-17*. J Immunol, 2009. **183**(7): p. 4169-75.

78. Ji, Y. and W. Zhang, *Th17 cells: positive or negative role in tumor?* *Cancer Immunol Immunother.* **59**(7): p. 979-87.

9 Seznam vlastních publikací

9.1 GAUK

Projekt řešený v rámci disertační práce byl podpořen Grantovou agenturou UK registrační číslo 93909 s názvem: Interakce buněk imunitního systému s kolorektálním karcinomem.

9.2 Publikace s IF ve vztahu k disertační práci

Kocián P, Šedivcová M, Drgáč J, Černá K, Hoch J, Kodet R, Bartůňková J, Špíšek R, Fialová A., *Tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells in human colorectal cancer: their relationship to KRAS mutational status and disease recurrence*. Hum Immunol. **72**(11): p. 1022-8. (IF: **2,837**, z roku **2011**)

Fialová A, Partlová S, Sojka L, Hromádková H, Brtnický T, Fučíková J, **Kocián P**, Rob L, Bartůňková J, Špíšek R., *Dynamics of T-cell infiltration during the course of ovarian cancer: The gradual shift from a Th17 effector cell response to a predominant infiltration by regulatory T-cells*. Int J Cancer. **132**(5): p. 1070-9. (IF: **5,444**, z roku **2013**)

9.3 Publikace bez IF v recenzovaných časopisech ve vztahu k disertační práci

Špíšek R, **Kocián P**, Rožková D., *Imunitní systém a kontrola nádorového bujení*. Postgraduální medicína. **11**(2): s. 186-195. (z roku **2009**)

Kocián P, Šedivcová M, Drgáč J, Černá K, Hoch J, Kodet R, Bartůňková J, Špíšek R, Fialová A., *[K-ras mutational status and tumour-infiltrating lymphocytes in human colon cancer: state of the art and future perspectives]*. Rozhl Chir. **91**(8): p. 427-32. (z roku **2012**)

9.4 Abstrakta v recenzovaných sbornících ve vztahu k disertační práci

Kocián P, Budínský V, Králíková P, Bartůňková J, Hoch J, Špíšek R., *Methodology of analysis of tumor-infiltrating immune cells in human colorectal cancer by slide-based scanning cytometry.*

Conference Information: Colorectal Congres, December 3-6, 2008, St. Gallen, Switzerland (**z roku 2008**)

Kocián P, Fialová A, Šedivcová M, Drgáč J, Hoch J., *Lze přesněji predikovat klinický osud pacientů s kolorektálním karcinomem? Vyšetření mutací genu KRAS a imunitních buněk infiltrujících nádorovou tkáň jako slibný prognostický faktor.*

Sborník abstrakt: Krčský chirurgický den: kolorektální karcinom – úspěchy a problémy, 22. září 2011, Praha, Chateau St. Havel. V Tribunu EU vyd. 1. Brno: Tribun EU, 2011, 106 s. ISBN 978-80-263-0037-3. (**z roku 2011**)

Kocián P, Šedivcová M, Drgáč J, Hoch J, Špíšek R., *Are we able to identify high-risk patients in human colorectal cancer? KRAS mutational status in combination with patterns of tumor-infiltrating immune cells as a powerful outcome predictor.*

Conference Information: European Colorectal Congres, 29th November – 2nd December, 2011, St. Gallen, Switzerland (**z roku 2011**)

Kocián P, Fialová A, Šedivcová M, Drgáč J, Hoch J., *K-ras mutace a TILs u kolorektálního karcinomu, současnost a výhledy.*

Konference: IX. Motolské dny, 13-14. března, 2012, Praha
Sborník přednášek, 28 s. (**z roku 2012**)