

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetik a virologie



**Mgr. Jan Musil**

**Modulace nádorového mikroprostředí a její vliv na imunoterapii  
nádorů**

Modulation of the tumor microenvironment and the impact on cancer  
immunotherapy

Disertační práce

Školitelka: RNDr. Šárka Němečková, DrSc.

Praha 2015



**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu

V Praze

Podpis

# Poděkování

Děkuji své školitelce Dr. Šárce Němečkové za její podporu a skvělé odborné vedení. Chtěl bych rovněž poděkovat Dr. Michalu Šmahelovi za poskytnutí příležitosti podílet se na projektu přípravy a testování DNA vakcíny proti legumainu.

Mé díky patří rovněž Dr. Kamile Žůrkové, která vedla mé první kroky v laboratoři a měla velkou trpělivost při vysvětlování laboratorních metod. Chtěl bych dále z celého srdce poděkovat Dr. Ludě Kutinové za její pomoc s přípravou rekombinantních virů vakcinie a za její krásný metodický přístup. Mé díky patří rovněž dalším kolegům z laboratoře rekombinantních vakcín za vytvoření přátelského prostředí.

V neposlední řadě děkuji své rodině a přítelkyni za podporu, kterou mi poskytli v těžkých chvílích mého studia a při přípravě této práce.

# OBSAH

ABSTRAKT.....	1
SUMMARY .....	2
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	3
<b>1. ÚVOD.....</b>	<b>11</b>
<b>2. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....</b>	<b>12</b>
2.1. EXTRACELULÁRNÍ MATRIX A JEJÍ ROLE V REGULACI KANCEROGENEZE .....	12
2.1.1. Mechanické vlastnosti ECM, integrinová signalizace a jejich význam pro nádorový růst .....	13
2.1.1.1. Integrinová signální transdukce a její vliv na růst nádorů .....	16
2.1.2. Degradace ECM a její význam pro růst nádorů .....	17
2.1.2.1. Růstové faktory interagující s ECM a jejich uvolňování remodelačními enzymy .....	18
2.1.2.2. Role matrikinů v angiogenezi a nádorovém růstu.....	22
2.1.2.3. Modulace protinádorové imunitní odpovědi fragmenty ECM a remodelačními enzymy .....	23
2.1.2.3.1. Matrikiny, fragmenty ECM modulující imunitní odpověď.....	24
2.1.2.3.2. Modulace imunitní odpovědi metzincinovými proteázami.....	25
2.2. BUNĚČNÉ KOMPONENTY NÁDOROVÉHO MIKROPROSTŘEDÍ.....	28
2.2.1. Buňky mezenchymálního původu.....	28
2.2.1.1. Mezenchymální kmenové buňky .....	28
2.2.1.1.1. Inhibice imunitního systému.....	29
2.2.1.1.2. Podpora nádorového růstu a tvorby metastáz .....	30
2.2.1.1.3. Diferenciace MSC na jiné buněčné typy nádorového mikroprostředí .....	31
2.2.1.2. Fibroblasty asociované s nádory .....	32
2.2.1.2.1. Podíl CAF na remodelaci ECM .....	32
2.2.1.2.2. CAF podporují nádorový růst a tvorbu metastáz .....	33
2.2.1.2.3. CAF potlačují protinádorovou imunitu.....	34
2.2.2. Buňky imunitního systému.....	36
2.2.2.1. Lymfocyty .....	39
2.2.2.1.1. $\alpha\beta$ -T-lymfocyty .....	39
2.2.2.1.1.1. $CD4^+$ T-lymfocyty .....	40
2.2.2.1.1.1.1. $T_H1$ lymfocyty.....	41
2.2.2.1.1.1.2. $T_H2$ lymfocyty.....	43
2.2.2.1.1.1.3. $T_H9$ lymfocyty.....	46
2.2.2.1.1.1.4. $T_H17$ lymfocyty.....	48
2.2.2.1.1.1.5. Regulační T-lymfocyty .....	52
2.2.2.1.1.1.5.1. nTreg .....	53
2.2.2.1.1.1.5.2. iTreg .....	55
2.2.2.1.1.1.5.3. Role Treg v nádorovém mikroprostředí .....	57
2.2.2.1.1.2. $CD8^+$ lymfocyty .....	61
2.2.2.2. Makrofágy asociované s nádory.....	67
2.2.2.2.1. Úloha TAM v angiogenezi, růstu a diseminaci nádorů.....	70
2.2.2.2.2. Imunosupresivní účinek TAM .....	72
2.2.2.2.3. Terapie cílené proti TAM .....	73
<b>3. CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>75</b>
<b>4. MATERIÁLY A METODY .....</b>	<b>76</b>
4.1. RESTRIKČNÍ ENZYMY A DNA LIGÁZA.....	76
4.2. STANDARDY MOLEKULOVÝCH HMOTNOSTÍ.....	76
4.3. SYNTETICKÉ OLIGONUKLEOTIDY .....	76
4.4. PEPTIDY .....	76
4.5. CHEMIKÁLIE .....	77
4.6. PROTILÁTKY .....	77
4.7. POKUSNÁ ZVÍŘATA.....	77

4.8. PLAZMIDY .....	78
4.9. BUNĚČNÉ LINIE .....	80
4.10. VIRY .....	81
4.10.1. Práce s viry .....	81
4.10.1.1. Plaková purifikace .....	81
4.10.1.2. Plaková titrace .....	82
4.10.1.3. Příprava virové suspenze .....	82
4.10.2. Příprava rekombinantních virů nesoucích IGFBP-3.....	83
4.10.2.1. Rekombinace .....	83
4.10.2.2. Selektce rekombinantních virů .....	83
4.10.3. Frakcionace virionů VACV .....	84
4.10.4. Neutralizační test rekombinantních VACV .....	84
4.10.5. Test virové adsorpce .....	84
4.10.6. Analýza virové replikace in vivo pomocí qPCR .....	84
4.11. DETEKCE IGFBP-3 TESTEM ELISA .....	85
4.12. PROTEINOVÁ ELEKTROFORÉZA (SDS-PAGE) A WESTERN-BLOT .....	85
4.13. PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE .....	86
4.13.1. Detekce fosfatidylserinu ve virionech rekombinantních VACV .....	86
4.13.2. Identifikace makrofágů asociovaných s nádory.....	87
4.14. POKUSY IN VIVO.....	87
4.14.1. Histologická analýza nádorů .....	87
4.14.2. Imunizační pokusy.....	87
4.14.2.1. Imunizace rekombinantními viry vakcinie .....	87
4.14.2.2. Imunizace biolistickou metodou.....	88
4.14.3. Testování buněčné imunity metodou ELISPOT .....	88
4.15. STATISTICKÁ ANALÝZA .....	88
<b>5. VÝSLEDKY .....</b>	<b>89</b>
<b>5.1. MODULACE NÁDOROVÉHO MIKROPROSTŘEDÍ POMOCÍ IGFBP-3 .....</b>	<b>89</b>
5.1.1. Vysoká hladina exprese IGFBP-3 je řízena H5 promotorem .....	89
5.1.2. Inhibice růstu nádorů vysokou expresí IGFBP-3 a imunizací proti E7 onkoproteinu .....	91
5.1.3. Exprese IGFBP-3 zvyšuje T-buněčnou odpověď proti VACV .....	94
5.1.4. Vysoká hladina exprese IGFBP-3 podporuje replikaci rVACV.....	95
5.1.5. IGFBP-3 exprimovaný rekombinantními viry vakcinie je inkorporovaný do intracelulárních maturovaných virionů .....	98
5.1.6. Adsorpce rVACV na buňky je ovlivněna inkorporací IGFBP-3 .....	100
5.1.7. Povrch virionů P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 obsahuje více fosfatidylserinu než povrch virionů P13-SigE7LAMP-TK <sup>-</sup> .....	102
<b>5.2. OVLIVNĚNÍ NÁDOROVÉHO MIKROPROSTŘEDÍ IMUNIZACÍ         PROTI M2-POLARIZOVANÝM MAKROFÁGŮM ASOCIOVANÝM S NÁDORY .....</b>	<b>106</b>
5.2.1. Nádory vyvolané buňkami MK16/ABC obsahují makrofágy .....	106
5.2.2. Optimalizace postupu pro izolaci makrofágů pro průtokovou cytometrii .....	107
5.2.3. Výběr panelu protilátek pro detekci makrofágů .....	109
5.2.4. Nádory MK16/ABC obsahují makrofágy exprimující legumain .....	112
5.2.5. Modifikace aminokyselinové sekvence legumainu snižují jeho stabilitu a mění buněčnou lokalizaci.....	112
5.2.6. Modifikace genu pro legumain zvyšují jeho imunogenost.....	115
5.2.7. Vliv podání CpG na sílu indukované CTL odpovědi .....	118
5.2.8. Deplece Treg anti-CD25 protilátkou zvyšuje imunitní odpověď indukovanou konstrukty nesoucími epitop p30.....	118
5.2.9. Imunizace proti legumainu inhibuje růst nádorů indukovaných buňkami MK16/ABC.....	119
5.2.10. Imunizace proti legumainu neovlivňuje množství makrofágů asociovaných s nádory.....	120
5.2.11. Růst metastáz u myši imunizovaných proti legumainu .....	121

<b>6. DISKUZE</b> .....	<b>122</b>
6.1. VLIV EXPRESE IGFBP-3 NA PROTINÁDOROVOU IMUNOTERAPII.....	122
6.2. IMUNIZACE PROTI M2 POLARIZOVANÝM TAM.....	126
<b>7. ZÁVĚR</b> .....	<b>130</b>
<b>8. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY</b> .....	<b>132</b>
<b>9. PŘÍLOHY</b> .....	<b>191</b>



# Abstrakt

Modulace nádorového mikroprostředí představuje možnost, jak inhibovat růst nádorů a posílit protinádorovou imunitní odpověď. V předložené práci jsme použili pro modulaci nádorového mikroprostředí dvě strategie. Zaprvé, jsme zkonstruovali rVACV ko-exprimující tumor supresorový gen pro vazebný protein typu 3 pro růstové faktory podobné inzulinu (IGFBP-3) a gen kódující fúzní imunogen SigE7LAMP. Exprese IGFBP-3 byla řízena buď časným vakciovým promotorem H5 nebo syntetickým časně/pozdním (E/L) promotorem. Zjistili jsme, že exprese IGFBP-3 řízená H5 promotorem vede k produkci většího množství proteinu než exprese řízená E/L promotorem. Imunizace myši rVACV P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 inhibovala růst nádorů TC-1 efektivněji než imunizace kontrolním virem P13-SigE7LAMP-TK<sup>-</sup>. Zároveň indukovala také silnější odpověď T-lymfocytů proti VACV antigenům. Pozorovali jsme, že vysoká exprese IGFBP-3 vedla ke zvýšení míry replikace viru a to jak *in vitro*, tak *in vivo*, což mělo za následek déletrvající antigenní stimulaci. Vysoká míra produkce IGFBP-3 rovněž korelovala s lepší adsorpcí viru P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 na buňky CV-1 v porovnání s P13-SigE7LAMP-TK<sup>-</sup>. Identifikovali jsme dva rozdíly ve struktuře IMV mezi viry P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 a P13-SigE7LAMP-TK<sup>-</sup>. IMV P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 do své struktury inkorporovaly protein IGFBP-3 a navíc obsahovaly větší množství fosfatidylserinu ve své vnější membráně, což pravděpodobně způsobilo zvýšený příjem těchto IMV buňkami prostřednictvím makropinocytózy. Pro měření obsahu PS jsme použili průtokovou cytometrii, kdy jsme purifikované viriony VACV imobilizovali pomocí protilátek na mikrokuličkách.

Zadruhé, jsme zkonstruovali DNA vakcínu proti asparaginylové endopeptidáze legumain, která je ve vysoké míře exprimována M2 polarizovanými TAM. Pro zvýšení efektivity DNA imunizace proti legumainu, jsme navrhli několik modifikací jeho aminokyselinové sekvence. Tyto zahrnovaly mutagenezi RGD motivu, která vedla k inhibici maturace legumainu a změnu v buněčné lokalizaci. Dále jsme provedli inzerci pomocného epitopu p30 odvozeného od tetanového toxinu, který je schopný aktivovat pomocné CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty. Obě použité modifikace signifikantně posílily imunitní odpověď proti legumainu. Jejich kombinace ovšem další signifikantní zvýšení nepřinesla. DNA vakcinace indukuje T<sub>H</sub>1 i T<sub>H</sub>2 odpověď, z nichž pouze T<sub>H</sub>1 podporuje indukci protinádorové CD8<sup>+</sup> CTL. Pro posílení T<sub>H</sub>1 a CTL odpovědi jsme použili adjuvans CpG-ODN nebo depleci Treg pomocí protilátky proti CD25. Podání CpG-ODN nemělo žádný efekt. Deplece Treg ovšem signifikantně posílila imunitní odpověď indukovanou konstruktem LgmnRGG.TT11. Imunizace za použití LgmnRGG.TT11 byla schopna signifikantně inhibovat růst nádorů, ale neovlivnila tvorbu plicních metastáz ani počet TAM.

# Summary

Modulation of the tumor microenvironment represents a possible way to inhibit cancer growth and enhance anti-cancer immune responses. In the presented work we employ two strategies for tumor microenvironment modulation. Firstly, we have constructed rVACV co-expressing the tumor suppressor gene insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3) and the fusion gene encoding the immunogen SigE7LAMP. The expression of IGFBP-3 was regulated either by the early vaccinia virus H5 promoter or by the synthetic early/late (E/L) promoter. We have shown that expression of IGFBP-3 regulated by the H5 promoter yielded higher amounts of IGFBP-3 protein when compared with the E/L promoter. Immunization with P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 was more effective in inhibiting the growth of TC-1 tumors in mice and elicited a higher T-cell response against VACV-encoded antigens than the control virus P13-SigE7LAMP-TK<sup>-</sup>. We found that high-level production of IGFBP-3 enhanced virus replication both *in vitro* and *in vivo*, resulting in profound antigen stimulation. Production of IGFBP-3 was associated with a higher adsorption rate of P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 to CV-1 cells when compared with P13-SigE7LAMP-TK<sup>-</sup>. We have identified two structural differences between the IMVs of the IGFBP-3 expressing virus P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 and P13-SigE7LAMP-TK<sup>-</sup>. The P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 IMVs incorporate the IGFBP-3 protein and they have elevated phosphatidylserine exposure on the outer membrane that could possibly result in increased uptake of these IMVs via macropinocytosis. The PS content of IMVs was measured by flow cytometry using microbeads covered with immobilized purified VACV virions.

Secondly, we have developed a DNA vaccine against the asparaginyl endopeptidase legumain that is overexpressed in M2-polarized TAM. To enhance the efficacy of DNA immunization against legumain, we performed several modifications of the legumain protein. These include mutagenesis of the RGD motif that resulted in diminished maturation and changed cellular localization of the legumain protein. Furthermore we inserted the p30 helper epitope from the tetanus toxin, which is capable to induce CD4<sup>+</sup> helper T-cells. Both modifications significantly enhanced the immune response against legumain. There was no further significant enhancement of the anti-legumain response when RGD mutation and p30 insertion were combined. DNA vaccination induces both T<sub>H</sub>1 and T<sub>H</sub>2 responses, of which only T<sub>H</sub>1 promotes the induction of anti-tumor CD8<sup>+</sup> CTL. To enhance T<sub>H</sub>1 and CTL responses we used CpG-ODN as adjuvant or depleted Treg using an antibody against CD25. Although administration of CpG-ODN showed no effect, the depletion of Treg significantly enhanced the immune response elicited by LgmnRGG.TT11. We were able to show that immunization using LgmnRGG.TT11 was capable to significantly inhibit tumor growth, but did not inhibit formation of pulmonary metastasis nor altered the amount of TAM.

## Seznam použitých zkratk

ADAM	disintegrin a metaloproteináza
ADAMTS	disintegrin a metaloproteináza s trombospondinovými motivy
ADP	adenosindifosfát
AICD	aktivací indukovaná smrt
AID	aktivací indukovaná cytidin deamináza
Akt	protein kináza B
AML	akutní myeloidní leukemie
AMP	adenosinmonofosfát
AP-1	aktivátorový protein 1
APC	antigen prezentující buňka
Arg-1	arginináza 1
ARHGAP22	Rho GTPázu aktivující protein 22
$\alpha$ -SMA	$\alpha$ aktin hladkého svalstva
ATF	aktivační transkripční faktor
ATP	adenosintrifosfát
Bak	s Bcl2 homologní antagonist/zabiják
BATF	bazický leucinový faktor s motivem leucinového zipu
Bcl	protein B-lymfocytárního lymfomu
Bim	Bcl2 interagující mediátor buněčné smrti
Blimp-1	B-lymfocyty indukovaný maturační protein 1
BMP-1	kostní morfogenní protein 1
BTLA	atenuátor B- a T- lymfocytů
BUdR	5-bromo-2'-deoxyuridin
C1	solubilní core frakce virionu VACV
C2	nesolubilní core frakce virionu VACV
CAF	fibroblasty asociované s nádory
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
Cbl-b	protoonkogen b identifikovaný v Casitas B-lymfomu
CCL	chemokin typu CC
CCR	chemokinový receptor
CD	diferenciační skupina
cFLIP	buněčný protein inhibující apoptózu podobný proteinu FLICE
CIITA	transaktivátor pro MHC II. třídy
c-Maf	buněčný protoonkogen muskuloaponeurotického fibrosarkomu
c-Met	receptor pro hepatocytární růstový faktor

COX	cyklooxygenáza
CREB	vazebný protein pro element odpovídající na cAMP
CSC	nádorové kmenové buňky
CTL	cytotoxické T-lymfocyty
CTLA-4	s cytotoxickými T-lymfocyty asociovaný protein 4
CX3CL	chemokin typu CX3C
CXCL	chemokin typu CXC
CXCR	receptor pro chemokiny typu CXC
DAMP	molekulární motiv asociovaný s nebezpečím
DC	dendritické buňky
DcR3	návnadový receptor 3 pro ligandy z rodiny TNF jako např. FasL
DGKa	diacylglycerolová kináza $\alpha$
DISC	smrt indukující signální komplex
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNAM-1	aktivační receptor NK buněk CD226
DOCK180	dedikátor cytokineze 180 kDa protein
EBP	elastin vazebný protein
ECM	extracelulární matrix
ECP	eozinofilní kationický protein
EGFR	receptor pro epidermální růstový faktor
eIF2a	eukaryotický iniciační faktor 2a
ELMO	protein pohlcování a buněčné motility
EMT	epiteliálně mezenchymální přechod
EOMES	eomesodermin
Erg2	ETS příbuzný gen 2
Erg3	ETS příbuzný gen 3
ERK	kináza regulována extracelulárními signály (MAPK)
FADD	doména indukující buněčnou smrt asociovaná s Fas
FAK	kináza fokální adheze
FAP	protein aktivovaných fibroblastů
FasL	ligand pro Fas
FBS	fetální telecí sérum
FGF	růstový faktor fibroblastů
FGFR	receptor pro FGF
FOXO-1	protein O1 skupiny Forkhead box
FoxP3	protein P3 skupiny Forkhead box

FSC	rozptyl světla v přímém směru
FSP-1	specifický protein fibroblastů 1
GATA-3	GATA vazebný faktor 3
GCN2	nederepresibilní hlavní kontrolní kináza
GIT	protein interagující s kinázou napojenou na G-proteiny
GITR	glukokortikoidy indukovaný TNFR příbuzný protein
GM-CSF	tvorbu kolonií stimuluje faktor pro granulocyty a makrofágy
GRAIL	gen spojený s anergií lymfocytů
GSK-3b	3β kináza glykogen syntázy
HB-EGF	heparin vázající růstový faktor podobný EGF
HGF	hepatocytární růstový faktor
HIF-1α	hypoxií indukovatelný faktor 1 α
HLA	lidský leukocytární antigen
HMGA-2	vysoce mobilní protein 2 s AT háky
HRG	glykoprotein bohatý na histidin
ICAM-1	mezibuněčná adhezivní molekula 1
ICER	časný represor indukovaný cAMP
ID2	DNA vazebný proteinový inhibitor 2
ID3	DNA vazebný proteinový inhibitor 3
IDO	indolamin-2,3-dioxygenáza
IFN	interferon
IGF	inzulinu podobný růstový faktor
IGFBP	vazebný protein pro inzulinu podobné růstové faktory
IGFBP-3	vazebný protein typu 3 pro inzulinu podobné růstové faktory
IGFBP-3R	receptor pro IGFBP-3
IGF-R	receptor pro IGF
IHD-J	kmen VACV International Health Department-J
IKK	IκB kináza
IL	interleukin
IL-12R	receptor pro interleukin 12
IL-13Rα2	receptor α2 pro interleukin 13
IL-15Rα	receptor α pro interleukin 15
IL1-RA	antagonistický receptor pro interleukin 1
IL-1RII	receptor typu II pro interleukin 1
IL-2Rα (CD25)	receptor α pro interleukin 2
IL-6Rα	receptor α pro interleukin 6

ILC	přirozené lymfocyty
ILT-2	imunoglobulinu podobný transkript 2
IMV	intracelulární maturovaný virion
iNOS	indukovaná syntáza oxidu dusnatého
IP	intraperitoneální podání
IRF	interferon regulující faktor
ISGF-3	interferonem stimulovaný genový faktor 3
Itch	E3 ubiquitin ligáza homologní k proteinu Itchy
ITK	IL-2 indukovaná T-lymfocytární kináza
iTreg	indukované regulační T-lymfocyty
Jmjd3	histon demetyláza obsahující Jumonji doménu 3
JNK	c-Jun N-terminální kináza
KIR2DL4	imunoglobulinu podobný receptor NK buněk 2DL4
KLF	transkripční faktor podobný proteinu Krüppel
LAG-3	gen 3 aktivovaných lymfocytů
LAIR-1	s leukocyty asociovaný imunoglobulinu podobný receptor 1
LAP	peptid asociovaný latentním TGF- $\beta$
LG3	globulární doména 3 podobná lamininu
Lgmn	legumain
LgmnCGD	legumain jehož motiv RGD byl zmutován na CGD
LgmnRGG	legumain jehož motiv RGD byl zmutován na RGG
LgmnRGG.TT11	LgmnRGG do jehož sekvence byla vložena delší varianta pomocného epitopu p30
LgmnRGG.TT1s	LgmnRGG do jehož sekvence byla vložena kratší varianta pomocného epitopu p30
Lgmn.TT11	legumain do jehož sekvence byla vložena delší varianta pomocného epitopu p30
Lgmn.TT1s	legumain do jehož sekvence byla vložena kratší varianta pomocného epitopu p30
LLC	velký latentní komplex TGF- $\beta$
LMP2	proteazomová podjednotka $\beta$ 9
LMP7	proteazomová podjednotka $\beta$ 8
LTBP	vazebný protein pro latentní komplex TGF- $\beta$
M	membránová frakce virionu VACV
MAGE-A1	s melanomy asociovaný antigen A1
MAP3K	kináza kinázy mitogenem aktivované protein kinázy

MAPK	mitogenem aktivovaná protein kináza
MCL-1	indukovaný diferenciační protein myeloidních leukemických buněk
M-CSF	tvorbu kolonií stimulující faktor pro makrofágy
MDSC	supresorové buňky myeloidního původu
MECL-1	proteazomová podjednotka $\beta$ 10
MEK	kináza mitogenem aktivované protein kinázy
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
MICA	protein A příbuzný MHC I. třídy
MICB	protein B příbuzný MHC I. třídy
miRNA	mikro RNA
MMP	matrixová metaloproteináza
MOI	multiplicita infekce
Mrc-1	manózový receptor makrofágů
MSC	mezenchymální kmenové buňky
mTOR	savčí cíl rapamycinu
Mx	matrixová frakce virionu VACV
MyD88	protein primární odpovědi způsobující myeloidní diferenciaci
NFAT	jaderný faktor aktivovaných T-lymfocytů
NF- $\kappa$ B	jaderný faktor $\kappa$ B
NK	přirozeně cytotoxické lymfocyty
NKG2D	aktivační receptor NK buněk
NKp	protein NK buněk
NO	oxid dusnatý
NOTCH	homolog proteinu notch
Nrp-1	neuropilin-1
nTreg	přirozené regulační T-lymfocyty
P13	VACV klon 13 kmene Praha
P13-E/L-IGFBP-3	P13 do jehož genu pro TK, byl vložen gen IGFBP-3 pod kontrolou E/L promotoru
P13-H5-IGFBP-3	P13 do jehož genu pro TK, byl vložen gen IGFBP-3 pod kontrolou H5 promotoru
P13-preS2S	P13 do jehož genu pro TK, byl vložen gen pro povrchový anitgen viru HBV preS2S
P13-SigE7LAMP	P13 do jehož lokusu F7L byl vložen fúzní protein SigE7LAMP
P13-SigE7LAMP-E/L-	P13-SigE7LAMP do jehož genu pro TK, byl vložen gen

IGFBP-3	IGFBP-3 pod kontrolou E/L promotoru
P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3	P13 do jehož genu pro TK, byl vložen gen IGFBP-3 pod kontrolou E/L promotoru
P13-SigE7LAMP-TK	P13-SigE7LAMP jehož gen pro TK, byl přerušen vložením 100 bp odvozených od 11K promotoru VACV
p130	130 kDa protein
p65	65 kDa protein
PAK1	proteinem p21 aktivovaná kináza 1
PAMP	molekulární motiv asociovaný s patogeny
PC-1	proprotein konvertáza 1
PCAF	S CBP asociovaný faktor
PD-1	protein 1 programované buněčné smrti
PDGF	destičkami produkovaný růstový faktor
PDGFR	receptor pro PDGF
PDK1	protein kináza, jejíž funkce je závislá na fosfoinositidech
PD-L1	ligand 1 pro PD1
PD-L2	ligand 2 pro PD1
PFU	plaky tvořící jednotky
PGE2	prostaglandin E2
PI3K	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát 3 kináza
PIP3	fosfatidilinositoltrifosfát
PIX	s PAK interagující výměnný faktor
PKA	protein kináza A
PKC-θ	proteinová kináza C typu θ
PLC-γ	fosfolipáza C typu γ
PPAR	peroxizomovou proliferací aktivovaný receptor
PS	fosfatidylserin
PTEN	fosfatázový a tenzinový homolog
PUMA	modulátor apoptózy jehož exprese je zvýšena proteinem p53
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RAR	receptor pro kyselinu retinovou
RBP-Jκ	vazebný protein pro J-κ rekombinační signál
RGD motiv	motiv tvořený aminokyselinami argininem, glycinem, kyselinou asparagovou
RICTOR	vůči rapamycinu nesenzitivní společník mTOR

RIPK-1	kináza 1 proteinu interagujícího s receptorem
ROCK	protein kináza asociovaná s Rho
ROR	receptor příbuzný RAR
Runx	s Runt příbuzný transkripční faktor
rVACV	rekombinantní virus vakcinie
SC	subkutánní podání
SH2 doména	doména homologní se Src 2
sHLA-G	sekretovaný lidský leukocytární antigen typu G
SHP-1	fosfatáza 1 obsahující doménu homologní se Src oblastí 2
SigE7LAMP	fúzní protein tvořený signální sekvencí pro endoplazmatické retikulum, sekvencí E7 onkoproteinu HPV16 a sekvencí s lysozomy asociovaného membránového proteinu
SLC	malý latentní komplex TGF- $\beta$
SOCS	supresor cytokinových signálních proteinů
Spi-6	inhibitor serinových proteáz 6
SSC	rozptyl světla v kolmém směru
STAT	signální převaděč a aktivátor transkripce
TAM	makrofágy asociované s nádory
TAP	transportér antigenních peptidů
T-bet	transkripční T-boxový faktor 21
TCF-1	T-lymfocytární faktor 1
T <sub>CM</sub>	centrální paměťové buňky T-lymfocytů
TCR	receptor T-lymfocytů
T <sub>EFF</sub>	efektorové T-lymfocyty
T <sub>EM</sub>	efektorové paměťové buňky T-lymfocytů
TERT	telomerázová reverzní transkriptáza
TF	transkripční faktor
TGF- $\beta$	transformující růstový faktor $\beta$
T <sub>H</sub> 1	pomocný T-lymfocyt typu 1
T <sub>H</sub> 17	pomocný T-lymfocyt typu 17
T <sub>H</sub> 2	pomocný T-lymfocyt typu 2
T <sub>H</sub> 9	pomocný T-lymfocyt typu 9
TIR	doména homologní mezi TLR a IL-1R
TK	tymidin kináza
TLL-1	protein 1 podobný Tolloиду
TLR-4	receptor 4 podobný proteinu Toll

TNF- $\alpha$	faktor $\alpha$ nekrotizující nádory
TNFR	receptor pro TNF
Tr1	regulační T-lymfocyt 1
TRADD	doména indukující buněčnou smrt asociovaná s receptorem pro TNF
TRAF-2	faktor 2 asociovaný receptorem pro TNF
Treg	regulační T-lymfocyt
TRIF	TIR doménu obsahující adaptorový protein indukující IFN- $\beta$
TSC1	protein tuberózní sklerózy 1
T <sub>SCM</sub>	paměťové kmenové buňky T-lymfocytů
TSG-6	protein TNF stimulovaného genu 6
TSLP	thymový stromální lymfopoietin
TSP-1	thrombosponidin 1
TT	tetanový toxin
ULBP	vazebný protein pro UL16
uPA	urokinázový typ plazminogenového aktivátoru
VCAM-1	adhezivní molekula 1 vaskulárních buněk
VEGF	vaskulární a endoteliální růstový faktor
VEGFR-3	receptor 3 pro VEGF
WR	kmen VACV Western Reserve
YAP	protein asociovaný s proteinem Yes

# 1. Úvod

V současné době byla navržena celá řada imunizačních postupů, které umožňují indukovat imunitní odpověď proti antigenům exprimovaným nádorovými buňkami. Velkým pokrokem posledních let je především rozmach různých forem RNA vakcín a dostupnost nové generace sekvenačních technologií označovaných jako Next Generation Sequencing (NGS), které umožnily rozvoj personalizované léčby nádorů. Ta spočívá v identifikaci mutací v genomu nádorových buněk, které se vyskytují v úsecích proteinů, které mohou být prezentovány na MHC molekulách I. a II. třídy daného jedince. Genové sekvence kódující mutované úseky jsou následně transkribovány do RNA. Ta je pak základem personalizovaných vakcín. Může být např. vpravena do maturovaných DC, které jsou následně injikovány pacientovi. Základem těchto metod je teorie, která předpokládá, že tolerance proti tělu vlastním antigenům, zajištěna Treg, se nemohla proti mutovaným úsekům vytvořit. Zároveň nemohly být v rámci negativní selekce v thymu odstraněny T-lymfocyty rozpoznávající mutované peptidy. Ačkoliv jsou do personalizovaných protinádorových vakcín vkládány velké naděje, jedná se i v tomto případě o redukcionistický přístup, který opomíjí fakt, že nádory jsou komplexní, orgánům podobné struktury. Protinádorové T-lymfocyty interagují s jednotlivými komponentami nádorového mikroprostředí, což může vést k inhibici jejich funkce.

Jistou možností, jak posílit protinádorovou imunitní odpověď představuje použití protilátek proti inhibičním receptorům T-lymfocytů. Velkým milníkem z tohoto hlediska byl rok 2011, kdy americký úřad pro kontrolu léčiv FDA schválil použití protilátky proti CTLA-4 (Ipilimumab) pro léčbu melanomů. V roce 2014 pak následovalo schválení dvou protilátek proti PD-1. Použití těchto protilátek umožňuje reaktivaci vyčerpaných T-lymfocytů v nádorovém mikroprostředí, které následně mohou opět zabít nádorové buňky. Použití protilátek proti CTLA-4, PD-1 a dalším inhibičním receptorům skýtá ovšem také rizika. Ta spočívají v aktivaci autoreaktivních T-lymfocytů, které mohou zahájit autoimunitní onemocnění. Podání Ipilimumabu např. může vést k indukci závažných zánětů především v trávicí soustavě. Předmětem vědeckého zkoumání je také, co se s reaktivovanými T-lymfocyty následně děje. Dá se totiž předpokládat, že reaktivované vyčerpané T-lymfocyty po jisté době upadají do senescence či umírají. Bylo například pozorováno, že na podání anti-PD-1 protilátky odpovídají reaktivací pouze T-lymfocyty se střední expresí PD-1, naopak T-lymfocyty s vysokou expresí nejsou reaktivovány. Dále byli pozorováni pacienti, u nichž nedochází k infiltraci nádorů T-lymfocyty. V takových případech má podání anti-PD1 a anti-CTLA-4 silně omezený účinek.

Přes výše zmíněné pokroky, je třeba dále prostudovat interakce mezi imunitním systémem a komponentami nádorového prostředí a identifikovat regulační dráhy, jejichž rozrušení umožní posílit protinádorovou imunitní odpověď. Výsledkem by pak mohla být efektivní imunoterapie schopná eliminovat nádory nebo alespoň kontrolovat jejich růst a tvorbu metastáz.

## 2. Literární přehled

Solidní nádory nepředstavují pouze shluk transformovaných nádorových buněk, ale jedná se ve své podstatě o organizované struktury podobné orgánům. Jako takové jsou tvořeny různými komponentami, které zabezpečují růst a expanzi nádorových buněk, a také únik před imunitním systémem. Nádorové prostředí obsahuje nebuněčné, buněčné a subcelulární komponenty. Nebuněčné složky nádorového mikroprostředí představují extracelulární matrix, sekretované enzymy, růstové faktory, cytokiny a různé metabolity produkované stromálními a nádorovými buňkami. Buněčná složka je představována mezenchymálními buňkami (např. fibroblasty), buňkami imunitního systému a buňkami podílejícími se na tvorbě cév zásobujících nádor živinami, jako např. endoteliální buňky a pericyty. Další složkou jsou subcelulární komponenty, které zahrnují exozomy a jiné membránové mikrovezikuly hrající nezanedbatelnou roli v mezibuněčné komunikaci. Všechny tyto složky spolu interagují za vzniku celé řady pozitivních zpětnovazebných smyček posilujících nádorový růst.

Jelikož podrobná charakterizace všech komponent nádorového prostředí je nad rámec této práce, budou v následujícím textu probrány komponenty, které nejsou v souvislosti s imunoterapií tak často zmiňovány, jako např. extracelulární matrix a fibroblasty. Z hlediska imunitního systému budou probrány především T-lymfocyty, jelikož představují základ buněčné odpovědi a dají se ovlivnit imunizací. Z vrozené imunity budou popsány pouze makrofágy asociované s nádory, proti nimž byla připravena DNA vakcína zmíněná v této práci.

### 2.1. Extracelulární matrix a její role v regulaci kancerogeneze

Základní složkou mikroprostředí všech orgánů je ECM. Jedná se o síť tvořenou proteiny, proteoglykany a glykoproteiny, která určuje mechanické vlastnosti orgánů. Ačkoliv se složení ECM liší dle daného orgánu, můžeme rozlišit dva funkční druhy ECM, bazální membránu a intersticiální matrix. Bazální membrána představuje speciální druh ECM, který slouží především k oddělení endoteliálních či epiteliálních buněk od nitra orgánů. Vnitřek orgánů je pak vyplněn intersticiální ECM, která udává rigiditu orgánů. Tyto druhy ECM se liší zastoupením makromolekulárních komponent. Zatímco bazální membrána je tvořena především lamininy, kolagenem IV, entaktinem/nidogenem a proteoglykany, intersticiální ECM obsahuje především makromolekuly fibrilárního kolagenu, fibronektinu a proteoglykanů (Egeblad *et al.*, 2010). Z hlediska funkce orgánů není ECM pouhým lešením, ale plní i další funkce, jako je modulace diferenciací buněk a buněčného růstu. Děje se tak díky interakcím s růstovými faktory, jako např. FGF, VEGF, PDGF a IGF (Rapraeger *et al.*, 1991;

Yayon *et al.*, 1991; Park *et al.*, 1993; Fager *et al.*, 1992; Fager *et al.*, 1992; Arai *et al.*, 1996; Bernfield *et al.*, 1999). Kromě růstových faktorů existuje celá řada cytokinů a chemokinů, které se mohou vázat na komponenty ECM. Nejznámějším příkladem cytokinu vázajícího se na ECM je TGF- $\beta$ , jehož vazba je spojena s regulací jeho biologické funkce (Taipale *et al.*, 1994; Lyon *et al.*, 1997). Mezi příklady dalších cytokinů vázajících se na různé složky ECM patří INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 a GM-CSF (Lortat-Jacob a Grimaud, 1991; Tufvesson a Westergren-Thorsson, 2002; Najjam *et al.*, 1998; Alvarez-Silva a Borojevic, 1996). V neposlední řadě mohou složky ECM interagovat s buněčnými receptory, jejichž nejznámějším příkladem jsou integriny. Tyto mohou svou signalizací následně také přispívat k ovlivnění růstu a diferenciaci. Objevují se náznaky, že ECM je významnou složkou niky kmenových buněk, která se podílí na udržování kmenovosti a asymetrickém buněčném dělení (Garcion *et al.*, 2004; Bi *et al.*, 2007; O'Reilly *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2012).

Je tedy evidentní, že v rámci udržování vnitřní homeostázy orgánů, musí být i složení ECM správně regulováno. Ačkoliv by se mohlo zdát, že ECM je rigidní komponentou orgánů, není tomu tak. Naopak, ECM je vysoce dynamickou strukturou, jejíž složení je ovlivněno buňkami, které se v ní nachází. Součástí procesů vedoucích k tvorbě nádorů je také proces remodelace ECM, který umožňuje růst a expanzi nádorů do okolních tkání.

### **2.1.1. Mechanické vlastnosti ECM, integrinová signalizace a jejich význam pro nádorový růst**

Mechanické vlastnosti ECM zahrnují vlastnosti jako je pevnost, elasticita, porozita, uspořádání fibril a další. Informace o mechanických vlastnostech ECM buňkám zprostředkovávají integriny. Z hlediska struktury se jedná o heterodimerní receptory, které jsou tvořené jednou  $\alpha$  podjednotkou a jednou  $\beta$  podjednotkou. Lidský genom kóduje celkem 18  $\alpha$  a 8  $\beta$  podjednotek, jejichž kombinacemi vzniká 24 různých integrinů (Humphries *et al.*, 2006). Integriny vytvářejí základ adhezivních komplexů, ve kterých vytvářejí platformu pro vazbu dalších proteinů. Tyto následně spouštějí kaskádu změn, kdy se váží další a další proteiny, což vede k tvorbě maturovaných fokálních adhezivních spojů, podozomů nebo invadomů (Geiger *et al.*, 2001; Linder a Aepfelbacher, 2003; Spuul *et al.*, 2014). Z hlediska signalizace jsou důležité cytoplazmatické domény integrinů, se kterými interaguje více než 156 různých molekul (Zaidel-Bar *et al.*, 2007). U solidních nádorů často dochází ke zvýšení tuhosti ECM v důsledku zvýšené produkce kolagenů (Zhu *et al.*, 1995; Kaupilla *et al.*, 1998). Zároveň se mění struktura uspořádání kolagenových vláken z relaxovaných fibril na orientované svazky. To je dáno zvýšenou aktivitou enzymu lysyl oxidázy, která sesítovává jednotlivé kolagenové molekuly. Svazky kolagenů následně vytvářejí cesty, po nichž mohou nádorové buňky pronikat do okolní

tkáně. Dále toto umožňuje shlukování integrinových molekul a zvýšení integrinové signalizace, která v nádorových buňkách hraje celou řadu rolí (Provenzano *et al.*, 2006; Levental *et al.*, 2009). Jednou z nich je funkce mechanoreceptoru, kdy jsou v důsledku tuhosti tkáně nádorové buňky vystaveny působení různých sil, jako je např. tah. Tyto jsou vnímány prostřednictvím integrinů a mohou vést ke zvýšení invazivity ve směru působení mechanické síly (Menon a Beningo, 2011). Příkladem molekuly sloužící jako mechanosenzor může být talin. Při aktivaci integrinů dochází k vazbě molekuly talinu k intracelulární doméně integrinové podjednotky  $\beta$  (Calderwood *et al.*, 1999; Tadokoro *et al.*, 2003). Kromě toho talin interaguje s aktinem a zprostředkovává prvotní spojení mezi integrinem a aktinovým cytoskeletem (Muguruma *et al.*, 1990; Hemmings *et al.*, 1996; Jiang *et al.*, 2003; Giannone *et al.*, 2003). V důsledku působení mechanických sil je molekula talinu natahována, což vede ke změně prostorového uspořádání její tyčovité domény (Lee *et al.*, 2007; Gingras *et al.*, 2005). Ta je tvořena  $\alpha$ -helixy, v nichž jsou ukryta vazebná místa pro vinculin, jehož vazba na talin dále stabilizuje spojení mezi integriny a aktinovým cytoskeletem (del *et al.*, 2009; Papagrigoriou *et al.*, 2004; Fillingham *et al.*, 2005). Následně je celá vazba dále stabilizována vazbou  $\alpha$ -aktininu schopného interakce s vinculinem (Kroemker *et al.*, 1994). Působení síly je tak předáno přímo na aktinový cytoskelet.

S talinem nebo přímo s integriny interaguje fokální adhezivní kináza (FAK), která rovněž funguje jako mechanosenzor (Chen *et al.*, 1995; Schaller *et al.*, 1995; Frame *et al.*, 2010; Lawson *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2001). Je zodpovědná za obrat komponent fokální adheze a tím ovlivňuje migraci a invazivitu buněk (Ren *et al.*, 2000; Webb *et al.*, 2004; Hsia *et al.*, 2003). Toto je ilustrováno na faktu, kdy delece FAK vede ke zpomalení migrační rychlosti a naopak její zvýšená exprese stimuluje buněčnou migraci (Ilic *et al.*, 1995; Cary *et al.*, 1996). Migrace je řízena především regulací malých Rho GTPáz, které ovlivňují dynamiku aktinového cytoskeletu. Příkladem jedné z drah ovlivňujících migraci může být aktivace GTPázy Rac, jež se podílí na tvorbě lamelopodia. Ve směru působení mechanické síly dochází v důsledku shlukování integrinů k přitahování FAK, která je následně aktivována a vytváří komplex s kinázou c-Src (Frame *et al.*, 2010). Ve vzniklém komplexu je FAK dále fosforylována c-Src, což umožňuje vazbu p130Cas, který je po vazbě rovněž fosforylován c-Src. Fosforylovaný p130 je následně rozpoznán SH2 doménou adaptorového proteinu Crk. Vzniká tak komplex p130-Crk, na který se váží další adaptorové proteiny DOCK180 a ELMO fungující jako guanin-nukleotid výměnné faktory pro Rac-1 (Lee *et al.*, 2014). Ve výsledku tak na vedoucí straně buňky dochází k hromadění aktivovaného Rac-1 a tvorbě lamelopodia.

Další mechanickou vlastností, která může ovlivňovat migraci nádorových buněk, je vnitřní uspořádání ECM a to především velikost pórů. Limitujícím faktorem migrace buněk je schopnost deformovat buněčné jádro. Pokud je ECM příliš hustá a póry jsou příliš malé, mohou buňky v dané oblasti uvíznout (Wolf *et al.*, 2013). Nádorové buňky mají k dispozici dva

migrační fenotypy, mezi kterými mohou volně přecházet. Prvním z nich je mezenchymální migrační fenotyp, který silně připomíná migraci fibroblastů. Těla buněk pohybujících se mezenchymálním způsobem mají protáhlý vřetenovitý tvar a vychází z nich jedno nebo více lamelopodií. Migrace je řízena integrinovou signalizací, kdy po vazbě integrinů na ECM dochází k aktivaci signálních drah FAK-p130Cas-Crk-DOCK180 a paxillin-GIT-PIX, které následně vedou k rekrutování GTPázy Rac do čela migrující buňky (Cary *et al.*, 1998; Kiyokawa *et al.*, 1998; Nayal *et al.*, 2006). Aktivace Rac následně vede k tvorbě lamelopodia a inhibici GTPázy RhoA, která je vyžadována až v pozdějších fázích tvorby adhezní struktury (Sander *et al.*, 1999; Ridley *et al.*, 1992). Charakteristická je zejména přísná prostorová kontrola aktivity jednotlivých typů GTPáz, v různých částech buňky jsou aktivní jiné molekuly. Do čela migrujících buněk jsou také rekrutovány enzymy schopné degradovat ECM, jako např. membránově vázaná metaloproteináza 14 (Wang a McNiven, 2012). Remodelační enzymy umožňují degradovat a remodelovat vlákna ECM, která by překážela buňce v migraci a překonat tak i velmi hustou ECM s malými póry. Mezenchymálně se pohybující buňky vytváří cesty v ECM, které následně mohou být použity následujícími nádorovými buňkami při hromadné migraci (Wolf *et al.*, 2007).

Druhou možností migrace je améboidní migrační fenotyp, který se od mezenchymálního typu migrace liší v několika ohledech. Zaprvé je to molekulární aparát nutný pro řízení pohybu. Zatímco mezenchymální buňky se spoléhají na integrinovou signalizaci, je exprese integrinů u améboidních buněk snížena. S tím je spojena i snížená fosforylace dalších signálních molekul jako kináza FAK (Carragher *et al.*, 2006). Améboidní buňky také nevyužívají aktivace GTPázy Rac pro formování lamelopodií, ale dochází u nich k aktivaci GTPázy Rho A. Ta následně aktivuje kinázu ROCK, která fosforyluje lehký řetězec myosinu a tím ovlivňuje kontrakci aktinového kortexu (Sahai a Marshall, 2003; Wyckoff *et al.*, 2006). Vznikají tak výběžky tzv. bleby, pomocí kterých se buňka protahuje skrz póry ECM. Druhý zásadní rozdíl spočívá v tom, že améboidní buňky nevyužívají enzymy degradující ECM, ale dochází zde k deformaci ECM v důsledku síly generované aktomyozinem (Wolf *et al.*, 2003; Wyckoff *et al.*, 2006; Rosel *et al.*, 2008).

Nádorové buňky mohou mezi mezenchymálním a améboidním způsobem migrace volně přecházet. Zdá se, že důležitou roli v rozhodování by mohla hrát právě vnitřní architektura ECM (Provenzano *et al.*, 2008; Ulrich *et al.*, 2009). Hustá ECM s úzkými póry podporuje mezenchymální typ migrace, díky silné integrinové signalizaci, která aktivuje signální dráhy směřující k aktivaci GTPázy Rac. Ta následně inaktivuje GTPázu Rho, čímž je blokován améboidní způsob migrace (Sander *et al.*, 1999). Naopak ECM s nižší rigiditou a většími póry vede ke snížení integrinové signalizace, zakulacení buňky a aktivaci signální dráhy Rho-ROCK, která vede k aktivaci proteinu ARHGAP22 zvyšujícímu GTPázovou funkci Rac a tím i jeho

inaktivaci (Sanz-Moreno *et al.*, 2008). Ve výsledku tak dochází k blokování mezenchymálního druhu migrace.

### **2.1.1.1. Integrinová signální transdukcce a její vliv na růst nádorů**

ECM může přes integrinovou signalizaci kooperovat s růstovými faktory a podporovat růst nádorů. Receptory pro růstové faktory jsou směřovány do míst fokální adheze, kde dochází k jejich shlukování a vytváření signalizační platformy (Plopper *et al.*, 1995; Miyamoto *et al.*, 1996; Sundberg a Rubin, 1996). V důsledku aktivace integrinů jsou zde receptory pro růstové faktory fosforylovány, což posiluje a prodlužuje jejich schopnost aktivovat navazující signální dráhy. (Miyamoto *et al.*, 1996; Roovers *et al.*, 1999; Schneller *et al.*, 1997; Jones *et al.*, 1997; Moro *et al.*, 1998; Moro *et al.*, 2002). Existuje několik bodů, ve kterých se signální dráhy integrinů a receptorů pro růstové faktory překrývají. Jedním z nich je kináza FAK, která asociuje s integriny, ale také celou řadou receptorů pro růstové faktory jako např. EGFR, c-Met, PDGFR a VEGFR-3 (Sieg *et al.*, 2000; Chen a Chen, 2006; Garces *et al.*, 2006). Po vazbě integrinů k ligandům je FAK aktivována autofosforylací na Tyr 397 (Lipfert *et al.*, 1992). Na regulaci aktivace FAK kinázy se kromě integrinů mohou podílet také růstové faktory, jako je tomu např. u EGF, PDGF a HGF (Sieg *et al.*, 2000; Matsumoto *et al.*, 1994). FAK následně pomáhá aktivovat kinázu c-Src a to tak, že se váže na její SH2 doménu, čímž stabilizuje aktivní konformaci Src (Schaller *et al.*, 1994). Aktivovaná Src následně fosforyluje FAK a dává tak vzniknout signalizačnímu komplexu Src-FAK (Calalb *et al.*, 1995; Calalb *et al.*, 1996). Ten pak podporuje růst a migraci nádorových buněk aktivací Ras-MEK-MAPK a PI3K-Akt dráhy (Aguirre Ghiso 2002; Reiske *et al.*, 1999). Src-FAK komplex aktivuje MAPK dráhu prostřednictvím PAK1 kinázy, která fosforyluje kinázu MEK1 představující další bod překřížení mezi signálními drahami integrinů a růstových faktorů. Ačkoliv může být MEK1 fosforylována na základě signalizace růstových faktorů přes aktivaci Ras, je signalizace vycházející ze Src-FAK komplexu nezbytná pro předání signálu na MAPK (Slack-Davis *et al.*, 2003).

Aktivace Akt dráhy se děje prostřednictvím interakce aktivované FAK kinázy s p85 podjednotkou PI3K (Chen a Guan, 1994; Chen *et al.*, 1996; Reiske *et al.*, 1999). V důsledku aktivace PI3K dochází k tvorbě PIP3, na který se může vázat kináza PDK1. Ta následně aktivuje Akt fosforylací na Thr308 (Alessi *et al.*, 1997). Na aktivaci Akt se zřejmě podílí také kináza ILK, která se váže s integriny a je schopna také vázat RICTOR, komponentu mTORC2 komplexu. Společně pak aktivují Akt fosforylací Ser473 (McDonald *et al.*, 2008).

## 2.1.2. Degradace ECM a její význam pro růst nádorů

Extracelulární matrix v průběhu růstu a vývoje nádorů mění své složení v procesu tzv. remodelace, na kterém se podílejí dva základní procesy. Prvním z nich je proces syntézy ECM, kdy je prostředí obohacováno o komponenty podporující nádorový růst a expanzi, jako např. kolageny (Zhu *et al.*, 1995; Kauppila *et al.*, 1998; Levental *et al.*, 2009). Druhým procesem je degradace. V nádorech je ve zvýšené míře přítomna celá řada enzymů, které degradují složky ECM - např. heparanázy, endosulfatázy, serinové proteázy jako urokináza a cysteinové proteázy jako např. katepsiny rodiny C1 (Ogishima *et al.*, 2005; Ogishima *et al.*, 2005; Morimoto-Tomita *et al.*, 2005; Lemjabbar-Alaoui *et al.*, 2010; Swiercz *et al.*, 1998; Fisher *et al.*, 2001; Podgorski *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006). Pro degradaci ECM jsou nejvýznamnější proteázy z metzincinové nadrodiny. Jedná se o nadrodinu zinkových proteáz, která se vyznačuje přítomností konzervovaného motivu HEXXHXXGXXH v aktivním místě (Stocker *et al.*, 1995; Gomis-Ruth 2009). Metzinciny můžeme dále rozdělit na několik menších rodin. První a nejstarší rodinou, která byla objevena, jsou MMP (GROSS a LAPIERE, 1962). V lidském genomu je kódováno 23 MMP, z nichž jsou některé sekretované a jiné jako např. MMP14 membránově vázané (Nagase *et al.*, 2006). Druhou rodinou jsou tzv. adamlyziny, které zahrnují 2 skupiny proteáz, a ADAM a ADAMTS (Hite *et al.*, 1992; Wolfsberg *et al.*, 1995; Kuno *et al.*, 1997). V současné době je známo 21 proteáz ADAM, z nichž některé jsou sekretované a jiné membránově vázané, a 19 proteáz ADAMTS, z nichž jsou všechny pouze solubilní (Brocker *et al.*, 2009). Do metzincinové rodiny patří také serralyziny a astaciny (Stocker *et al.*, 1995; Gomis-Ruth 2009).

Metzincinové proteázy štěpí řadu různých komponent ECM. Zvýšení jejich exprese je součástí procesu EMT, který je prvním krokem v procesu metastazování (Jouanneau *et al.*, 1991; Jechlinger *et al.*, 2003). Hlavně představitelé matrixových metaloproteináz se podílejí na rozvolňování okolní ECM a tvorbě cestiček, po kterých pak dochází k hromadné migraci nádorových buněk (Wolf *et al.*, 2007). Zároveň jsou významnými hráči v degradaci bazální laminy, což je krok nezbytný pro průnik nádorových buněk do krevního řečiště a následně jejich extravazaci do míst, kde vzniknou metastázy (Hotary *et al.*, 2006; Ota *et al.*, 2009). Jelikož tvorba metastáz je hlavní příčinou úmrtí u pacientů s onkologickým onemocněním, byla vkládána velká naděje do vývoje inhibitorů MMP. Přes nadějně výsledky v preklinických studiích, žádný z nich úspěšně neprošel v klinických testech, ve kterých buď nebyl pozorován žádný efekt, nebo jejich podání dokonce vedlo ke zhoršení onemocnění (Coussens *et al.*, 2002). Selhání inhibitorů MMP může být dáno nejméně dvěma faktory. Zaprvé, některé MMP mohou za určitých okolností mít protinádorový efekt, jako bylo pozorováno u MMP-8, MMP-12 a MMP-26 (Balbin *et al.*, 2003; Houghton *et al.*, 2006; Savinov *et al.*, 2006). Za druhé, nádorové buňky mohou přejít na

alternativní améboidní způsob migrace, který nevyžaduje proteolytickou aktivitu (Wolf *et al.*, 2003).

Degradace ECM a enzymy, které se na ní podílejí, mohou mít i další funkce. Degradací ECM enzymy mohou z ECM uvolňovat a následně také aktivovat růstové faktory. Degradací ECM jsou vytvářeny kryptické fragmenty, které mohou hrát roli v regulaci neoangiogeneze a nádorové migrace. Některé z fragmentů mohou ovlivňovat také charakter imunitní odpovědi. Degradací enzymy mohou rovněž přispívat k modulaci protinádorové imunitní odpovědi štěpením cytokinů a cytokinových receptorů, popř. jiných významných molekul.

### **2.1.2.1. Růstové faktory interagující s ECM a jejich uvolňování remodelačními enzymy**

Celá řada růstových faktorů interaguje s komponentami ECM. Nejčastěji dochází k vazbě na heparansulfát, jako je tomu u FGF, VEGF, PDGF-A, PDGF-B, HB-EGF, HGF, TGF- $\beta$  (Faham *et al.*, 1996; Park *et al.*, 1993; Fager *et al.*, 1992; Fager *et al.*, 1992; Raines a Ross, 1992; Higashiyama *et al.*, 1991; Mizuno *et al.*, 1994; McCaffrey *et al.*, 1992). V některých případech se růstové faktory váží na ECM prostřednictvím různých vazebných proteinů (Taipale *et al.*, 1994; Taipale *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 1993; Booth *et al.*, 1995). Z hlediska růstových faktorů plní jejich vazba na ECM několik funkcí. Zaprvé, vazbou na ECM dochází ke stabilizaci růstových faktorů a jejich ochraně před proteolytickou degradací (Saksela *et al.*, 1988; Damon *et al.*, 1989). To umožňuje vytvořit rezervoár, který v případě nutnosti rychle uvolňuje růstové faktory, jako např. při poranění (Schultz a Wysocki, 2009). Díky vazbě na ECM je také regulována jejich biologická aktivita, kdy vázané růstové faktory mají nižší aktivitu než faktory volné. V některých případech ovšem může být vazba na ECM vyžadována pro správnou signalizaci. Známým příkladem z tohoto hlediska je FGF, který vyžaduje pro vazbu na svůj receptor FGFR vazbu heparansulfátu jako kofaktoru (Rapraeger *et al.*, 1991; Yayon *et al.*, 1991). V jiných případech může vazba na ECM zabránit rychlé internalizaci komplexu ligand-receptor a tak prodlužovat signalizaci, popř. může docházet k posílení signalizace díky současnému spuštění integrinové signalizace (Taipale a Keski-Oja, 1997; Kuemmerle, 2006). V nádorovém mikroprostředí je zvýšena aktivita proteolytických enzymů, jako jsou MMP a ADAM. Proteolýza v tomto případě může sloužit ke zvýšení množství volných růstových faktorů nebo může vést k jejich aktivaci uvolněním z neaktivního komplexu. Příkladem růstového faktoru, který je uvolňován z ECM a tím je zvyšována jeho biologická dostupnost, je VEGF (Bergers *et al.*, 2000). VEGF je významný růstový faktor, který se podílí na procesech angiogeneze v nádorech. Kromě role v angiogenezi bylo popsáno, že je schopný také ovlivňovat indukci protinádorové imunitní odpovědi (Gabrilovich *et al.*, 1996; Mimura *et al.*, 2007). Je exprimován v několika izoformách

v důsledku alternativního sestřihu mRNA. Jednotlivé izoformy se liší svou schopností vázat se na heparansulfátové proteoglykany (Park *et al.*, 1993). Pokusy na modelech lidského ovariálního karcinomu ukázaly, že MMP-9 a do jisté míry MMP-2 dokáže uvolňovat VEGF z ECM (Belotti *et al.*, 2003). Uvolněné VEGF indukuje migraci endoteliálních buněk a tak podporuje angiogenezi (Bergers *et al.*, 2000). Matrixové metaloproteinázy dokáží také modulovat signalizaci štěpením vlastního VEGF. Bylo pozorováno, že MMP-3 štěpí VEGF a odděluje přitom matrix vazebnou doménu od receptor vazebné domény. Vzniklý fragment je schopný aktivovat VEGFR2, ale mění se charakter signálu, kdy kratší fragment podporuje endoteliální proliferaci, zatímco delší forma VEGF podporuje morfogenezi kapilár (Lee *et al.*, 2005). Příkladem růstových faktorů, které s ECM interagují prostřednictvím vazebných proteinů, jsou TGF- $\beta$  a IGF-I. TGF- $\beta$  je růstový faktor a cytokin, který hraje v nádorovém prostředí dvě zcela odlišné role. V rané fázi nádorového vývoje funguje jako supresor nádorového růstu. V pozdějších fázích se ovšem jeho inhibiční účinek ztrácí a exprese TGF- $\beta$  růst naopak podporuje (Pardali a Moustakas, 2007). Změna v odpovědi nádorových buněk na TGF- $\beta$  je dána několika faktory. Nádorové buňky mohou v průběhu času ztratit komponenty signalizačních drah aktivovaných TGF- $\beta$ , které vedou k inhibici buněčného růstu a apoptóze (Levy a Hill, 2006). Dále se na modulaci efektu TGF- $\beta$  zřejmě může podílet ECM. Nádorové buňky rostoucí na rigidnější ECM mají zvýšenou aktivitu PI3K/Akt dráhy, což inhibuje indukci apoptózy pomocí TGF- $\beta$  (Leight *et al.*, 2012). Kromě efektu na nádorové buňky TGF- $\beta$  ovlivňuje buňky nádorového stromatu, kdy podporuje proliferaci MSC a jejich diferenciaci na CAF (Jian *et al.*, 2006; Shangguan *et al.*, 2012). Významnou měrou se podílí také na inhibici protinádorové imunitní odpovědi, kdy podporuje diferenciaci supresivních populací leukocytů, jako např. T<sub>reg</sub> a M2 makrofágů (Chen *et al.*, 2003; Gong *et al.*, 2012). U člověka se vyskytují 3 izoformy TGF- $\beta$ , které jsou exprimované jako propeptid. Během sekrece dochází k odštěpení prodomény, která ovšem zůstává s aktivním TGF- $\beta$  nekovalentně asociována v podobě peptidu asociovaného s latencí (LAP) (Miyazono *et al.*, 1988; Young a Murphy-Ullrich, 2004). Tento SLC následně pomocí disulfidických můstků asociuje s jedním ze 4 LTBP, který je příbuzný fibrilinům (Kanzaki *et al.*, 1990; Moren *et al.*, 1994; Yin *et al.*, 1995; Saharinen *et al.*, 1998). Vzniká tak LLC, prostřednictvím něhož je TGF- $\beta$  vázán do ECM. LTBP je schopný interagovat s fibrilinem-1, což vede k asociaci LLC s mikrofibrilami (Isogai *et al.*, 2003). Mikroskopická pozorování dále ukázala kolokalizaci LTBP s fibronectinem, kdy dochází k interakci pomocí domény vázající fibronectin v N-koncové části LTBP (Koli *et al.*, 2005; Kantola *et al.*, 2008). Kromě fibronectinu může LTBP interagovat také s heparansulfátovými proteoglykany jako např. perlekanem, díky několika heparin-vazebným doménám (Parsi *et al.*, 2010). Uskladnění LLC v ECM představuje hlavní mechanismus regulující aktivitu TGF- $\beta$ . Základním krokem zahajujícím signalizaci prostřednictvím TGF- $\beta$  musí být tedy jeho uvolnění z latentního

komplexu. Na tomto procesu se podílejí významnou měrou matrixové metaloproteinázy. Jako první dochází k uvolnění LLC z ECM a rozštěpení LTBP pomocí MMP-2, MMP-3 a MMP-9 (Dallas *et al.*, 2002; Maeda *et al.*, 2002). Tím je uvolněn SLC, ve kterém je TGF- $\beta$  inaktivován vazbou LAP peptidu. V dalším kroku může dojít k rozštěpení peptidu LAP pomocí MMP-2, MMP-9 a MMP13 (Yu a Stamenkovic, 2000; Dallas *et al.*, 2002). Alternativně se může SLC navázat na integriny prostřednictvím LAP peptidu, který je následně rozštěpen membránově vázanou MMP-14 (Mu *et al.*, 2002). Uvolněný TGF- $\beta$  je již aktivní a může se vázat na své receptory.

Dalším významným příkladem, kdy se ECM a remodelační enzymy podílejí na regulaci biologické aktivity je IGF a systém jeho vazebných proteinů. IGF jsou primárně produkovány v játrech a následně uvolňovány do krevního oběhu (Froesch *et al.*, 1985). Dle potřeby mohou být exprimovány také v jiných buňkách jako např. fibroblastech (Tavakkol *et al.*, 1992). IGF-I a IGF-II jsou důležité pro růstové procesy v těle a pro proces organogeneze (Powell-Braxton *et al.*, 1993). Interakcí s IGF-R aktivují PI3K a MAPK dráhy, prostřednictvím kterých buňky získávají promototické a antiapoptotické signály (Meinbach a Lokeshwar, 2006). Četná pozorování ukazují, že IGF hrají také významnou roli ve vývoji nádorů, kdy dochází ke zvýšení jejich exprese. Zvýšená exprese IGF či receptoru IGF-R byla pozorována např. v nádorech prsu, slinivky břišní a plic (Yee *et al.*, 1989; Bergmann *et al.*, 1995; Minuto *et al.*, 1986; Weroha a Haluska, 2012). Transgenní myši, které ve zvýšené míře exprimují lidský IGF-I v epidermis, se vyznačují epidermální hyperplazií, což zvyšuje jejich náchylnost k tvorbě nádorů (Bol *et al.*, 1997). Hladina IGF je v těle regulována systémem vysoko- a nízko-afinitních vazebných proteinů (Kim *et al.*, 1997). IGFBP váže růstové faktory IGF a chrání je před degradací při transportu v krvi (Zapf *et al.*, 1979). Mezi nejvýznamnější regulátory aktivity patří IGFBP-3, který se vyznačuje vysokou vazebnou afinitou k IGF. Ta mu umožňuje vyvazovat IGF dokonce i z IGF-R, čímž snižuje aktivitu IGF-R stimulované MAPK a Akt dráhy (Clemmons 1997). Ve struktuře IGFBP-3 se nacházejí 2 vazebné domény pro heparin, které zprostředkovávají jeho interakci s ECM a umožňují tak lokalizovat navázané inaktivované IGF do ECM (Fowlkes a Serra, 1996; Yamanaka *et al.*, 1999). Pro aktivaci IGF je nutné jeho uvolnění z komplexu IGF-IGFBP-3. I v tomto případě hrají důležitou roli metzincinové proteázy. *In vitro* pokusy odhalily, že metaloproteinázy MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9 a MMP-19 sekretované nádorovými buňkami a fibroblasty štěpí IGFBP-3, což vede k uvolnění IGF, které následně aktivuje prorůstovou signalizaci přes IGF-R (Fowlkes *et al.*, 1994; Miyamoto *et al.*, 2004; Manes *et al.*, 1999; Sadowski *et al.*, 2003). Kromě MMP se na degradaci IGFBP-3 mohou podílet také proteázy z rodiny ADAM, konkrétně ADAM-12 a ADAM-28 (Loechel *et al.*, 2000; Mitsui *et al.*, 2006; Mochizuki *et al.*, 2004). I ostatní IGFBP jsou substráty celé řady metzincinových proteáz viz. Tab.1.

Degradace IGFBP-3 nemá pouze význam v uvolňování IGF, ale je důležitá také z hlediska jeho funkcí, které nejsou závislé na IGF. Tyto zahrnují vazbu IGFBP-3 na IGFBP-3R a následnou aktivaci kaspázy-8, která přes aktivaci kaspáz 3 a 7 indukuje apoptózu, ale také způsobuje degradaci p65-NFκB, čímž snižuje expresi angiogenních faktorů VEGF a IL-8 (Ingermann *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2011; Han *et al.*, 2011). IGFBP-3 je dále internalizován různými endocytickými drahami (Micutkova *et al.*, 2012). Přes endozom-lyzozomální kompartment se IGFBP-3 dostává k jádru, do kterého je transportován prostřednictvím importinu β (Schedlich *et al.*, 2000). V jádře interaguje s celou řadou vazebných partnerů, což vede k zastavení buněčného cyklu v G1 fázi nebo indukci apoptózy (Kim *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2005).

**Tabulka 1: Štěpení IGFBP metzincinovými proteázami**

Vazebný protein pro IGF	Proteáza	Citace
IGFBP-1	MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-11	(Manes <i>et al.</i> , 1997), (Nakamura <i>et al.</i> , 2005)
IGFBP-2	MMP-1, MMP-7	(Rajah <i>et al.</i> , 1996), (Nakamura <i>et al.</i> , 2005)
IGFBP-3	MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-19, ADAM-12, ADAM-28	(Fowlkes <i>et al.</i> , 1994), (Miyamoto <i>et al.</i> , 2004), (Manes <i>et al.</i> , 1999), (Nakamura <i>et al.</i> , 2005), (Sadowski <i>et al.</i> , 2003), (Loechel <i>et al.</i> , 2000), (Mitsui <i>et al.</i> , 2006), (Mochizuki <i>et al.</i> , 2004)
IGFBP-4	MMP-7	(Nakamura <i>et al.</i> , 2005)
IGFBP-5	MM-1, MMP-2, MMP-7, ADAM-9, ADAM-12	(Thraillkill <i>et al.</i> , 1995), (Nakamura <i>et al.</i> , 2005), (Mohan <i>et al.</i> , 2002), (Loechel <i>et al.</i> , 2000)
IGFBP-6	MMP-7	(Nakamura <i>et al.</i> , 2005)

### 2.1.2.2. Role matrikinů v angiogenezi a nádorovém růstu

Degradace ECM proteolytickými enzymy jako jsou např. katepsiny, MMP, vede k tvorbě fragmentů, které mají biologickou aktivitu zcela odlišnou od původní makromolekuly. Těmto fragmentům se říká matrikiny, popř. matrikryptiny (Schor a Schor, 2001; Davis *et al.*, 2000). Jejich funkce sahají od modulace angiogeneze, buněčné migrace až po modulaci imunitní odpovědi, která bude diskutována v následující kapitole.

Největší a také nejznámější skupinu představují matrikiny odvozené od kolagenů a to především endostatin. Endostatin je 20 kDa protein, který byl poprvé izolován z kondiciovaného média EOMA buněk a identifikován jako inhibitor endoteliální proliferace *in vitro* a angiogeneze *in vivo* (O'Reilly *et al.*, 1997). Strukturální analýza následně odhalila, že tento fragment je shodný s NC1 doménou kolagenu XVIII. Endostatin vzniká na základě proteolytického štěpení kolagenu XVIII prostřednictvím katepsinu L a MMP-3,-9,-12,-13-20 a v menší míře také MMP-2 a MMP-14 (Felbor *et al.*, 2000; Ferreras *et al.*, 2000). Endostatin se váže na integriny, popř. na glypikany, což indukuje rozsáhlé změny v genové expresi, jejichž výsledkem je inhibice proliferace a migrace endoteliálních buněk, což je spojeno s inhibicí angiogeneze (Sudhakar *et al.*, 2003; Karumanchi *et al.*, 2001; Abdollahi *et al.*, 2004). Dále bylo pozorováno, že endostatin může inhibovat MMP-2 (Kim *et al.*, 2000). Kromě endostatinu byla identifikována celá řada dalších matrikinů odvozených od kolagenu, které se vyznačují antiangiogenní funkcí, jako např. arresten, tumstatin, vastatin a restin (Colorado *et al.*, 2000; Petitclerc *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2001; Ramchandran *et al.*, 1999). Ne všechny fragmenty odvozené od kolagenů mají protinádorové a antiangiogenní účinky. Bylo pozorováno, že MMP-9 a v menší míře MMP-2 vyštěpují z kolagenu IV fragment, který angiogenezi a nádorový růst podporuje (Xu *et al.*, 2001; Hangai *et al.*, 2002).

Proteolytická produkce antiangiogenních fragmentů byla pozorována také u jiných makromolekul ECM. Jedním z prvních identifikovaných fragmentů s antiangiogenním účinkem schopným inhibovat tvorbu metastáz je angiostatin (O'Reilly *et al.*, 1994). Jedná se o fragment plazminogenu, který vzniká jeho štěpením MMP-12 a v menší míře také MMP-7 a MMP-9 (Cornelius *et al.*, 1998). Dalším angiostatickým fragmentem je endorepelin (Mongiat *et al.*, 2003). Jedná se o doménu V proteoglykanu perlekanu, která je z něj uvolňována katepsinem L (Cailhier *et al.*, 2008; Iozzo a Sanderson, 2011). Endorepelin se váže prostřednictvím integrinu  $\alpha 2\beta 1$  na endoteliální buňky, což vede k rozpadu fokálních adhezivních spojů. Ve výsledku toto vede k inhibici migrace endoteliálních buněk a tím pádem i angiogeneze (Bix *et al.*, 2004). Kromě vazby na integriny se endorepelin může vázat na VEGFR-2 a blokovat jeho aktivaci prostřednictvím vazby VEGF-A (Willis *et al.*, 2013). Díky těmto vlastnostem je endorepelin schopný inhibovat růst nádorů *in vivo* (Bix *et al.*, 2006). I endorepelin může být dále proteolyticky štěpen prostřednictvím metaloproteináz BMP-1 a

TLL-1. Proteolýza vede k uvolnění domény LG3, která je také biologicky aktivní (Gonzalez *et al.*, 2005).

Kromě regulace angiogeneze byly pozorovány matrikiny, které jsou schopné ovlivňovat migraci nádorových buněk. Příkladem toho mohou být fragmenty odvozené od lamininů. Bylo pozorováno, že MMP-14 a MMP-2 uvolňují z molekuly lamininu-5 doménu III, která je podobná EGF. Tato doména se tak může vázat na EGFR, což vede k aktivaci EGFR signalizace, jejímž výsledkem je indukce buněčné migrace (Koshikawa *et al.*, 2000; Schenk *et al.*, 2003; Koshikawa *et al.*, 2005). Další metaloproteinázou schopnou štěpit laminin 5 je MMP-19. Fragmenty generované MMP-19 mění integrinovou signalizaci a indukují migraci epiteliálních buněk (Sadowski *et al.*, 2005). V současné době byla identifikována celá řada peptidů odvozených od různých lamininů, které podporují růst nádorových buněk, tvorbu metastáz a angiogenezi (Kusuma *et al.*, 2011; Nascimento *et al.*, 2011; Conway *et al.*, 2013; Kikkawa *et al.*, 2013).

Další makromolekulou ECM, od níž mohou být odvozeny biologicky aktivní fragmenty, je fibronectin. Fibronectin může být proteolyticky degradován MMP-9, což vede k uvolnění 120 kDa fragmentu, který se prostřednictvím svého RGD motivu váže na  $\alpha 5\beta 1$  a  $\alpha \beta 6$  integrin. Vazba fragmentu na  $\alpha \beta 6$  integrin stimuluje migraci buněk a vytváří zpětnovazebnou smyčku dalším zvýšením exprese MMP-2 a MMP-9 (Al-Hazmi *et al.*, 2007). Kromě migrace mohou fragmenty fibronectinu ovlivňovat také angiogenezi a tvorbu metastáz. První z angiostatických fragmentů je fibstatin, který byl identifikován na základě své schopnosti vázat FGF-2. Vazbou FGF-2 fibstatin inhibuje růst endoteliálních buněk, což je spojeno s jeho schopností blokovat angiogenezi a růst nádorů *in vivo* (Bossard *et al.*, 2004). Druhým fragmentem je anastellin. Ten díky inhibici RAS/MEK/MAPK dráhy blokuje vstup endoteliálních buněk do S-fáze a tak blokuje angiogenezi, růst nádorů a tvorbu metastáz (Yi a Ruoslahti, 2001; Ambesi *et al.*, 2005; Ambesi a McKeown-Longo, 2009).

### **2.1.2.3. Modulace protinádorové imunitní odpovědi fragmenty ECM a remodelačními enzymy**

Buňky imunitního systému, které pronikají do nádorů, se nevyhnutelně musí setkat s komponenty ECM. Ty v nádorech prochází intenzivní přestavbou katalyzovanou sekretovanými proteolytickými enzymy. Ukazuje se, že i proces remodelace může přispívat k tomu, jak bude vypadat imunitní odpověď v nádorech. Modulace imunity se děje dvěma mechanismy, produkcí matrikinů a proteolytickou aktivitou metzincinových proteáz.

### 2.1.2.3.1. Matrikiny, fragmenty ECM modulující imunitní odpověď

Matrikiny mohou mít chemotaktické vlastnosti a mohou přitahovat určitý druh leukocytů. Z hlediska indukce chemotaxe mohou být stejně účinné jako specializované chemokiny. Příkladem takového chování může být 7S doména kolagenu IV, která se váže na EBP a funguje jako chemoatraktant pro neutrofilů (Senior *et al.*, 1989). Expres EBP byla prokázána také na ostatních leukocytech (Larbi *et al.*, 2005). Chemotaxe zprostředkovaná matrikiny může být prováděna také prostřednictvím klasických chemokinových receptorů. Bylo pozorováno, že acetylovaný peptid Pro-Gly-Pro, který vzniká štěpením kolagenu I proteázami MMP-8 a MMP-9, se váže na chemokinové receptory CXCR-1 a CXCR-2 a mimikuje tak funkci CXCL-8 (Weathington *et al.*, 2006; Braber *et al.*, 2011). Také integrinová signalizace se podílí na chemoatrakci. Příkladem je matrixový protein entactin, který funguje jako chemoatraktant pro neutrofilů (Senior *et al.*, 1992).

Kromě kolagenových fragmentů a peptidů byla identifikována celá řada peptidů odvozených od lamininů, které mohou fungovat jako chemoatraktanty pro neutrofilní granulocyty a makrofágy (Adair-Kirk *et al.*, 2003; Mydel *et al.*, 2008). Dalším zdrojem matrikinů je matrixový protein elastin. Jeho fragmenty generované MMP-12 fungují jako chemoatraktanty pro monocyty a makrofágy (Senior *et al.*, 1980; Senior *et al.*, 1984; Houghton *et al.*, 2006). Kromě chemoatrakce je elastin také zdrojem matrikinů, které mohou ovlivňovat indukci imunitní odpovědi. Bylo pozorováno, že fragmenty elastinu mohou indukovat expresi cytokinů jako IL-1 $\beta$  a IFN- $\gamma$ , čímž podporují diferenciaci T-lymfocytů směrem k T<sub>H</sub>1 fenotypu (Debret *et al.*, 2005; Debret *et al.*, 2006).

I jiné makromolekuly ECM mohou ovlivňovat imunitní odpověď. Zajímavým příkladem může být modulace imunitní odpovědi hyaluronanem. Výsledek stimulace je v tomto případě závislý na velikosti fragmentu. Vysokomolekulární hyaluronan, jako znak intaktní a funkční tkáně, je protizánětlivý a snižuje expresi zánětlivých cytokinů (Nakamura *et al.*, 2004). Má také výrazné účinky na Treg, kdy díky sesíťování CD44 podporuje expresi TF FoxP3, který je nepostradatelný pro udržení regulačního fenotypu (Bollyky *et al.*, 2009). Kromě toho posiluje schopnost Treg suprimovat expanzi efektorových T-lymfocytů (Bollyky *et al.*, 2007). Vysokomolekulární hyaluronan může skrze signalizaci přes CD44 ovlivnit i diferenciaci T-lymfocytů, kdy podporuje vznik Tr1 regulačních T-lymfocytů produkujících IL-10 (Bollyky *et al.*, 2011). Naopak nízkomolekulární fragmenty hyaluronanu, fungující jako znak poškozené a zanícené tkáně, jsou schopné aktivovat monocyty, makrofágy a dendritické buňky, ve kterých indukují produkci chemokinů a prozánětlivých cytokinů (de la Motte *et al.*, 2009; Noble *et al.*, 1993; McKee *et al.*, 1996; Hodge-Dufour *et al.*, 1997; Termeer *et al.*, 2000). Na aktivaci se podílí jak signalizace z CD44, tak aktivace signálních drah vycházejících z TLR-4 (Taylor *et al.*, 2007; Termeer *et al.*, 2002). Kromě sekrece cytokinů a chemokinů indukují nízkomolekulární fragmenty hyaluronanu expresi matrixových metaloproteináz, které mohou

přispívat k remodelaci ECM a uvolňování dalších bioaktivních fragmentů (Horton *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 2007). Podobně jako fragmenty hyaluronanu mohou produkci zánětlivých cytokinů a MMP indukovat také fragmenty fibronektinu a lamininů (Beezhold a Personius, 1992; Lopez-Moratalla *et al.*, 1995; Marom *et al.*, 2007; Xie *et al.*, 1993; Adair-Kirk *et al.*, 2003).

#### **2.1.2.3.2. Modulace imunitní odpovědi metzincinovými proteázami**

Metzincinové proteázy jsou schopny ovlivňovat protinádorovou imunitní odpověď několika způsoby. Prvním z nich je tvorba chemokinových gradientů. Celá řada chemokinů interaguje se složkami ECM a její degradace vede k mobilizaci chemokinů. Příkladem může být odštěpování ektodomény transmembránového proteoglykanu syndekanu-1 MMP-7, které vede k mobilizaci asociovaného CXCL-1 a následné infiltraci neutrofilních granulocytů (Li *et al.*, 2002). Kromě toho může docházet také k mobilizaci membránově vázaných chemokinů, jako CX<sub>3</sub>CL-1 a CXCL-16. Ty jsou z povrchu buněk uvolňovány působením ADAM-10 (Hundhausen *et al.*, 2007; Scholz *et al.*, 2007).

I samotné chemokiny mohou sloužit jako substrát pro proteolytické štěpení, jehož výsledkem může být jejich inaktivace, zvýšení biologického účinku nebo generování antagonistických fragmentů. Příkladem inaktivace chemokinů prostřednictvím MMP je CXCL-12, který hraje roli v procesech nádorové neoangiogeneze a tvorby metastáz (Mirshahi *et al.*, 2000; Phillips *et al.*, 2003). CXCL-12 je proteolyticky štěpen především MMP-2, ale také MMP-1, -3, -9, -13, -14. Dochází přitom k odstranění N-koncového tetrapeptidu, který je důležitý pro vazbu na receptor CXCR4 (McQuibban *et al.*, 2001). Podobně štěpení chemokinů CXCL-1, CXCL-4, CXCL-5 a CXCL-7 prostřednictvím MMP-9 vede k jejich inaktivaci (Van Den Steen *et al.*, 2000; Van Den Steen *et al.*, 2003). Naopak štěpení IL-8 proteinázami MMP-8, MMP-9 a MMP-14 vede ke zvýšení jeho chemotaktické aktivity (Van Den Steen *et al.*, 2000; Tester *et al.*, 2007; Tam *et al.*, 2004). Posledním možným produktem štěpení chemokinů jsou jejich antagonistické deriváty. Nejznámějším příkladem je CCL-7, který je štěpen MMP-1,-2,-3,-13 a MMP-14, a jehož sestřižená varianta inhibuje chemotaxi a zánět (McQuibban *et al.*, 2000). Podobně jako u CCL-7 dochází také při proteolytickém štěpení CCL-8 a CCL-13 proteázami MMP-1 a MMP-3 ke vzniku kratších antagonistů (McQuibban *et al.*, 2002).

Stejně jako chemokiny, mohou být proteolyticky štěpeny i některé cytokiny. Výsledkem tohoto štěpení může být aktivace, jako to již bylo popsáno v procesu uvolňování TGF- $\beta$  z latentního komplexu v kapitole 2.1.2.1. Jiným příkladem může být IL-1 $\beta$ . Ten je produkován jako inaktivní prekurzor, který je aktivován odstraněním N-koncové části. Hlavním aktivátorem IL-1 $\beta$  je kaspáza 1, ale práce na myších postrádajících kaspázu 1 odhalily, že k aktivaci IL-1 $\beta$  může docházet i alternativním mechanismem (Thornberry *et al.*, 1992; Fantuzzi *et al.*, 1997).

Toto bylo potvrzeno pozorováním na lidských keratinocytech, které neexprimují aktivní kaspázu 1 (Nylander-Lundqvist *et al.*, 1996). Později se ukázalo, že pro-IL-1 $\beta$  může být štěpen a tedy aktivován MMP-2, -3 a -9 (Schonbeck *et al.*, 1998). Na druhou stranu, maturovaný IL-1 $\beta$  může být dále štěpen MMP-1, MMP-2, MMP-3 a MMP-9, což vede k jeho inaktivaci (Ito *et al.*, 1996). Metzincinové proteázy se také podílejí na uvolňování membránově vázaných cytokinů. Příkladem je TNF- $\alpha$ , který je produkován jako membránově vázaný homotrimer. Ve své membránově vázané podobě může interagovat s TNFR-2 a zprostředkovávat signály přímým buněčným kontaktem. V určitých případech je ovšem vyžadována sekrece v solubilní podobě. Ta vzniká především díky funkci ADAM-17, který odštěpuje extracelulární doménu membránového TNF- $\alpha$  (Black *et al.*, 1997; Moss *et al.*, 1997). Na produkci sekretovaného TNF- $\alpha$  se mohou podílet i jiné proteázy jako např. ADAM-19, MMP-7, MMP-12 a MMP-13 (Zheng *et al.*, 2004; Haro *et al.*, 2000; Churg *et al.*, 2003; Vandembroucke *et al.*, 2013).

Cytokinová signalizace může být alternativně regulována odštěpením cytokinových receptorů z povrchu buňky. Může tak docházet ke generování solubilních forem receptorů, jako např. IL-1RII, IL-6R $\alpha$  a IL-15R $\alpha$  (Reddy *et al.*, 2000; Althoff *et al.*, 2000; Mortier *et al.*, 2004). Tyto solubilní receptory mohou mít zachovanou vazebnou aktivitu vůči cytokinům a fungovat jako pasti, do kterých jsou cytokiny vychytávány (Arend *et al.*, 1994; Mortier *et al.*, 2004). Alternativně mohou sekretované proteázy ovlivňovat schopnost leukocytů infiltrujících do nádorů reagovat na cytokinové podněty. Základním bodem v indukci adaptivní imunitní odpovědi je prezentace antigenu na antigen prezentujících buňkách, jako např. prezentace prostřednictvím DC. Ty následně produkcí cytokinových signálů určují, jaký typ imunitní odpovědi bude vyvolán. Bylo zjištěno, že MMP-2 je schopna degradovat receptor pro IFN I. třídy na povrchu DC, které tak nereagují na přítomnost IFN- $\beta$  a následně nejsou schopny produkovat IL-12 potřebný pro indukci protektivní T<sub>H</sub>1 odpovědi. Místo toho indukují v naivních T-lymfocytech diferenciaci v zánětlivý T<sub>H</sub>2 fenotyp (Godefroy *et al.*, 2011). Ani správně polarizované T-lymfocyty nejsou chráněny před působením sekretovaných proteáz. Nádorové buňky mohou produkovat MMP-9, která z povrchu aktivovaných T-lymfocytů odštěpuje receptor IL-2R $\alpha$  (CD25), což vede ke snížení jejich proliferačních schopností (Sheu *et al.*, 2001).

Kromě cytokinových receptorů mohou být z povrchu prostřednictvím metzincinových proteáz uvolňovány i jiné molekuly důležité pro funkci imunitního systému. Stresované, viry infikované a nádorové buňky exprimují povrchové molekuly MICA, MICB a ULBP-2, které jsou příbuzné MHC molekulám I. třídy. Tyto molekuly jsou rozpoznávány aktivačním receptorem NKG2D exprimovaným NK buňkami a cytotoxickými T-lymfocyty. Nádorové buňky obcházejí imunitní rozpoznání zprostředkované NKG2D odvrhováním MICA, MICB a ULBP, které je zprostředkováno štěpením metzincinovými proteázami (Waldhauer *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2010; Boutet *et al.*, 2009; Waldhauer a Steinle, 2006). Nádorové buňky exprimují

celou řadu dalších povrchových molekul, které mohou být rozpoznány NK buňkami. Jednou z nich je molekula B7-H6, která interaguje s aktivačním receptorem NKp30 (Brandt *et al.*, 2009). Nedávný výzkum ukázal, že i B7-H6 je z povrchu nádorových buněk odštěpována, a to pomocí ADAM-10 a ADAM-17 (Schlecker *et al.*, 2014).

## 2.2. Buněčné komponenty nádorového mikroprostředí

### 2.2.1. Buňky mezenchymálního původu

#### 2.2.1.1. Mezenchymální kmenové buňky

MSC představují multipotentní kmenové buňky, které se nacházejí primárně v kostní dřeni, kde představují prekurzory buněk formujících kostní dřev, kost a chrupavku (Friedenstein *et al.*, 1987; Haynesworth *et al.*, 1992; Pittenger *et al.*, 1999). Kromě toho se zřejmě podílejí na organizaci niky hematopoetických kmenových buněk (Mendez-Ferrer *et al.*, 2010). MSC mohou být izolovány i z jiných tkání, jako např. z placenty, tukové tkáně, pupečnickové krve (Fukuchi *et al.*, 2004; Zuk *et al.*, 2002; Erices *et al.*, 2000). Jelikož je možné, že se MSC izolované z různých zdrojů částečně liší, v důsledku působení různých extracelulárních prostředí, byla v roce 2006 navržena standardní kritéria pro jejich identifikaci (Dominici *et al.*, 2006). MSC musí za standardních podmínek adherovat k plastovým kultivačním nádobám. Z hlediska exprese povrchových znaků musí exprimovat CD73, CD90 a CD105, ale musí být negativní na CD34, CD45, HLA-DR, CD14, CD11b, CD79a, CD19. Dále musí být schopny *in vitro* diferencovat na osteoblasty, adipocyty a chondroblasty.

Mezenchymální kmenové buňky exprimují také celou řadu chemokinových receptorů, prostřednictvím kterých mohou být mobilizovány a mohou migrovat do míst poranění a zánětu (Dwyer *et al.*, 2007; Ringe *et al.*, 2007). Jelikož je i nádorové mikroprostředí ve své podstatě zánětlivé, patří MSC k buňkám nádorového mikroprostředí. Kromě chemokinových signálů je nádorové prostředí bohaté také na celou řadu růstových faktorů, jako např. PDGF a EGF, které rovněž přitahují MSC (Nakamizo *et al.*, 2005; Spaeth *et al.*, 2008). Četná pozorování na modelech nádorů prostaty, tlustého střeva, prsu a melanomech, ukázala, že přítomnost MSC v nádorech podporuje jejich růst (Ye *et al.*, 2012; Jung *et al.*, 2013; Shinagawa *et al.*, 2010; Karnoub *et al.*, 2007; Suzuki *et al.*, 2011). MSC mohou růst nádorů podporovat několika způsoby. První možností je podpora neoangiogeneze (Zhu *et al.*, 2006; Beckermann *et al.*, 2008). Mezenchymální kmenové buňky infiltrující do nádorového mikroprostředí jsou vystaveny působení hypoxie a zánětlivých cytokinů či peptidů (Coffelt *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011). Ukazuje se, že MSC na tyto vnější podněty reagují sekrecí pro-angiogenních faktorů, jako jsou IL-6, IL-8, HGF, TGF- $\beta$ , FGF a hlavně VEGF (Kinnaird *et al.*, 2004; Potier *et al.*, 2007; Beckermann *et al.*, 2008; Crisostomo *et al.*, 2008; Herrmann *et al.*, 2011; Suzuki *et al.*, 2011).

Další možnosti představuje inhibice imunitního systému, podpora tvorby metastáz a diferenciací na komponenty nádorového prostředí. Všechny tyto možnosti budou popsány v samostatných podkapitolách.

### 2.2.1.1.1. Inhibice imunitního systému

Imunitní reakce začíná aktivací vrozené imunity v důsledku rozpoznání PAMP nebo DAMP. Není-li vrozená imunita schopna nebezpečí neutralizovat, jsou antigeny přijímány antigen prezentujícími buňkami, jako jsou makrofágy a DC. Tyto je následně prezentují naivním T-lymfocytům, které jsou na základě obdržených signálů aktivovány a diferencují na efektorové buňky. Ukazuje se, že MSC mohou ovlivňovat všechny kroky, vedoucí k aktivaci adaptivní imunitní odpovědi a tak chránit nádory před zničením. MSC produkují chemokiny, které do nádorů mohou přitahovat monocyty jako např. CCL-3, CCL-4, CCL-12 a CXCL-12, ale následně blokují jejich diferenciaci na DC produkcí IL-6 a PGE<sub>2</sub> (Djouad *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008; Spaggiari *et al.*, 2009; Deng *et al.*, 2014). Navíc sekretují TSG-6, který blokuje proces maturace DC a tedy zvýšení exprese kostimulačních molekul a produkci IL-12 (Liu *et al.*, 2014). Druhým typem APC jsou makrofágy. MSC neblokují jejich diferenciaci z monocytů, ovlivňují ovšem jejich fenotyp. V přítomnosti MSC dochází preferenčně k indukci M2 makrofágů, které se podílejí především na procesech regenerace a jsou imunosupresivní (Kim a Hematti, 2009; Maggini *et al.*, 2010). Mají sníženou expresi MHC II. třídy, expresi IL-12 a IL-23, naopak produkují hodně IL-10. Na indukci M2 fenotypu se podílejí PGE<sub>2</sub>, IDO a COX2 produkované mezenchymálními kmenovými buňkami (Nemeth *et al.*, 2009; Maggini *et al.*, 2010; Francois *et al.*, 2012).

Důležitou roli v přirozené imunitě hrají rovněž NK buňky, které jsou schopny rozpoznat transformované nádorové buňky a tyto lyzovat. MSC jsou schopny inhibovat proliferaci NK buněk a snižovat expresi aktivačních receptorů Nkp30, Nkp44 a NKG2D (Spaggiari *et al.*, 2008). Důležitou roli v inhibici NK buněk hraje v tomto případě sekrece TGF-β, PGE<sub>2</sub> a také IDO (Sotiropoulou *et al.*, 2006; Spaggiari *et al.*, 2008). MSC sekretují navíc HLA-G, který interaguje s inhibičními receptory NK buněk. Toto má za následek snížení exprese INF-γ a blokaci uvolnění granzymu a perforinu, tedy jejich lytickou aktivitu (Selmani *et al.*, 2008).

V důsledku inhibice maturace DC a indukce M2 makrofágů, dochází k zablokování tvorby efektorových T-lymfocytů, které by mohly rozpoznat nádorové buňky. Samotné MSC produkují IDO, která blokuje proliferaci T-lymfocytů a činí je náchylnější k apoptóze (Ren *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2002). V důsledku nedostatku tryptofanu dochází ke snížení exprese ξ řetězce v komplexu T receptoru, což je spojeno se sníženou cytotoxickou aktivitou CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů. Navíc nedostatek tryptofanu upřednostňuje indukci Treg z naivní T-lymfocytů (Fallarino *et al.*, 2006). Nedávný výzkum odhalil, že MSC mohou inhibovat T-lymfocyty také prostřednictvím stimulace PD-1 (Chinnadurai *et al.*, 2014). MSC produkují solubilní faktory, jako TGF-β, PGE<sub>2</sub>, kterými modulují imunitní odpověď. Blokují funkci T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>17 a cytotoxických CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů a naopak podporují expanzi a funkci Treg a T<sub>H</sub>2 lymfocytů (Rasmusson *et al.*, 2003; Aggarwal a Pittenger, 2005; English *et al.*, 2009;

Patel *et al.*, 2010; Luz-Crawford *et al.*, 2013). Kromě TGF- $\beta$  a PGE<sub>2</sub> se na expanzi Treg rovněž podílí sHLA-G sekretovaný MSC (Selmani *et al.*, 2008). Expandované regulační T-lymfocyty pak vytvářejí pozitivní zpětnovazebnou smyčku, když podporují přežívání a proliferaci MSC (Zhou *et al.*, 2014).

#### **2.2.1.1.2. Podpora nádorového růstu a tvorby metastáz**

Během iniciace nádorového růstu dochází k produkci růstových faktorů a cytokinů, které mobilizují MSC z kostní dřeně (Xu *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011). Ty následně infiltrují do nádorů, kde produkcí solubilních faktorů podporují růst nádorů a jejich schopnost metastazovat (De *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2014).

Za normálních fyziologických podmínek se MSC podílejí na organizaci niky hematopoetických kmenových buněk (Mendez-Ferrer *et al.*, 2010). Ukazuje se, že podobnou funkci zastávají MSC i v nádorech, kde se podílejí na utváření niky CSC (Liu *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012). Nedávný výzkum odhalil několik signalizačních drah, kterými dochází ke komunikaci mezi MSC a CSC. Centrální roli v signalizaci hrají zánětlivé cytokiny IL-1 $\beta$  a IL-6 produkované v nádorovém mikroprostředí. Interleukin-1 $\beta$  produkovaný nádorovými buňkami indukuje v MSC expresi PGE<sub>2</sub>, ten se váže na receptory EP2 a EP4 na povrchu MSC a společně s IL-1 $\beta$  indukuje expresi IL-6, IL-8 a CXCL-1. Samotné PGE<sub>2</sub> působí také na CSC, v nichž stimuluje fosforylaci a aktivaci Akt. Akt následně fosforyluje a inaktivuje GSK-3 $\beta$ , což vede k aktivaci  $\beta$ -cateninové signalizace, která je důležitá pro regulaci kmenových buněk (Li *et al.*, 2012; Reya a Clevers, 2005). Kromě toho dochází pod vlivem PGE<sub>2</sub> ke snížení exprese E-cadherinu fungujícího jako negativní regulátor  $\beta$ -cateninu (Orsulic *et al.*, 1999). Dalším významným faktorem zajišťujícím interakci mezi MSC a CSC je IL-6. Ten působí přes IL-6R na MSC. Aktivuje v nich STAT-3, která následně spouští signální kaskády vedoucí k aktivaci dalších TF jako Twist a NF- $\kappa$ B (Cheng *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009). Ty následně podporují expresi IL-6 a dalších cytokinů, což vede ke vzniku pozitivní zpětnovazebné smyčky (Sullivan *et al.*, 2009). Na základě stimulace IL-6 produkují MSC mimo jiné CXCL-7, který následně působí na CSC a přispívá k jejich expanzi (Liu *et al.*, 2011). Kromě uzavření autokrinní zpětnovazebné smyčky může IL-6 produkovaný MSC ovlivňovat také CSC, v nichž rovněž aktivuje STAT-3 a tak podporuje jejich expanzi (Marotta *et al.*, 2011; Tsai *et al.*, 2011). Ve výsledku tak dochází ke zvětšení populace nádorových kmenových buněk, což je spojeno s lepším růstem (Liu *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012).

Nádorové kmenové buňky jsou úzce spojeny s tvorbou metastáz. První fází v diseminaci nádorových buněk je proces EMT, při kterém získávají původně epiteliální buňky mezenchymální fenotyp. Zároveň tyto buňky získávají vlastnosti kmenových buněk (Mani *et al.*, 2008). MSC významnou měrou přispívají k EMT nádorových buněk, produkují TGF- $\beta$ , IL-6, a PGE<sub>2</sub> (Jing *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012). Tyto faktory spolu kooperují a vedou ke

snížení exprese E-cadherinu a zvýšení exprese hlavních TF regulujících EMT Twist a Snail (Cheng *et al.*, 2008; Yadav *et al.*, 2011; Jing *et al.*, 2012). Ve výsledku tak dochází ke zvýšení metastatického potenciálu nádorových buněk. Navíc bylo pozorováno, že produkcí chemokinů, jako např. CXCL-12 a CCL-5, mohou MSC usnadňovat vstup nádorových buněk do kostí dřene a plic (Corcoran *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2009; Karnoub *et al.*, 2007).

### **2.2.1.1.3. Diferenciace MSC na jiné buněčné typy nádorového mikroprostředí**

MSC mohou na základě signálů z nádorového prostředí diferencovat na celou řadu buněčných typů jako např. adipocyty, fibroblasty a další (Barcellos-de-Souza *et al.*, 2013). Jejich schopnost diferencovat na endoteliální buňky je zatím předmětem vědecké diskuze, jelikož byly publikované studie, které tato pozorování vyvrací (Oswald *et al.*, 2004; Cao *et al.*, 2005; Beckermann *et al.*, 2008). Jiné studie zase naznačují, že MSC nediferencují na endoteliální buňky, ale na pericyty, které stabilizují vzniklé cévy (Au *et al.*, 2008; Bexell *et al.*, 2009; Birnbaum *et al.*, 2011). Významná je především schopnost MSC diferencovat na CAF. Předpokládá se, že by diferenciací MSC mohlo vznikat 20 – 70% CAF (Direkze *et al.*, 2004; Kidd *et al.*, 2012). Takto vzniklé fibroblasty pak mohou pomáhat v procesech růstu a tvorby metastáz (Shinagawa *et al.*, 2010; Jung *et al.*, 2013). Mechanizmy, kterými CAF ovlivňují nádorové mikroprostředí a přispívají k rozvoji nádorů, budou popsány v následující kapitole.

Další významnou skupinou buněk, na kterou mohou MSC diferencovat, jsou adipocyty. Adipocyty asociované s nádory mají pozměněný fenotyp, který se vyznačuje snížením obsahu tukových vakuol a sníženou expresí znaků terminální diferenciace, jako jsou lipáza sensitivní na hormony, adiponectin a restin (Dirat *et al.*, 2011). Dalším znakem je zvýšená exprese prozánětlivých cytokinů IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 a CCL-2. Pomocí nich adipocyty zvyšují invazivitu nádorových buněk a podporují tvorbu metastáz (Dirat *et al.*, 2011; Nieman *et al.*, 2011; Carter a Church, 2012). Motilita nádorových buněk je dále posílena expresí MMP-11 adipocyty na invazivní straně nádorů (Andarawewa *et al.*, 2005). Kromě degradace ECM hraje MMP-11 důležitou roli v regulaci adipocytů, jelikož její exprese je spojená s dediferenciací adipocytů, čímž zřejmě přispívá k získání fenotypu adipocytů asociovaných s nádory. Signální dráhy indukované adipocyty také zvyšují odolnost nádorových buněk vůči působení chemoterapeutik (Behan *et al.*, 2009).

Rychlý růst nádorů je spojen s vysokými nároky na přísun živin a energie. Nádorové buňky toto řeší tvorbou metabolické sítě, v níž se chovají jako parazité. Indukují ve stromálních buňkách katabolické procesy, které generují zdroje energie, jako pyruvát, laktát a mastné kyseliny. Samy se pak specializují na využití těchto zdrojů anabolickými procesy (Martinez-Outschoorn *et al.*, 2012). V adipocytech pod vlivem nádorových buněk dochází k lipolýze a uvolnění mastných kyselin do prostředí. Tyto volné mastné kyseliny jsou přijímány

nádorovými buňkami a využívány v procesu  $\beta$ -oxidace pro získání energie (Gazi *et al.*, 2007; Nieman *et al.*, 2011).

### 2.2.1.2. Fibroblasty asociované s nádory

CAF jsou nejpočetnější populací buněk nádorového stromatu. Představují architektury nádorového mikroprostředí, ve kterém plní celou řadu funkcí, jako např. remodelace ECM, sekrece růstových faktorů podporujících růst nádorových buněk a modulace imunitní odpovědi. Populace CAF vzniká z několika rozdílných buněčných typů. Základním zdrojem jsou zřejmě fibroblasty rezidentní v tkáni, které jsou přitahovány a inkorporovány do nádorů, v nichž pod vlivem TGF- $\beta$ 1 diferencují na CAF (Ronnov-Jessen *et al.*, 1995; Vaughan *et al.*, 2000). Rostoucí nádory sekretují solubilní faktory schopné mobilizovat z kostní dřeně MSC. Ty infiltrují do nádorového stromatu a následně diferencují na fibroblasty (Direkze *et al.*, 2004; Kidd *et al.*, 2012). Další zatím stále diskutovanou možností, je diferenciace CAF z nádorových buněk, které prošly EMT a získaly mezenchymální fenotyp (Oldfield *et al.*, 2001; Petersen *et al.*, 2003; Nightingale *et al.*, 2004). Podobný proces byl popsán také u endoteliálních buněk (Zeisberg *et al.*, 2007). Dále byly jako možný zdroj CAF identifikovány adipocyty a pericyty (Bochet *et al.*, 2013; Armulik *et al.*, 2011). Je ovšem nutné zdůraznit, že není vyloučeno, že se jedná o artefakt způsobený chyběním specifických znaků pro CAF.

Z hlediska fenotypu se CAF liší od rezidentních tkáňových fibroblastů. Expresí  $\alpha$ -SMA se ovšem podobají aktivovaným myofibroblastům (Lazard *et al.*, 1993). CAF dále exprimují vimentin, paladin, FAP, FSP-1, PDGFR $\alpha$  a  $\beta$  (Sugimoto *et al.*, 2006; Ronty *et al.*, 2006; Strutz *et al.*, 1995; Rettig *et al.*, 1993; Paulsson *et al.*, 2009). Žádný z těchto znaků ovšem není zcela specifický, což naznačuje, že CAF představují heterogenní populaci. Tato heterogenita může být dána druhem nádorů a specifickým prostředím, ve kterém CAF diferencují, nebo jejich rozdílným původem.

#### 2.2.1.2.1. Podíl CAF na remodelaci ECM

Tkáňové fibroblasty jsou hlavními producenty komponent ECM. Toto platí i pro aktivované CAF, které pod vlivem TGF- $\beta$  produkovaného nádorovými buňkami zvyšují expresi kolagenů, fibronektinu a laminů, čímž přispívají ke zvýšení tuhosti tkáně (Verona *et al.*, 2007; Kaupila *et al.*, 1998; Bremnes *et al.*, 2011). Produkují také celou řadu enzymů podílejících se na změně architektury ECM. Exprimují lysyl oxidázu, která zprostředkovává sesíťování kolagenových vláken a vytváří tak cesty pro migraci nádorových buněk do okolní tkáně, zároveň dochází tímto způsobem ke zvýšení integrinové signalizace, která podporuje růst nádorových buněk (Trivedy *et al.*, 1999; Provenzano *et al.*, 2006; Levental *et al.*, 2009). Prostředí obohacené o fibronektin aktivuje signální dráhy vycházející z integrinu  $\alpha$ 5 $\beta$ 4, který je v CAF exprimován ve zvýšené míře (Coulson-Thomas *et al.*, 2010).

Aktivovaná integrinová signalizace spolu se zánětlivými cytokiny TNF- $\alpha$  a TGF- $\beta$  stimuluje CAF k produkci MMP-2, MMP-9, MMP-13 a MMP-14 (Huhtala *et al.*, 1995; Saad *et al.*, 2002; Stuelten *et al.*, 2005; Singer *et al.*, 2002; Lederle *et al.*, 2010; Bisson *et al.*, 2003). Pomocí MMP pak CAF pronikají do okolní tkáně a vytvářejí dráhy, po který migrují nádorové buňky (Gaggioli *et al.*, 2007). MMP ovšem plní i další funkce diskutované v kapitole 2.1.2.

Pod vlivem růstových faktorů nádorového mikroprostředí, jako např. bFGF, EGF, HGF, IGF-I, dochází rovněž k indukci exprese uPA, který se podílí na degradaci ECM, podporuje angiogenezi a tvorbu metastáz (Noskova *et al.*, 2009; Nielsen *et al.*, 1996; Nielsen *et al.*, 2001; Dass *et al.*, 2008). Znakem CAF je exprese FAP. Jedná se o serinovou proteázu schopnou degradovat kolagen, čímž se podílí na reorganizaci ECM a podporuje migraci nádorových buněk (Park *et al.*, 1999; Christiansen *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2011).

#### **2.2.1.2.2. CAF podporují nádorový růst a tvorbu metastáz**

Nádorové buňky sekretují TGF- $\beta$ , BMP, PDGF, IL-1 $\beta$  a další faktory, které vedou k aktivaci přítomných fibroblastů a jejich diferenciaci v CAF (Cai *et al.*, 2012; Calon *et al.*, 2012; Owens *et al.*, 2013; Pietras *et al.*, 2008; Erez *et al.*, 2010; Muerkoster *et al.*, 2004). Tyto následně podporují proliferaci, angiogenezi, lymfangiogenezi, migraci a invazivitu nádorových buněk (Hwang *et al.*, 2008; Grugan *et al.*, 2010; Stuelten *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011). Přítomnost CAF rovněž zvyšuje odolnost nádorových buněk vůči působení chemoterapie a radioterapie (Muerkoster *et al.*, 2004; Hwang *et al.*, 2008). Děje se tak na základě produkce růstových faktorů, mezi které patří TGF- $\beta$ , VEGF, FGF, HGF, PDGF, IGF-I, IGF-II (Stuelten *et al.*, 2010; Fukumura *et al.*, 1998; Dong *et al.*, 2004; Pietras *et al.*, 2008; Grugan *et al.*, 2010; Crawford *et al.*, 2009; Cullen *et al.*, 1991; Giani *et al.*, 1996; Tavakkol *et al.*, 1992). Tyto působí přímo na nádorové buňky, ve kterých mohou stimulovat prorůstové dráhy jako MAPK a Akt (Hwang *et al.*, 2008; Subramaniam *et al.*, 2013). Rostoucí nádory mají ovšem zvýšené požadavky na cévní zásobení a přísun energie. CAF sekretují VEGF, PDGF, FGF, které podporují nádorovou angiogenezi (Dong *et al.*, 2004; Pietras *et al.*, 2008; Pietras *et al.*, 2008). Navíc CAF sekretují CXCL-12 schopný přitahovat prekursorů endoteliálních buněk z kostní dřeně (Orimo *et al.*, 2005).

Stejně jako MSC, se podílí CAF také na procesu EMT, který představuje první krok ve tvorbě metastáz. Buňky procházející EMT se vyznačují expresí znaků kmenových buněk a dá se tedy předpokládat, že se jedná o CSC (Mani *et al.*, 2008). CAF v první fázi expandují CSC. Pod vlivem zánětlivého nádorového prostředí dochází v CAF k aktivaci NF- $\kappa$ B a následně indukci exprese COX-2 produkující PGE<sub>2</sub>, který expanduje CSC (Erez *et al.*, 2010). PGE<sub>2</sub> dále autokrinním způsobem posiluje expresi IL-6 v CAF. Sekretovaný IL-6 následně posiluje účinek PGE<sub>2</sub> na expanzi CSC (Rudnick *et al.*, 2011). Mimo to vytváří zpětnovazebnou smyčku, při níž v CAF aktivuje STAT-3. To vede k dalšímu posílení sekrece IL-6, ale také indukuje expresi

CCL-2. CSC pod vlivem CCL-2 zvyšují expresi Notch-1, který iniciuje signální dráhu podporující sebeobnovu kmenových buněk (Tsuyada *et al.*, 2012). V další fázi poskytují CAF faktory podporující EMT. Produkci TGF- $\beta$  indukují v nádorových buňkách expresi HMGA-2, který aktivuje expresi hlavních regulátorů EMT, jako Snail, Slug, Twist (Thuault *et al.*, 2006). TGF- $\beta$  dále v CAF indukuje expresi IL-11, který společně se sekretovaným IL-6 aktivuje v nádorových buňkách STAT-3-Twist dráhu podporující EMT (Calon *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2008). Kromě toho IL-6 indukuje v CAF expresi MMP, čímž rovněž podporuje EMT (Giannoni *et al.*, 2010). Díky produkci MMP vytváří CAF degradaci ECM cesty, po kterých putují nádorové buňky (Gaggioli *et al.*, 2007). Sekretují navíc růstové faktory HGF a FGF podporující migraci (Grugan *et al.*, 2010; Henriksson *et al.*, 2011). Sekrece HGF je důležitá mimo jiné i pro přežití migrujících buněk, jelikož signalizací přes c-Met inhibuje anoikis, tedy buněčnou smrt způsobenou ztrátou mezibuněčných kontaktů (Kanayama *et al.*, 2008). Indukce EMT je dále posílena oxidativním stresem. Nádorové buňky sekretují IL-1 $\beta$  což v nádorových fibroblastech indukuje expresi iNOS produkující NO (Muerkoster *et al.*, 2004). Produkovaný NO následně v nádorových buňkách indukuje oxidativní stres, na který odpovídají expresí HIF-1 $\alpha$  a aktivací  $\beta$ -cateninové signalizace, které podporují EMT (Luo *et al.*, 2013). Zvýšený oxidativní stres vyvolává expresi HIF-1 $\alpha$  i v CAF, což indukuje produkci karboanhydrázy 9. Ta způsobuje acidifikaci extracelulárního prostředí podporující aktivaci MMP-2 a MMP-9, které se rovněž podílejí na procesu EMT (Fiaschi *et al.*, 2013).

Migrující buňky ve vzdálených orgánech zakládají metastatickou niku, v jejímž formování hrají roli fibroblasty. Pod vlivem nádorových buněk indukují fibroblasty expresi osteopontinu schopného vázat ligandy Wnt. V metastatické nise se tak zvyšuje lokální koncentrace Wnt1 a Wnt3A, čímž je posílená aktivace Wnt dráhy, která je důležitá pro sebeobnovu CSC (Malanchi *et al.*, 2012).

### **2.2.1.2.3. CAF potlačují protinádorovou imunitu**

První složkou, se kterou se setkávají buňky imunitního systému při infiltraci do nádorů, je ECM. Ta během vývoje nádorů prochází značnou přestavbou, na níž se podílejí CAF, které mění složení ECM zvýšenou syntézou kolagenů. Kolageny mohou fungovat jako inhibitory imunitní odpovědi, jelikož jsou rozpoznávány inhibičním receptorem LAIR-1 (CD305) (Lebbink *et al.*, 2006). Ten je exprimován prakticky na všech buňkách imunitního systému (Meyaard *et al.*, 1997). Aktivace LAIR-1 je schopna inhibovat cytotoxickou aktivitu a proliferaci NK buněk a efektorových T-lymfocytů (Meyaard *et al.*, 1997; Poggi *et al.*, 1997; Meyaard *et al.*, 1999). Snižuje také signalizace přes B-receptor, což je spojeno se snížením exprese imunoglobulinů a cytokinů (van der Vuurst de Vries *et al.*, 1999; Merlo *et al.*, 2005). Indukce signalizace přes LAIR-1 na monocytech vede k inhibici jejich diferenciaci na DC (Poggi *et al.*, 1998).

Další komponentou ECM produkovanou CAF, která se podílí na modulaci imunitní odpovědi je tenascin C (Chiquet-Ehrismann *et al.*, 1994). Schopnost tenascinu C ovlivňovat imunitu je dána zřejmě vazbou na fibronectin, čímž blokuje jeho interakci s integriny na buňkách imunitního systému. Tenascin C tímto způsobem blokuje migraci monocytů v reakci na leukotrien B<sub>4</sub> a IL-8 (Loike *et al.*, 2001). Snižuje tak pravděpodobně množství monocytů a makrofágů v nádorech, které by mohly fungovat jako antigen prezentující buňky (Talts *et al.*, 1999). Maskováním vazebných míst na fibronectinu dále blokuje adhezenci a aktivaci T-lymfocytů, které postrádají kostimulační signály z integrinů VLA-4, VLA-5 (Hauzenberger *et al.*, 1999; Hibino *et al.*, 1998).

Součástí ECM je rovněž fibroblasty produkovaný multifunkční protein TSP-1 (Jaffe *et al.*, 1983). Ten interaguje s CD47 a integriny na leukocytech. Zatímco vazba na integriny je zodpovědná za chemotaxi, vazba na CD47 ovlivňuje funkční vlastnosti (Li *et al.*, 2002). TSP-1 tak do nádorů přitahuje T-lymfocyty a monocyty (Mansfield a Suchard, 1994). Interakcí s CD47 ovšem blokuje produkci zánětlivých cytokinů IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ , GM-CSF a maturaci DC (Demeure *et al.*, 2000). Zároveň blokuje aktivaci, proliferaci a diferenciaci T<sub>H</sub>1 lymfocytů, zatímco diferenciaci T<sub>H</sub>2 lymfocytů, obecně považovaných za pronádorové, neovlivňuje (Li *et al.*, 2001; Beppu *et al.*, 2001; Avice *et al.*, 2000).

CAF sekretují do nádorového prostředí celou řadu proteolytických enzymů, které degradují ECM a mají další funkce, jimiž mohou ovlivňovat imunitní odpověď, viz. kapitola 2.1.2.3.

Pod vlivem zánětlivých cytokinů dochází ve fibroblastech k aktivaci NF- $\kappa$ B a jejich diferenciaci v prozánětlivé CAF (Erez *et al.*, 2010). Ty produkují chemokiny a cytokiny, kterými mohou inhibovat přirozenou i adaptivní protinádorovou imunitu. CAF patří mezi producenty IL-6, jehož zvýšená koncentrace v krvi vede k uvolňování neutrofilů z kostní dřeně (Silzle *et al.*, 2003; Erez *et al.*, 2010; Ulich *et al.*, 1989). Navíc zvyšuje expresi adhezivních molekul ICAM-1 a VCAM-1 na endoteliálních buňkách, čímž přispívá k jejich extravazaci do nádorů (Romano *et al.*, 1997; Modur *et al.*, 1997). Chemoatrakce neutrofilů do nádorů je dále posílena produkcí chemokinů, která je indukována IL-6 aktivujícím STAT-3-NF- $\kappa$ B dráhu (Cheng *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009). Infiltrované neutrofilů následně pod vlivem TGF- $\beta$ , jehož významným producentem jsou CAF, diferencují na N2 fenotyp podporující nádorový růst (Kojima *et al.*, 2010) (Fridlender *et al.*, 2009). Nádorové prostředí je rovněž bohaté na monocyty, k jejichž infiltraci dochází na základě IL-6 indukované produkce chemokinů v CAF (Silzle *et al.*, 2003; Erez *et al.*, 2010; Qian *et al.*, 2011). Monocyty představují prekurzory makrofágů a myeloidních DC. IL-6 produkovaný CAF zvyšuje v monocytech expresi receptoru pro M-CSF, čímž podporuje M-CSF řízenou diferenciaci v makrofágy a blokuje tvorbu DC (Chomarat *et al.*, 2000). Vzniklé makrofágy následně pod vlivem IL-6, CCL-2 a TGF- $\beta$  diferencují na pro-nádorový M2 fenotyp (Roca *et al.*, 2009; Gong *et al.*, 2012;

Sierra-Filardi *et al.*, 2014). Dojde-li k diferenciaci DC, mají tyto v důsledku působení TGF- $\beta$  a CCL-2 tolerogenní fenotyp, který podporuje diferenciaci Treg (Bekeredjian-Ding *et al.*, 2009; Kudo-Saito *et al.*, 2013). Navíc TGF- $\beta$  inhibuje migraci DC buněk z nádorů do lymfatických uzlin. (Weber *et al.*, 2005) Tímto způsobem mohou CAF ovlivňovat složení a funkci APC, které jsou nepostradatelné pro indukci adaptivní protinádorové imunity.

Další složkou inhibovanou CAF jsou NK buňky. CAF prostřednictvím produkovaného PGE<sub>2</sub> snižují na infiltrujících NK buňkách expresi aktivačních receptorů NKp44, NKp30, a DNAM-1. Efekt PGE<sub>2</sub> je navíc posílen přímým kontaktem CAF s NK buňkami (Erez *et al.*, 2010; Balsamo *et al.*, 2009). Na inhibici NK buněk se podílí také TGF- $\beta$ , který blokuje jejich maturaci a produkci IFN- $\gamma$  (Marcoe *et al.*, 2012). Produkce IFN- $\gamma$  je přitom důležitá pro plnou aktivaci DC a produkci cytokinů indukujících T<sub>H</sub>1 odpověď (Laouar *et al.*, 2005). CAF potlačují T<sub>H</sub>1 imunitní odpověď a upřednostňují indukci odpovědi typu T<sub>H</sub>2, která podporuje růst nádorů (Liao *et al.*, 2009). Využívají k tomu několik mechanismů. Produkují CCL-2 a IL-6, který podporuje expresi IL-4 a tím polarizuje lymfocyty směrem k T<sub>H</sub>2 fenotypu (Karpus *et al.*, 1997; Gu *et al.*, 2000; Rincon *et al.*, 1997). IL-6 navíc inhibuje T<sub>H</sub>1 polarizaci zvýšením exprese SOCS-1, což je spojeno s inhibicí fosforylace STAT-1 (Diehl *et al.*, 2000). Dalším inhibujícím cytokinem je TGF- $\beta$ . Jeho přítomnost vede k inhibici exprese TF T-bet řídicího diferenciaci T<sub>H</sub>1 lymfocytů (Gorelik *et al.*, 2002). TGF- $\beta$  ovšem inhibuje také diferenciaci T<sub>H</sub>2 lymfocytů inhibicí TF GATA-3 (Gorelik *et al.*, 2000). Naopak v naivních T-lymfocytech podporuje expresi FoxP3 a tím jejich diferenciaci v Treg, které dále inhibují protinádorovou imunitní odpověď (Chen *et al.*, 2003). K indukci FoxP3 může pod vlivem TGF- $\beta$  docházet také v CD8<sup>+</sup> lymfocytech (Kapp *et al.*, 2006). Efektorové CD8<sup>+</sup> CTL navíc v přítomnosti TGF- $\beta$  snižují expresi granzymů, perforinů, FasL a IFN- $\gamma$  a dochází u nich k indukci apoptózy (Thomas a Massague, 2005; Sanjabi *et al.*, 2009). V kombinaci s IL-6 indukuje TGF- $\beta$  v naivních lymfocytech diferenciaci na Th17 fenotyp, jehož role v nádorech je zatím stále kontroverzním tématem (Veldhoen *et al.*, 2006). CAF k inhibici adaptivní imunity kromě cytokinů mohou využívat i mezibuněčný kontakt. Exprimují na svém povrchu PD-L1 a PD-L2, kterými mohou suprimovat efektorové T-lymfocyty exprimující na svém povrchu PD-1 (Nazareth *et al.*, 2007; Pinchuk *et al.*, 2008).

### **2.2.2. Buňky imunitního systému**

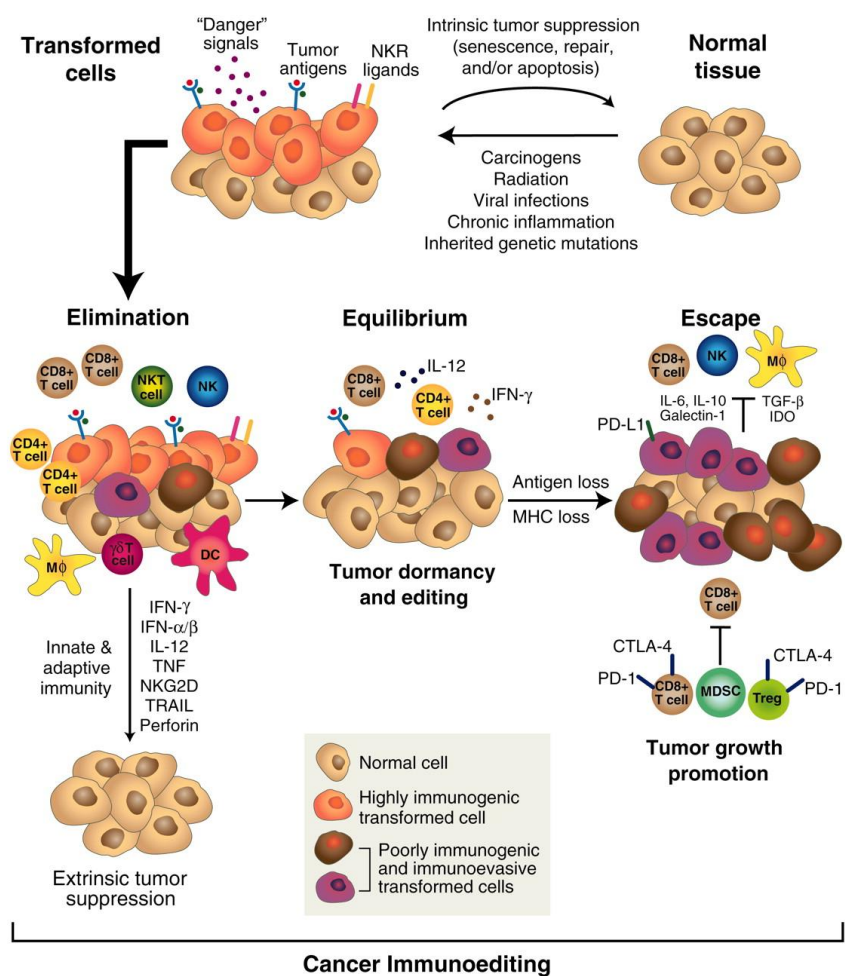
Nádorové mikroprostředí je infiltrováno prakticky všemi druhy leukocytů (Fridman *et al.*, 2012). V některých nádorech se navíc můžeme setkat se vznikem terciárních lymfoidních struktur, které se svou vnitřní stavbou mohou podobat lymfatickým uzlinám. Mohou obsahovat více či méně odlišené zóny B- a T- lymfocytů (Goc *et al.*, 2013). Nádory se tak vyvíjejí

v blízkém kontaktu s imunitním systémem a dochází zde ke vzájemnému ovlivňování, jehož výsledkem je změna imunogenicity nádorových buněk.

Při pokusech s chemickým karcinogenem metylcholantrenem bylo pozorováno, že u myši postrádajících funkční lymfocyty dochází ke vzniku nádorů dříve a častěji než u imunokompetentních myši. Navíc sarkomy vzniklé u myši postrádajících lymfocyty byly při transplantaci do imunokompetentních myši častěji odhojeny, než sarkomy z imunokompetentních myši transplantované do imunokompetentních myši (Shankaran *et al.*, 2001). Na základě těchto výsledků, došlo k postulaci hypotézy tzv. nádorové imunoeditace, která popisuje duální vztah mezi nádorovými buňkami a imunitním systémem (Dunn *et al.*, 2002). Proces imunitní editace je složen ze tří fází, a to eliminace, ekvilibria a úniku (Obr. 1).

Během fáze eliminace dochází v rychle rostoucím nádoru ke stresu, což vede k expresi ligandů pro aktivační receptory NK buněk, jako MICA a MICB. Rozpoznané nádorové buňky jsou NK buňkami lyzovány. Dochází tak k uvolňování nádorových antigenů, které jsou přijímány DC. Pod vlivem cytokinů sekretovaných NK buňkami, stresovanou tkání, v níž nádor roste, a DAMP uvolňovaných z umírajících nádorových buněk, dochází k maturaci DC. Tyto pak indukují adaptivní imunitní odpověď, která je schopna rozpoznat antigeny prezentované nádorovými buňkami na MHC. Ve výsledku tak adaptivní a přirozená imunita spolupracují pro eliminaci nádorových buněk (Schreiber *et al.*, 2011). Druhou fází je fáze ekvilibria, která může trvat i celý život nositele. Některé nádorové buňky mohou uniknout destrukci imunitním systémem. Tyto přeživší buňky jsou udržovány za přispění adaptivního imunitního systému v dormantním stavu (Koebel *et al.*, 2007).

Během fáze ekvilibria nádorové buňky vytvářejí malá ložiska, která jsou infiltrována CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty a makrofágy. T-lymfocyty produkují IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$ , jimiž v nádorových buňkách indukují zastavení buněčného cyklu v G<sup>0</sup> fázi a senescenci (Braumuller *et al.*, 2013). Rostoucí buňky a buňky unikající z ložisek jsou následně ničeny cytotoxickými CD8<sup>+</sup> CTL (Koebel *et al.*, 2007; Eyles *et al.*, 2010). Imunitní systém ve fázi ekvilibria vytváří na nádorové buňky selekční tlak, který může vést ke vzniku únikových variant a vstupu nádoru do poslední fáze úniku.



Obr. 1: Nádorová imunoeditace (Schreiber *et al.*, 2011)

Únik před adaptivní imunitou může být dán ztrátou exprese rozpoznávaného nádorového antigenu nebo poškozením systému pro prezentaci peptidů na MHC (Jager *et al.*, 1996; Khong *et al.*, 2004). U nádorových buněk byly pozorovány mutace ovlivňující expresi peptidového transportéru TAP i přímo expresi MHC I (Chen *et al.*, 1996; Restifo *et al.*, 1996). Nádorové buňky mohou také exprimovat ligandy pro inhibiční receptory indukujících anergii či apoptózu efektorových T-lymfocytů, jako např. PD-1L (Dong *et al.*, 2002). Ztráta imunogennosti nádorů může být dána také změnou v produkci cytokinů a chemokinů, které mohou měnit charakter imunitní odpovědi. Příkladem může být zvýšení produkce IL-6, který inhibuje maturaci DC a diferenciaci T<sub>H1</sub> lymfocytů (Park *et al.*, 2004; Diehl *et al.*, 2000). Může rovněž docházet k sekreci TGF- $\beta$  inhibujícího NK buňky a podporujícího diferenciaci Treg, M2 makrofágů a N2 neutrofilů (Laouar *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2003; Gong *et al.*, 2012; Fridlender *et al.*, 2009). Strategie pro únik před NK buňkami dále zahrnuje zvýšení exprese ligandů pro inhibiční receptory, jako např. HLA-G (Tripathi a Agrawal, 2006). Alternativně snížení povrchové exprese ligandů pro jejich aktivační receptory. Zajímavým příkladem je především NKG2D a jeho ligandy MICA a MICB. Tyto jsou odvrhovány z povrchu nádorových

buněk, což má dvojitý efekt. Nádorové buňky nejsou rozpoznány NK buňkami a solubilní formy receptorů inhibují NK buňky (Waldhauer *et al.*, 2008; Boutet *et al.*, 2009). Jelikož dormantní stav nádorů je zprostředkován sekrecí IFN- $\gamma$  je možné, že nádorové buňky mohou v důsledku mutací získat rezistenci vůči jeho působení (Dunn *et al.*, 2005). Nádorové buňky mohou také zvýšit odolnost vůči indukci apoptózy zvýšením exprese anti-apoptotických molekul (Hinz *et al.*, 2000). Další možností je zabránění infiltrace buněk imunitního systému do nádorů snížením exprese adhezivních molekul na endoteliálních buňkách cév v nádorech (Buckanovich *et al.*, 2008).

Rozpoznání významu imunitního systému v nádorech vedlo k iniciaci snahy o zavedení tzv. imunoscóre pro klasifikaci nádorů (Galon *et al.*, 2012). Toto hodnocení zahrnuje kvantifikaci dvou populací lymfocytů jako např. CD8<sup>+</sup> CTL a CD45RO<sup>+</sup> paměťových lymfocytů v nádorech a na invazivní straně nádorů. Zdá se, že by se tímto způsobem dala lépe predikovat recurence nádorů a přežívání pacientů (Pages *et al.*, 2009). Význam imunoscóre pravděpodobně v budoucnu dále poroste díky vzestupu imunoterapie, kdy pomůže určit skupinu pacientů, která by profitovala z případné vakcinace. Roli může hrát také při rozhodování o podání nedávno schválených anti-CTLA-4 a anti-PD1 protilátek blokujiících kontrolní body aktivace T-lymfocytů. Dá se předpokládat, že jejich účinek bude vyšší u pacientů, jejichž nádory vykazují silnou infiltraci T-lymfocyty. Naopak u nádorů, u nichž nedochází k infiltraci buňkami imunitního systému, bude jejich účinek výrazně menší (Gajewski *et al.*, 2013).

### **2.2.2.1. Lymfocyty**

V nádorovém mikroprostředí můžeme najít lymfocyty představující hlavní komponenty adaptivního imunitního systému, vrozené imunity a různé přechodné typy mezi adaptivní a vrozenou imunitou. Mezi nejdůležitější zástupce adaptivní imunity patří především T-lymfocyty nesoucí  $\alpha\beta$  T-receptor (TCR) a B-lymfocyty. Mezi zástupce lymfocytů stojící na pomezí adaptivní a vrozené imunity patří NKT-lymfocyty a také T-lymfocyty exprimující  $\gamma\delta$  TCR. Skupina přirozených lymfocytů (ILC) je z hlediska role v nádorovém mikroprostředí stále málo prozkoumaná. Výjimku představují NK-buňky, které byly identifikovány již v 70. letech 20. století, jako přirozené lymfocyty schopné lyzovat transformované nádorové buňky (Kiessling *et al.*, 1975).

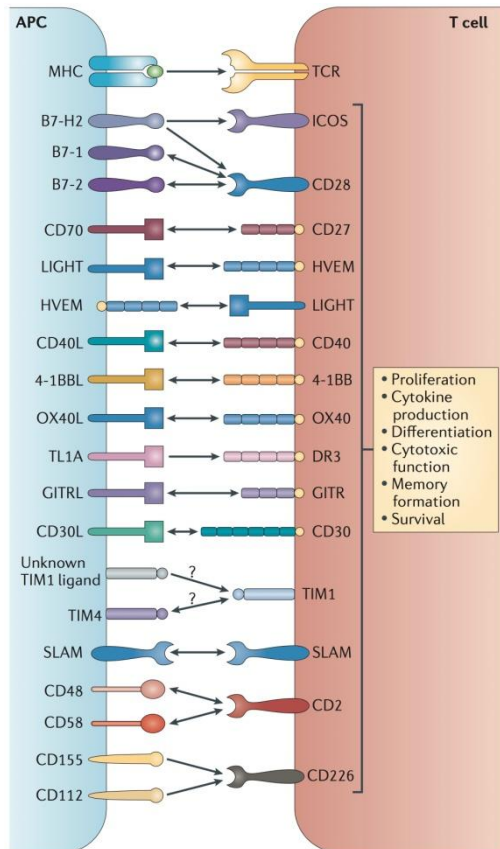
#### **2.2.2.1.1. $\alpha\beta$ -T-lymfocyty**

T-lymfocyty exprimující  $\alpha\beta$  TCR rozpoznávají antigenní peptidy v komplexu s MHC. K vazbě mezi MHC a TCR dochází za přispění koreceptorů CD4 nebo CD8, které zároveň určují jaká třída MHC glykoproteinů bude rozpoznána. T-lymfocyty exprimující koreceptor CD4 rozpoznávají MHC glykoproteiny II. třídy, které jsou exprimovány na APC a slouží k prezentaci exogenních antigenních peptidů přijatých fagocytózou. Exprese koreceptoru CD8

umožňuje rozpoznání MHC I. třídy, které jsou exprimovány prakticky na všech buňkách v těle, které mají buněčné jádro. Funkcí MHC I je především prezentace endogenních peptidů. Díky existenci tzv. zkřížené prezentace mohou ovšem prezentovat také peptidy exogenní.

### 2.2.2.1.1.1. CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty

Pro aktivaci a diferenciaci naivních CD4<sup>+</sup> T-lymfocytů je vyžadováno několik signálů. Prvním z nich je rozpoznání peptidu prezentovaném na MHC II na povrchu APC prostřednictvím TCR. Tento signál sám o sobě ovšem nestačí pro aktivaci a naopak vede k anergizaci T-lymfocytů popř. indukci apoptózy. K zabránění anergizace je vyžadován druhý signál. Ten podávají kostimulační molekuly exprimované na APC (Obr. 2), které interagují s odpovídajícími receptory na T-lymfocytech v tzv. imunologické synapsi. Primární kostimulační signál pro diferenciaci naivních T-lymfocytů vychází zřejmě z CD28 vázajícího CD80, ačkoliv bylo pozorováno, že při jeho chybění může docházet k částečné kompenzaci jinými kostimulačními molekulami (Shahinian *et al.*, 1993; Chen a Flies, 2013). Tato primární interakce předává oboustranné signály jak do T-lymfocytu, tak do DC, což je spojeno s iniciací exprese dalších kostimulačních molekul a jejich receptorů. Aktivované T-lymfocyty zahajují diferenciacní program, který je řízen cytokiny představujícími třetí signál. CD4<sup>+</sup> mohou na základě cytokinů diferencovat na jeden z fenotypů pomocných nebo regulačních T-lymfocytů.



Obr. 2: Kostimulační molekuly aktivující T-lymfocyty (Chen a Flies, 2013)

### 2.2.2.1.1.1.1. T<sub>H</sub>1 lymfocyty

K polarizaci naivních T-lymfocytů v T<sub>H</sub>1 fenotyp dochází pod vlivem IL-12, produkovaného APC a IFN- $\gamma$ , jehož primárními producenty jsou NK-buňky (Manetti *et al.*, 1993; Scharon a Scott, 1993; Martin-Fontecha *et al.*, 2004). IL-12 aktivuje STAT-4, který následně řídí expresi genů charakteristických pro T<sub>H</sub>1 buňky, jako např. IFN- $\gamma$  (Thierfelder *et al.*, 1996). Podporuje také expresi TF T-bet, který je hlavním regulátorem T<sub>H</sub>1 diferenciaci (Zhu *et al.*, 2012; Szabo *et al.*, 2000). Exprese T-bet je řízena rovněž signální dráhou STAT-1 aktivovanou IFN- $\gamma$  (Lighvani *et al.*, 2001). T-bet plní několik funkcí. Funguje hlavně jako represor, kdy blokuje diferenciaci jiných T<sub>H</sub> fenotypů. Snižuje expresi TF GATA-3, který řídí diferenciaci T<sub>H</sub>2 lymfocytů (Usui *et al.*, 2006). Jelikož je GATA-3 exprimován v nízké hladině již v naivních T-lymfocytech, je třeba regulovat jeho funkci na posttranskripční úrovni (Ho *et al.*, 2009). Děje se tak přímou interakcí mezi GATA-3 a T-bet, fosforylovaným kinázou ITK. V takto vzniklém komplexu se GATA-3 nemůže vázat na genový lokus kódující T<sub>H</sub>2 cytokiny (Hwang *et al.*, 2005). Dalším bodem inhibice T<sub>H</sub>2 diferenciaci je vazba komplexu T-bet s TF Runx-3 na IL-4 silencer reprimující expresi genu pro IL-4 (Djuretic *et al.*, 2007). Kromě inhibice T<sub>H</sub>2 lymfocytů blokuje T-bet diferenciaci lymfocytů typu T<sub>H</sub>17, kdy se váže do promotoru jejich hlavního TF ROR $\gamma$ t a inhibuje jeho expresi (Lazarevic *et al.*, 2011). T-bet funguje také jako pozitivní transkripční regulátor. Váže se na regulační elementy v promotoru genu pro IFN- $\gamma$ , čímž podporuje jeho expresi. Tato vazba může být dále posílena interakcí mezi T-bet a Runx-3 (Djuretic *et al.*, 2007). Produkci IFN- $\gamma$  je uzavřena zpětnovazebná pozitivní smyčka, která dále posiluje expresi T-bet (Lighvani *et al.*, 2001).

Vzniklé T<sub>H</sub>1 lymfocyty se významnou měrou podílejí na protinádorové imunitě. Řada studií ukázala, že přítomnost T<sub>H</sub>1 lymfocytů nebo cytokinů, které produkují, pozitivně koreluje s přežíváním pacientů. Pozitivní vliv byl pozorován např. u nádorů žaludku, tlustého střeva, prsu, ovariálního karcinomu, hepatocelulárního karcinomu a meduloblastomů (Ubukata *et al.*, 2010; Camus *et al.*, 2009; Tosolini *et al.*, 2011; Teschendorff *et al.*, 2010; Marth *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2011; Wiegering *et al.*, 2011). Práce na myším modelu navíc ukázala, že v průběhu nádorového růstu může docházet k postupné ztrátě T<sub>H</sub>1 lymfocytů (Ghosh *et al.*, 1995).

T<sub>H</sub>1 lymfocyty kontrolují růst nádorů několika způsoby. Prvním z nich je přímé působení produkovaných cytokinů na nádorové buňky. T<sub>H</sub>1 buňky sekretují IL-2, TNF- $\alpha$  a jsou významným zdrojem IFN- $\gamma$ . TNF- $\alpha$  byl původně identifikován jako protein schopný indukovat nekrózu v sarkomech (Carswell *et al.*, 1975). Po vazbě na receptor TNFR1 může docházet k sestavení tzv. DISC komplexu tvořeného TRADD, RIPK-1, TRAF-2 a FADD, který

podporuje autokatalytickou aktivaci kaspázy 8 a 10. Tyto kaspázy následně štěpí efektorové kaspázy a iniciují apoptózu (Waters *et al.*, 2013). Některá pozorování ovšem ukazují, že TNF- $\alpha$  může nádorový růst také podporovat. Signalizace přes TNFR1 může vést k aktivaci MAP3K kinázy, která spouští signalizační kaskádu aktivující NF- $\kappa$ B. Takto je indukována exprese prozánětlivých genů a genů pro přežívání (Yang *et al.*, 2001; Waters *et al.*, 2013). Zároveň může TNF- $\alpha$  působit i na jiné buňky nádorového mikroprostředí a podporovat tak angiogenezi (Zhang *et al.*, 2003). Kromě toho může měnit charakter imunitní odpovědi. Bylo například pozorováno, že působení TNF- $\alpha$  indukuje v T-lymfocytech Th17 fenotyp a tedy sekreci IL-17, což ve výsledku vede k akumulaci myeloidních buněk v nádorovém prostředí. Tyto myeloidní buňky následně podporují růst nádorů (Charles *et al.*, 2009). Jelikož různé cytokiny vytvářejí složité interakční sítě, je nutné i TNF- $\alpha$  hodnotit v kontextu. V případě T<sub>H</sub>1 lymfocytů je TNF- $\alpha$  sekretovaný společně s IFN- $\gamma$ . IFN- $\gamma$  sám o sobě aktivuje signální dráhy vedoucí ke zlepšení prezentace nádorových antigenů. Zvyšuje expresi MHC I a toto zvýšení může být v kombinaci s TNF- $\alpha$  dále posíleno (Chang *et al.*, 1992; Fisk *et al.*, 1994; Tekautz *et al.*, 2006; Johnson a Pober, 1990). Dále indukuje expresi komponent imunoproteazomu LMP2, LMP7 a MECL-1 (Aki *et al.*, 1994; Akiyama *et al.*, 1994; Nandi *et al.*, 1996; Groettrup *et al.*, 2001). Tímto způsobem je zvýšena produkce antigenních peptidů, které se lépe váží na MHC I a jsou jím prezentovány. Peptidy vzniklé působením proteazomu v cytoplasmě musí být transportovány do endoplazmatického retikula. Děje se tak pomocí transportérového komplexu TAP tvořeného podjednotkami TAP-1 a TAP-2. Exprese TAP může být v nádorových buňkách snížena. Signalizace indukovaná IFN- $\gamma$  vede ke zvýšení exprese podjednotek TAP-1 i TAP-2 (Fisk *et al.*, 1994; Traversari *et al.*, 1997). Ve výsledku se tak nádorové buňky stávají náchylnější k rozpoznání CTL. IFN- $\gamma$  společně s TNF- $\alpha$  reguluje senzitivitu buněk k indukci senescence. Zvyšuje expresi inhibitorů cyklin-dependentních kináz p21, p27 a aktivuje p16 a p53, což mu umožňuje zastavit buněčný cyklus a navodit v nádorových buňkách senescenci (Mandal *et al.*, 1998; Kominsky *et al.*, 1998; Harvat *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2009; Braumuller *et al.*, 2013). IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$  mění rovněž citlivost nádorových buněk k indukci apoptózy změnou exprese pro- a anti-apoptotických proteinů. Zatímco IFN- $\gamma$  snižuje expresi anti-apoptotických proteinů Bcl-2, Bcl-xL, TNF- $\alpha$  snižuje expresi survivinu (Zhou *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2011). Z hlediska pro-apoptotických proteinů zvyšuje IFN- $\gamma$  expresi proteinu Fas, kaspáz-1, -3, -4, -5, -7, -8 a Bak (Ahn *et al.*, 2002; Tekautz *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2008). Společně s TNF- $\alpha$  pak zvyšuje expresi PUMA a Bim (Barthson *et al.*, 2011).

Druhý mechanismus kontroly nádorového růstu zahrnuje interakci T<sub>H</sub>1 lymfocytů s jinými buňkami imunitního systému, jimž mohou poskytovat pomoc. Asi nejdůležitější je pomoc CD8<sup>+</sup> CTL, které jsou schopné rozpoznat nádorové buňky a tyto odstranit. T<sub>H</sub>1 lymfocyty sekrecí IFN- $\gamma$  indukují v buňkách nádorového prostředí produkci chemokinů, jako jsou CXCL-9, CXCL-10, CCL-2, -3 a -5, které podporují infiltraci a akumulaci CTL (Bos a Sherman, 2010).

Kromě toho se podílejí také na procesu aktivace naivních CTL. Aktivované  $T_H1$  lymfocyty exprimují na svém povrchu CD40L, prostřednictvím kterého interagují s CD40 na povrchu DC. Tato interakce zahajuje proces tzv. licencování, při kterém DC dále zvyšují svůj aktivační stav a stávají se lepšími stimulatory pro CTL (Bennett *et al.*, 1997; Ridge *et al.*, 1998). Při licencování DC dochází ke zvýšení exprese kostimulačních molekul (Caux *et al.*, 1994; Cella *et al.*, 1996; Bullock a Yagita, 2005). Nejdůležitějšími jsou, stejně jako v případě indukce  $T_H1$  lymfocytů, CD80 a CD86 signalizující přes CD28 na CTL (Prilliman *et al.*, 2002). Další kostimulační molekula, jejíž exprese se během procesu licencování zvyšuje je CD70 (Bullock a Yagita, 2005). Jejím partnerem na povrchu CTL je receptor CD27. Kostimulace přes CD70 je nepostradatelná pro indukcii robustní  $CD8^+$  CTL odpovědi (Taraban *et al.*, 2004; Bullock a Yagita, 2005; Van Deusen *et al.*, 2010; Feau *et al.*, 2012). Navíc společně se signály přes receptor CD28, chrání CTL před AICD a umožňuje jejich expanzi (Hendriks *et al.*, 2003). Podílí se také na indukcii paměťových  $CD8^+$  lymfocytů (Taraban *et al.*, 2004; Hendriks *et al.*, 2005). V procesu licencování dochází rovněž ke zvýšení exprese cytokinů IL-12 a IL-15, které fungují jako 3. signál pro diferenciaci a expanzi (Cella *et al.*, 1996; Curtsinger *et al.*, 2003; Oh *et al.*, 2008). Po aktivaci CTL nastává fáze expanze, na níž se  $T_H1$  lymfocyty podílejí sekrecí IL-2 (D'Souza a Lefrancois, 2003; Williams *et al.*, 2006). Produkce IL-2 v nádorovém prostředí podporuje funkci protinádorových CTL, které jsou následně schopny eliminovat nádorové buňky (Bos a Sherman, 2010). Pomoc  $T_H1$  je vyžadována i v efektorové fázi, kdy zabraňuje předčasné kontrakci efektorových CTL (Ballesteros-Tato *et al.*, 2013). V nádorech stejně jako v případě chronických infekcí se můžeme setkat s jejich funkčním vyčerpáním. Vyčerpané CTL ztrácí schopnost produkovat cytokiny a zabíjet cílové buňky. Výzkum na modelech chronické infekce naznačuje, že přítomnost  $T_H1$  lymfocytů dokáže do jisté míry chránit CTL před vyčerpáním a je nepostradatelná pro udržení jejich funkčnosti v delším časovém horizontu (Matloubian *et al.*, 1994; Frank *et al.*, 2010; Aubert *et al.*, 2011). Navíc je pomoc zprostředkovaná  $T_H1$  lymfocyty nepostradatelná pro udržování paměťových CTL (Sun *et al.*, 2004).

Kromě CTL se  $T_H1$  pomocí dostává i buňkám vrozené imunity, jako jsou makrofágy, které pod vlivem  $IFN-\gamma$  diferencují v protinádorový fenotyp M1 (Duluc *et al.*, 2009).

#### **2.2.2.1.1.2. $T_H2$ lymfocyty**

Dalším fenotypem  $CD4^+$  T-lymfocytů detekovaným v nádorech jsou  $T_H2$  lymfocyty, které jsou charakteristické expresí cytokinů IL-4, IL-5 a IL-13. Hlavním TF řídícím jejich diferenciaci je GATA-3, který se váže do promotorů a enhancerů pro IL-4, IL-5 a IL-13, čímž podporuje jejich expresi (Zhang *et al.*, 1998; Kishikawa *et al.*, 2001; Zeng 2013; Lee 2014). Navíc funguje jako represor diferenciaci  $T_H1$  lymfocytů (Ouyang *et al.*, 1998). Snižuje expresi IL-12R, STAT-4 a inhibuje expresi Runx-3 (Ouyang *et al.*, 1998; Usui *et al.*, 2003; Yagi *et al.*, 2010).

Expresí GATA-3 je detekovatelná již v naivních T-lymfocytech, kde musí být jeho funkce kontrolována, aby nedocházelo k samovolné diferenciaci v T<sub>H</sub>2 fenotyp (Ho *et al.*, 2009). Na kontrole se podílí další TF jako FOG a Runx-1, které oslabují funkci GATA-3 jako transkripčního faktoru a blokují tak spontánní T<sub>H</sub>2 diferenciaci (Zhou *et al.*, 2001; Kurata *et al.*, 2002; Komine *et al.*, 2003). Po setkání se zralou DC a rozpoznání antigenu prostřednictvím TCR získává naivní T-lymfocyt první signál, který vede k aktivaci TF NFAT, AP-1 a NF-κB, které spolupracují s GATA-3 na indukci exprese T<sub>H</sub>2 cytokinů (Zeng, 2013). NFAT se navíc váže rovněž do promotoru GATA-3 a zvyšuje tak jeho expresi (Scheinman a Avni, 2009). Po primární interakci MHC-TCR dochází k vazbě mezi CD28 a CD80/CD86 a k další aktivaci DC a naivního T-lymfocytu. Zvyšuje se exprese kostimulačních molekul a jejich receptorů. Na indukci T<sub>H</sub>2 fenotypu se podílejí především kostimulační molekuly ICOS, CD30, DR3, OX40, Tim-1, Tim-4 a rodina SLAM receptorů, které podporují expresi IL-4 a blokují diferenciaci T<sub>H</sub>1 lymfocytů (Jenkins *et al.*, 2007; Chen a Flies, 2013; Kamachi *et al.*, 2014). Kromě kostimulačních molekul exprimují aktivované DC také Jagged-1 a -2, které v T-lymfocytech aktivují signální dráhu Notch, rovněž podporující expresi GATA-3 (Amsen *et al.*, 2004; Amsen *et al.*, 2007; Fang *et al.*, 2007; Scheinman a Avni, 2009). Souběžně s prvotním zvýšením GATA-3 v časných fázích aktivace T-lymfocytu zvyšuje také exprese regulačních faktorů, ta ovšem rychle klesá, čímž umožňuje iniciaci diferenciaci (Zeng 2013). Dále dochází k iniciaci produkce IL-2, který přes IL-2R (CD25) aktivuje STAT-5 (Moriggl *et al.*, 1999). Ten zvyšuje expresi IL-4R, čímž zvyšuje senzitivitu T-lymfocytů vůči IL-4 (Liao *et al.*, 2008). STAT-5 a GATA-3 se váží do regulačních míst v *il4* genovém lokusu a zvyšují jeho expresi (Zhu *et al.*, 2003; Cote-Sierra *et al.*, 2004; Zeng 2013). Produkovaný IL-4 signalizuje přes IL-4R, což vede k aktivaci STAT-6. Ten se váže do promotoru GATA-3 a zvyšuje jeho expresi (Scheinman a Avni, 2009). Navíc se STAT-6 váže na celou řadu genů důležitých pro diferenciaci T<sub>H</sub>2 lymfocytů (Goenka a Kaplan, 2011). APC mohou dále sekretovat IL-6, který v T-lymfocytech aktivuje STAT-3 signalizaci. STAT-3 následně podporuje optimální diferenciaci T<sub>H</sub>2 lymfocytů tím, že zvyšuje dostupnost T<sub>H</sub>2 genových lokusů a schopnost STAT-6 se k nim vázat (Stritesky *et al.*, 2011). Mezi další významné TF patří DEC-2, který indukuje expresi JunB a GATA-3, což dále podporuje produkci T<sub>H</sub>2 cytokinů (Yang *et al.*, 2009). Expresí IL-4 je také posílena aktivitou TF c-Maf a IRF-4, které kooperují s NFAT na aktivaci IL-4 promotoru (Zeng, 2013).

V nádorové mikroprostředí se vyskytuje celá řada faktorů upřednostňujících diferenciaci T<sub>H</sub>2 lymfocytů. Dochází zde k ovlivnění maturace a funkce DC. Můžeme se zde setkat s produkcí IL-10, který v DC snižuje expresi IL-12 (Duramad *et al.*, 2003). Takové DC následně indukují v naivních CD4<sup>+</sup> T lymfocytech T<sub>H</sub>2 diferenciaci (Liu *et al.*, 1998; Fabricius *et al.*, 2010). Ke snížení produkce IL-12 dále přispívá také nádorová hypoxie a produkce PGE<sub>2</sub>, který navíc zvyšuje expresi OX40L důležitého pro indukci a expanzi T<sub>H</sub>2

lymfocytů (Yang *et al.*, 2009; Vieira *et al.*, 2000; Fabricius *et al.*, 2010; Krause *et al.*, 2009; Jenkins *et al.*, 2007; Kamachi *et al.*, 2014). Na zvýšení exprese OX40L a instruování DC k polarizaci směrem k T<sub>H</sub>2 fenotypu se rovněž podílí CAF, a to prostřednictvím sekrece cytokinu TSLP (De *et al.*, 2011; Ito *et al.*, 2005; Kitajima a Ziegler, 2013). DC jsou dále v nádorovém prostředí vystaveny působení různých proteáz. Tyto mohou odštěpovat z povrchu receptory pro IFN I, což je opět spojeno s inhibicí produkce IL-12 a preferenční indukci zánětlivých T<sub>H</sub>2 lymfocytů (Godefroy *et al.*, 2011). Buňky nádorového stromatu jsou rovněž producenty cytokinů a chemokinů, jako např. IL-6 a CCL-2, které opět podporují diferenciaci v T<sub>H</sub>2 fenotyp (Rincon *et al.*, 1997; Karpus *et al.*, 1997; Gu *et al.*, 2000).

Preferenční indukce T<sub>H</sub>2 lymfocytů v nádorovém prostředí naznačuje jejich roli v podporování nádorového růstu. Toto je rovněž potvrzeno klinickým pozorováním např. u nádorů vaječníků, trávicího traktu a pankreatu (Kusuda *et al.*, 2005; Tabata *et al.*, 1999; Ubukata *et al.*, 2010; Tassi *et al.*, 2008; De *et al.*, 2011). Naopak u Hodgkinova lymfomu a prsního karcinomu byl pozorován pozitivní vliv T<sub>H</sub>2 infiltrace (Schreck *et al.*, 2009; Yoon *et al.*, 2010). Je tedy možné, že T<sub>H</sub>2 lymfocyty mohou mít v určitých případech i protinádorové vlastnosti.

Lymfocyty typu T<sub>H</sub>2 jsou charakteristické produkcí IL-4, IL-5 a IL-13, kterými mohou ovlivňovat charakter imunitní odpovědi v nádorovém mikroprostředí. Asi nejvýznamnější je schopnost IL-4 inhibovat diferenciaci protinádorové T<sub>H</sub>1 imunitní odpovědi, inhibicí exprese IL-12R, STAT-4, Runx-3 (Ouyang *et al.*, 1998; Usui *et al.*, 2003; Yagi *et al.*, 2010). Kromě toho T<sub>H</sub>2 lymfocyty prostřednictvím IL-4 a IL-13 indukují polarizaci M2 makrofágů, které následně podporují nádorový růst, angiogenezi, invazivitu a tvorbu metastáz (Mantovani *et al.*, 2004; Gocheva *et al.*, 2010; DeNardo *et al.*, 2009). IL-13 navíc v makrofázích a myeloidních buňkách indukuje expresi TGF- $\beta$ , který je významný pro indukci Treg a inhibici CTL (Fichtner-Feigl *et al.*, 2006; Terabe *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2003; Thomas a Massague, 2005). T<sub>H</sub>2 lymfocyty jsou známé především svou schopností regulovat eozinofilní granulocyty. IL-4 byl původně identifikován jako diferenciací faktor pro eozinofily (Sanderson *et al.*, 1986). Bylo pozorováno, že IL-4 působí na endoteliální buňky, na nichž zvyšuje expresi adhezivních molekul a tak podporuje extravazaci eozinofilů z krevního řečiště (Schleimer *et al.*, 1992). Kromě toho je schopný indukovat expresi eotaxinu (Mochizuki *et al.*, 1998; Mochizuki *et al.*, 1999). Podobně jako IL-4 i IL-5 funguje jako faktor podporující diferenciaci a aktivaci eozinofilů (Yamaguchi *et al.*, 1988). Navíc podporuje přežívání maturovaných eozinofilů a působí na eozinofily jako chemoatraktant (Yamaguchi *et al.*, 1988; Yamaguchi *et al.*, 1991). Role eozinofilů v nádorech není jasně definována. Mohou působit protinádorově a to především sekrecí ECP, který vytváří póry v cytoplazmatických membránách a lyzuje tak nádorové buňky (Young *et al.*, 1986; Navarro *et al.*, 2008). Opět je ovšem nutné neopomíjet kontext. Eozinofily kromě ECP sekretují také růstové faktory jako b-FGF, PDGF, VEGF, TGF- $\beta$ , MMP-9 a další

faktory, které se mohou podílet na procesu angiogeneze (Pereira *et al.*, 2011). VEGF a TGF- $\beta$  se dále mohou podílet na modulaci protinádorové imunitní odpovědi (Oyama *et al.*, 1998; Mimura *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2003). I samotný ECP dokáže inhibovat aktivaci T-lymfocytů (Pereira *et al.*, 2011). Kromě eozinofilů mohou IL-4 a IL-5 působit také na bazofily a především mastocyty, které jsou považovány za pronádorové, jelikož mohou podporovat angiogenezi a inhibovat protinádorovou imunitní odpověď (Schleimer *et al.*, 1992; Denburg *et al.*, 1991; Ishida *et al.*, 1991; Tsuji *et al.*, 1990; Soucek *et al.*, 2007; Wasiuk *et al.*, 2012). Cytokiny sekretované T<sub>H</sub>2 lymfocyty mohou rovněž podporovat protilátkovou imunitní odpověď. Metaanalýza studií zabývajících se protinádorovou protilátkovou imunitou ukázala, že většina identifikovaných antigenů (68%), proti kterým byla objevena tvorba protilátek, jsou intracelulární proteiny. Je tedy evidentní, že protilátky proti takovým cílům nemají na růst nádorů vliv, jelikož jsou skryty uvnitř buňky. Naopak membránově vázané proteiny, které jsou přístupné protilátkám, tvořily pouze 21% (Reuschenbach *et al.*, 2009). Příkladem povrchových antigenů, proti kterým se mohou vytvářet protilátky s pozitivním účinkem na přežití, jsou MUC-1 a Her/2neu (von Mensdorff-Pouilly *et al.*, 2000; Montgomery *et al.*, 2005). Tyto antigeny jsou mimo jiné exprimovány také na nádorových buňkách karcinomu prsu.

Kromě působení na buňky imunitního systému mohou IL-4, IL-5 a IL-13 působit přímo na nádorové buňky. Bylo pozorováno, že IL-4 podporuje růst nádorových buněk a chrání je před indukcí apoptózy zvýšením exprese antiapoptotických proteinů jako jsou cFLIP, Bcl-xL, Bcl-2 a survivinu (Prokopchuk *et al.*, 2005; Koller *et al.*, 2010; Todaro *et al.*, 2008; Roca *et al.*, 2012). Navíc činní nádorové kmenové buňky rezistentní proti chemoterapii (Todaro *et al.*, 2007). Pokusy *in vitro* a na myších modelech ukázaly, že i v případě IL-13 dochází k podpoře proliferace, invazivity a tvorby metastáz (Fujisawa *et al.*, 2012). Bylo např. pozorováno, že IL-13 zvyšuje expresi MMP v pankreatických buňkách (Fujisawa *et al.*, 2009). Navíc zvýšená exprese receptoru IL-13R $\alpha$ 2 asociuje s pozdním stádiem a nižším přežíváním u kolorektálního karcinomu (Barderas *et al.*, 2012). Také IL-5 může zřejmě ovlivňovat nádorové buňky. Bylo pozorováno, že exprese IL-5 je zvýšena u pacientů s karcinomem močového měchýře invadujícím do svalů. Navíc přidání rekombinantního IL-5 k buněčným liniím, odvozeným od karcinomu močového měchýře, vedlo ke zvýšení exprese MMP a aktivaci MAPK dráhy důležité pro buněčné přežívání (Lee *et al.*, 2012).

#### **2.2.2.1.1.1.3. T<sub>H</sub>9 lymfocyty**

T<sub>H</sub>9 lymfocyty byly původně považovány za podskupinu T<sub>H</sub>2 lymfocytů. Později se ovšem ukázalo, že se jedná o samostatnou skupinu v rámci CD4<sup>+</sup> T-lymfocytů. V rámci imunitního systému jsou stejně jako T<sub>H</sub>2 lymfocyty zodpovědné za obranu proti helmitům a podílí se na alergických reakcích (Schmitt *et al.*, 2014). Hlavním TF řídícím T<sub>H</sub>9 diferenciaci je PU.1 (Chang *et al.*, 2010). Diferenciace T<sub>H</sub>9 lymfocytů je velmi podobná T<sub>H</sub>2 lymfocytům.

Po rozpoznání antigenu TCR dochází k aktivaci NFAT, jehož vazba do promotoru IL-9 genu ho zpřístupňuje pro vazbu NF- $\kappa$ B a aktivuje jeho transkripci (Jash *et al.*, 2012). Dalším TF aktivovaným TCR podporujícím T<sub>H</sub>9 diferenciaci je IRF-4, který se přímo váže do promotoru IL-9 (Nayar *et al.*, 2012; Staudt *et al.*, 2010). T-lymfocyt dále přijímá signály přes kostimulační receptory. Důležitou roli zde stejně jako v případě T<sub>H</sub>2 lymfocytů hraje OX40, který aktivuje NF- $\kappa$ B podporující expresi IL-9. Navíc blokuje signalizace přes OX40 diferenciaci Treg a T<sub>H</sub>17 lymfocytů řízenou TGF- $\beta$  (Xiao *et al.*, 2012). Na této regulaci se podílí také signální dráha Notch, při níž Notch-1 vytváří komplex se Smad-3 proteinem, který je aktivován TGF- $\beta$  signalizací. Tento komplex se pak společně s RBP-J $\kappa$  váže do promotoru genu pro IL-9 (Elyaman *et al.*, 2012). Pro směřování diferenciaci jsou pak důležité signály z prostředí. Hlavními cytokiny řídícími vývoj T<sub>H</sub>9 lymfocytů jsou IL-4 a TGF- $\beta$  (Dardalhon *et al.*, 2008). Role IL-4 spočívá v inhibici diferenciaci Treg a aktivaci STAT-6 dráhy, která dále podporuje expresi IRF-4 a také GATA-3 (Goswami *et al.*, 2012). Expresí GATA-3 by mohla vést k indukci diferenciaci v T<sub>H</sub>2 fenotyp. Ta je ovšem blokována díky expresi TF PU.1 indukovaného TGF- $\beta$ , který interaguje s GATA-3 a inhibuje jeho funkci (Chang *et al.*, 2010; Goswami *et al.*, 2012; Chang *et al.*, 2005). Důležitá je také signalizace indukovaná IL-2, která vede k aktivaci STAT-5. Ten se váže do IL-9 lokusu a zajišťuje jeho expresi (Yang *et al.*, 2013).

Role T<sub>H</sub>9 lymfocytů v nádorech není ještě zcela prozkoumána. Data získaná na myších modelech a za použití *in vitro* diferencovaných T<sub>H</sub>9 lymfocytů ukazují na protinádorový efekt. Bylo pozorováno, že neutralizace IL-9 podporuje růst nádorů a naopak podání IL-9 ho zpomaluje (Lu *et al.*, 2012; Purwar *et al.*, 2012). Transfer *in vitro* diferencovaných T<sub>H</sub>9 lymfocytů byl schopen potlačit růst nádorů v důsledku indukce robustní cytotoxické CD8<sup>+</sup> odpovědi. Data naznačují, že pomoc poskytovaná CTL je nepřímá a je založena na indukci CCL-20, který podporuje indukci zánětu a infiltraci DC (Lu *et al.*, 2012). Navíc díky produkci IL-3 zvyšují v DC expresi anti-apoptických proteinů, jako např. Bcl-XL, a podporují jejich přežívání (Park *et al.*, 2014). DC následně přijímají antigen a prezentují ho CD8<sup>+</sup> CTL. Aktivované CTL pak díky CCL-20 rovněž ve zvýšené míře migrují do nádorů (Lu *et al.*, 2012). Protinádorový efekt do jisté míry potvrzují i klinická data z biopsií melanomu, kdy je hladina T<sub>H</sub>9 lymfocytů snížena v porovnání se zdravou kůží (Purwar *et al.*, 2012). Na základě těchto dat ovšem není možné dělat definitivní závěry ohledně prospěšnosti T<sub>H</sub>9 lymfocytů pro protinádorovou imunitní odpověď. Bude ještě třeba dalších studií na jiných nádorových modelech a také klinických pozorování. Studium T<sub>H</sub>9 lymfocytů by mohlo být komplikováno jejich fenotypovou plasticitou, která je v současnosti předmětem diskuze (Schmitt *et al.*, 2014).

#### 2.2.2.1.1.1.4. T<sub>H</sub>17 lymfocyty

T<sub>H</sub>17 lymfocyty představují vysoce prozánětlivé lymfocyty, které se významnou měrou podílejí na koordinaci přirozené a adaptivní imunity při obraně organismu před bakteriálními a fungálními infekcemi (van Beelen *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2012; Acosta-Rodriguez *et al.*, 2007; Rudner *et al.*, 2007; Wuthrich *et al.*, 2011). Byly ovšem objeveny především díky své patologické funkci v autoimunitních chorobách (Sallusto a Lanzavecchia, 2009; Singh *et al.*, 2014). Biologie T<sub>H</sub>17 lymfocytů je vysoce komplikovaná, jelikož mají vysoce plastický fenotyp. Jsou charakteristické produkcí IL-17A, mohou ovšem produkovat rovněž IL-17F, IL-21, IL-22, CCL-20, GM-CSF a díky své plasticitě dokonce IFN- $\gamma$  (Korn *et al.*, 2009; Codarri *et al.*, 2011; El-Behi *et al.*, 2011; Kebir *et al.*, 2009; Kryczek *et al.*, 2009). Diferenciace naivních T-lymfocytů na T<sub>H</sub>17 fenotyp je řízena cytokinovými signály. Pro diferenciaci T<sub>H</sub>17 lymfocytů jsou v experimentálních podmínkách používány různé kombinace cytokinů TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-21 a IL-23 (Mangan *et al.*, 2006; Veldhoen *et al.*, 2006; Acosta-Rodriguez *et al.*, 2007; Chung *et al.*, 2009; Bailey *et al.*, 2014). Role jednotlivých cytokinů a jimi indukovaných signálních drah jsou stále předmětem intenzivního bádání. Předpokládá se, že funkce TGF- $\beta$  spočívá především v inhibici T-bet, GATA-3, které řídí diferenciaci jiných fenotypů (Park *et al.*, 2005; Das *et al.*, 2009). Alternativou k TGF- $\beta$  může být IL-1 $\beta$ , který podporuje diferenciaci T<sub>H</sub>17 lymfocytů indukci ROR $\gamma$ t a TF IRF-4, který přispívá k transkripci genů důležitých pro T<sub>H</sub>17 fenotyp, jako např. IL-21 (Acosta-Rodriguez *et al.*, 2007; Chung *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2008). Druhým cytokinem důležitým pro diferenciaci T<sub>H</sub>17 lymfocytů je IL-6, jehož funkcí je modulace TGF- $\beta$  signalizace, která by jinak vedla k diferenciaci na Treg (Bettelli *et al.*, 2006). Signalizace vycházející z IL-6R aktivuje STAT-3, který se následně váže do promotoru genu pro hlavní transkripční faktory T<sub>H</sub>17 lymfocytů ROR $\gamma$ t a ROR $\alpha$  (Yang *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2008; Durant *et al.*, 2010). Společně pak indukují expresi IL-17, IL-21, IL-23R a dalších genů (Durant *et al.*, 2010). Kromě indukce genů definujících T<sub>H</sub>17 fenotyp, inhibuje ROR $\gamma$ t geny, které by ho mohly destabilizovat (Ciofani *et al.*, 2012). V další fázi diferenciace dochází v T<sub>H</sub>17 lymfocytech k indukci exprese IL-21. Ten pak parakrinním působením, mimo jiné další aktivací STAT-3, vede k expanzi a stabilizaci T<sub>H</sub>17 lymfocytů (Nurieva *et al.*, 2007). Následně dochází k jejich maturaci pod vlivem IL-23, který je produkován APC (McGeachy *et al.*, 2009; Pirhonen *et al.*, 2002; Sheibanie *et al.*, 2004). Signalizace vycházející z IL-23R opět aktivuje STAT-3, čímž posiluje expresi ROR $\gamma$ t, který následně sám či v kombinaci se STAT-3 zvyšuje expresi IL-17 a IL-22 (Yang *et al.*, 2011; Sanos *et al.*, 2009; Zuniga *et al.*, 2013). Bez signálů vycházejících z IL-23R nejsou T<sub>H</sub>17 schopny získat zánětlivý fenotyp (McGeachy *et al.*, 2007; McGeachy *et al.*, 2009). Nejsou schopny snížit expresi IL-2, který po vazbě CD25 aktivuje STAT-5 kompetující se STAT-3 o vazebná místa v genomu (McGeachy *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2011). Snížena je rovněž jejich schopnost proliferovat, udržet si

expresi IL-17 a exprimovat GM-CSF (McGeachy *et al.*, 2009; El-Behi *et al.*, 2011; Codarri *et al.*, 2011). Ukazuje se ovšem, že ne všechny kombinace cytokinů jsou ekvivalentní z hlediska funkčnosti T<sub>H</sub>17 lymfocytů. Pokusy na modelu experimentální autoimunní encefalomyelitidy odhalily, že kombinace TGF- $\beta$ 1 a IL-6 sice v naivních T-lymfocytech indukuje produkci IL-17A, ale pro plnou maturaci v prozánětlivý fenotyp je vyžadována přítomnost IL-23 (McGeachy *et al.*, 2007; McGeachy *et al.*, 2009). Bez přítomnosti IL-23 lymfocyty získaly spíše tolerogenní fenotyp, kdy sekretovaly kromě IL-17A také IL-10 (McGeachy *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2012). Navíc takto diferencované T<sub>H</sub>17 lymfocyty nebyly schopny udržet vysokou hladinu exprese IL-17 a byly ovlivněny jejich efektorové funkce (McGeachy *et al.*, 2009). Při použití TGF- $\beta$  může také docházet k indukci exprese ektonukleotidáz CD39 a CD73, které produkují imunosupresivní adenosin (Chalmin *et al.*, 2012). Oproti tomu T<sub>H</sub>17 lymfocyty diferencované za přítomnosti IL-1 $\beta$ , IL-6 a IL-23, jsou vysoce zánětlivé a neexprimují CD39, CD73 (Chalmin *et al.*, 2012). Záleží také na koncentraci TGF- $\beta$ 1, jelikož jeho příliš vysoká koncentrace naopak funkci T<sub>H</sub>17 lymfocytů inhibuje. Děje se tak indukci FoxP3, který váže a inhibuje hlavní TF T<sub>H</sub>17 lymfocytů ROR $\gamma$ t a ROR $\alpha$  (Zhou *et al.*, 2008; Du *et al.*, 2008). Dále dochází k indukci imunosupresivního cytokinu IL-10 a snížení exprese receptoru IL-23R (McGeachy *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2008). Ukazuje se, že jednotlivé izofomy TGF- $\beta$  mají odlišný potenciál pro indukci T<sub>H</sub>17 lymfocytů. Při použití TGF- $\beta$ 3 dochází oproti TGF- $\beta$ 1 ke zvýšení exprese IL-23R a takto diferencované lymfocyty jsou vysoce zánětlivé (Lee *et al.*, 2012). TGF- $\beta$ 3 navíc zřejmě vytváří pozitivní zpětnovazebnou smyčku, při níž dochází v důsledku působení IL-23 k indukci exprese TGF- $\beta$ 3 a ten následně zvyšuje expresi IL-23R (Lee *et al.*, 2012).

Jak již bylo zmíněno, tak T<sub>H</sub>17 lymfocyty jsou vysoce plastickou skupinou, která může konvertovat na zánětlivé lymfocyty fenotypem podobné T<sub>H</sub>1 lymfocytům (Lee *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2014). Bylo rovněž pozorováno, že zřejmě může docházet ke vzájemné konverzi mezi Treg a T<sub>H</sub>17 lymfocyty, kdy byly detekovány buňky exprimující jak FoxP3 tak ROR $\gamma$ t, které měly imunosupresivní charakter (Koenen *et al.*, 2008; Valmori *et al.*, 2010; Obermajer *et al.*, 2014; Lochner *et al.*, 2008; Tartar *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2011). Určité vysvětlení této plasticity podává regulace diferenciací T<sub>H</sub>17 lymfocytů na úrovni TF. Ta probíhá ve třech fázích. Iniciální fáze se vyznačuje transkripční odpovědí indukovanou časnou signalizací jako např. IL-6 a TGF- $\beta$ . V této fázi dochází k aktivaci TF IRF4 a BATF (Yosef *et al.*, 2013). TF IRF-4 se společně s heterodimerem BATF/JunB váže do regulačních elementů genů významných pro T<sub>H</sub>17 fenotyp. Tato vazba následně umožňuje vazbu dalších iniciačních TF, mezi něž patří STAT-3 (Ciofani *et al.*, 2012; Yosef *et al.*, 2013). Iniciální TF následně kooperují a indukují transkripci genu *Rorc*, kódujícího ROR $\gamma$ t, čímž zahajují druhou diferenciační fázi (Yosef *et al.*, 2013). ROR $\gamma$ t následně funguje jako modulátor zahájeného diferenciačního programu, kdy reprimuje expresi genů podílejících se na

diferenciaci jiných T-buněčných fenotypů. Příkladem může být represe IL-4RA a IL-12rb2 (Ciofani *et al.*, 2012). Naopak podporuje expresi genů pozdní fáze diferenciace, mezi které patří IL-17A, IL-17F, IL-23R (Ciofani *et al.*, 2012; Yosef *et al.*, 2013). V porovnání s iniciačními TF je efekt ROR $\gamma$ t na celkovou genovou expresi daleko menší. Soustřeďuje se především na T<sub>H</sub>17 specifické geny jako např. IL-17 a IL-23R (Ciofani *et al.*, 2012; Peters a Yosef, 2014). Rovněž při utváření T<sub>H</sub>17 specifických regulačních elementů je vliv ROR $\gamma$ t velmi malý. Jeho vazebná místa spadají vesměs do oblastí předem připravených vazbou iniciačních TF s výjimkou několika míst v genovém lokusu *Il-17* (Ciofani *et al.*, 2012; Peters a Yosef, 2014). Iniciační faktory IRF-4, BATF a STAT-3 společně vytvářejí pozitivní zpětnovazebné smyčky, které posilují jejich expresi a expresi ROR $\gamma$ t. Samotné ROR $\gamma$ t se těchto pozitivních interakcí neúčastní (Ciofani *et al.*, 2012). Závislost funkce ROR $\gamma$ t na iniciačních faktorech, především STAT-3, které jsou ovlivněny vnějšími faktory, zřejmě přispívá k fenotypové plasticitě T<sub>H</sub>17 lymfocytů (McGeachy *et al.*, 2009; Ciofani *et al.*, 2012).

Infiltrace T<sub>H</sub>17 lymfocytů byla pozorována u celé řady nádorů (Su *et al.*, 2010). Nádorové mikroprostředí je bohaté na chemokiny, jako např. CCL-5 a CCL-2, které T<sub>H</sub>17 lymfocyty přitahují (Su *et al.*, 2010). Navíc nádorové buňky a komponenty nádorového mikroprostředí, jako CAF, adipocyty, TAM a MDSC, produkují cytokinové faktory podporující diferenciaci T<sub>H</sub>17 lymfocytů (Su *et al.*, 2010; Dirat *et al.*, 2011; Kryczek *et al.*, 2009; Chatterjee *et al.*, 2013). Jejich role v nádorovém mikroprostředí představuje ovšem vysoce kontroverzní téma. V některých studiích byla popsána pozitivní korelace mezi výskytem T<sub>H</sub>17 lymfocytů a dlouhodobým přežíváním, v jiných naopak korelace negativní (Fridman *et al.*, 2012). Pozitivní účinek byl pozorován především v případě ovariálního karcinomu. Infiltrace T<sub>H</sub>17 lymfocytů pozitivně korelovala s infiltrací T<sub>H</sub>1, CTL, NK buněk (Kryczek *et al.*, 2009). Navíc bylo pozorováno, že v pozdějších stádiích ovariálního karcinomu dochází k jejich úbytku a naopak ke zvýšené infiltraci Treg (Fialova *et al.*, 2013). Podobná korelace mezi výskytem T<sub>H</sub>17 lymfocytů v nádorovém mikroprostředí a infiltrací CD8 CTL a NK buněk byla pozorována u ezofageálního karcinomu (Lv *et al.*, 2011). Negativní vliv T<sub>H</sub>17 lymfocytů na přežívání pacientů byl pozorován u kolorektálního karcinomu, karcinomu žaludku, nádorů plic, karcinomu prsu a hepatocelulárního karcinomu, kdy jejich výskyt pozitivně koreloval s angiogenezí či lymfangiogenezí v nádorech (Tosolini *et al.*, 2011; Ye *et al.*, 2012; Iida *et al.*, 2011; Su *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2010; Benevides *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2009). Velmi kontroverzní jsou výsledky ze studií karcinomu prostaty. V jedné korelovala přítomnost T<sub>H</sub>17 lymfocytů s pomalejší progresí onemocnění, naopak ve druhé studii s rychlejší (Sfanos *et al.*, 2008; Derhovanessian *et al.*, 2009). Kromě solidních nádorů byl negativní vliv T<sub>H</sub>17 lymfocytů pozorován také u AML, kdy byla pozorována stimulace proliferace leukemických buněk IL-17 (Han *et al.*, 2014).

Ani v případě nádorových modelů není jasné zda  $T_H17$  lymfocyty představují součást protinádorové imunity nebo složku nádorového mikroprostředí podporující růst nádorů. Zatímco pokusy s adoptivním transferem  $T_H17$  lymfocytů ukazují na jejich schopnost potlačit růst ovariálního karcinomu a eradikovat plně vyvinuté nádory indukované melanomovou linií B16, pokusy s buněčnými liniemi odvozenými od karcinomu tlustého střeva ukazují spíše na jejich schopnost inhibovat protinádorovou imunitu (Kryczek *et al.*, 2011; Muranski *et al.*, 2008; Chalmin *et al.*, 2012). Nejednoznačné jsou rovněž pokusy na transgenních myších, u nichž byl pomocí genové manipulace deletován gen pro IL-17 nebo IL-17R. Bylo pozorováno, že tyto myši jsou rezistentní proti indukci kožních nádorů chemickými karcinogeny (Wang *et al.*, 2010; He *et al.*, 2012). Kromě toho bylo pozorováno, že u těchto myši dochází k pomalejšímu růstu lymfomů, karcinomů prostaty, nádorů plic, močového měchýře a B16 melanomů (He *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2014). V tomto případě je především pozorování inhibice melanomů vyvolaných buněčnou linií B16 velmi kontroverzní, jelikož jiné studie ukazují, že myši deficientní na IL-17A jsou náchylnější na vznik plicního melanomu vyvolaného B16 buňkami a  $T_H17$  lymfocyty jsou důležité pro indukci robustní protinádorové CTL odpovědi (Martin-Orozco *et al.*, 2009; Ankathatti *et al.*, 2011).

Současná literatura kontroverzi ohledně role  $T_H17$  lymfocytů vysvětluje jejich plasticitou, která vyplývá z výše zmíněné transkripční regulace jejich diferenciací. Předpokládá se tedy, že různá nádorová mikroprostředí indukují různé efektorové funkce  $T_H17$  lymfocytů. Nádorové mikroprostředí, které je bohaté na IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-23, popř. obsahuje TGF- $\beta$ 3 umožňuje diferenciaci silně zánětlivých  $T_H17$  lymfocytů (El-Behi *et al.*, 2011; Codarri *et al.*, 2011; Chalmin *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2012). Tyto následně mohou podporovat protinádorovou imunitní odpověď různými způsoby. Mohou sekretovat GM-CSF, který je považován za stimulant protinádorové imunity (El-Behi *et al.*, 2011; Codarri *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2006). Je schopný podporovat maturaci DC a prostřednictvím nich indukovat robustní imunitní odpověď (Shi *et al.*, 2006). Zánětlivé  $T_H17$  lymfocyty dále sekretují IL-17F a IL-21 inhibující angiogenezi (Tong *et al.*, 2012; Castermans *et al.*, 2008). Kromě toho IL-21 působí na celou řadu dalších buněk imunitního systému. Je schopný zvyšovat proliferaci, cytotoxickou aktivitu a produkci IFN- $\gamma$  NK buněk. Podporuje proliferaci CD8<sup>+</sup> CTL a podílí se na diferenciaci paměťových buněk. Zároveň chrání CD8<sup>+</sup> lymfocyty před senescencí (Yi *et al.*, 2010). Dále bylo pozorováno, že inhibuje diferenciaci  $T_H2$  lymfocytů (Lin *et al.*, 2014).

$T_H17$  lymfocyty jsou považovány za paměťové kmenové buňky, které mohou díky své plasticitě dát vznik i jiným fenotypům (Muranski *et al.*, 2011; Kryczek *et al.*, 2011). Zánětlivé  $T_H17$  lymfocyty tak mohou v nádorovém mikroprostředí pod vlivem IL-12, konvertovat na IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> produkující  $T_H17$  lymfocyty schopné eradikovat nádory a později na lymfocyty podobné  $T_H1$ , které již neprodukují IL-17, ale pouze IFN- $\gamma$  (Lee *et al.*, 2009; Kryczek *et al.*, 2009; Muranski *et al.*, 2011). IL-17A společně s IFN- $\gamma$  indukuje expresi chemokinů CXCL-9 a

CXCL-10 prostřednictvím nichž zvyšují infiltraci efektorových CD8<sup>+</sup> CTL a NK buněk. Zvyšují rovněž infiltraci DC do nádorů a množství DC nesoucí nádorové antigeny v lokálních lymfatických uzlinách (Martin-Orozco *et al.*, 2009). Dále bylo pozorováno, že T<sub>H</sub>17 lymfocyty produkují CCL-20 nebo mohou indukovat jeho expresi společně s expresí CCL-2 v nádorovém prostředí a tak dále zvyšovat infiltraci CTL. S těmito pak mohou přímo interagovat a aktivovat je (Korn *et al.*, 2009; Ankathatti *et al.*, 2011).

Naopak v prostředí, které obsahuje vysokou hladinu TGF-β1 a obsahuje menší množství IL-6, IL-23 a IL-1β, dochází k indukci pro-nádorových T<sub>H</sub>17 lymfocytů. Tyto mohou exprimovat IL-10 inhibující protinádorovou imunitu (McGeachy *et al.*, 2007). V důsledku působení TGF-β1 exprimují ektonukleotidázy CD39 a CD73, které produkují adenosin suprimující produkci IFN-γ a cytotoxickou funkci CD8<sup>+</sup> CTL (Chalmin *et al.*, 2012). IL-17 produkovaný těmito buňkami může vést k akumulaci myeloidních supresorových buněk (He *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010; He *et al.*, 2012; Chang *et al.*, 2014). Kromě toho bylo pozorováno, že může suprimovat diferenciaci T<sub>H</sub>1 lymfocytů (O'Connor, Jr. *et al.*, 2009). V nádorovém mikroprostředí pak IL-17 indukuje produkci VEGF čímž podporuje angiogenezi nádorů (Numasaki *et al.*, 2003; Ryu *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2011; Chang *et al.*, 2014). IL-17 zároveň indukuje expresi IL-6, prostřednictvím kterého v nádorových buňkách aktivuje STAT-3. Ten pak řídí expresi protiapoptotických proteinů, jako např. Bcl-2 a Bcl-XL (Wang *et al.*, 2009). Tímto nepřímým způsobem zvyšuje množství dělicích se buněk (Chang *et al.*, 2014). IL-17 je schopný indukovat kromě exprese IL-6 také expresi PGE<sub>2</sub> a IL-8 ve fibroblastech (Fossiez *et al.*, 1996; Numasaki *et al.*, 2003). IL-6 a PGE<sub>2</sub> mohou podporovat expanzi CSC (Erez *et al.*, 2010; Rudnick *et al.*, 2011). Sebeobnova CSC je dále posílena CCL-2, jehož expresi T<sub>H</sub>17 podporují (Tsuyada *et al.*, 2012; Ankathatti *et al.*, 2011). Společně pak IL-6, PGE<sub>2</sub> a CCL-2 inhibují maturaci DC, podporují diferenciaci M2 makrofágů (Nemeth *et al.*, 2009; Maggini *et al.*, 2010; Roca *et al.*, 2009; Sierra-Filardi *et al.*, 2014).

#### **2.2.2.1.1.1.5. Regulační T-lymfocyty**

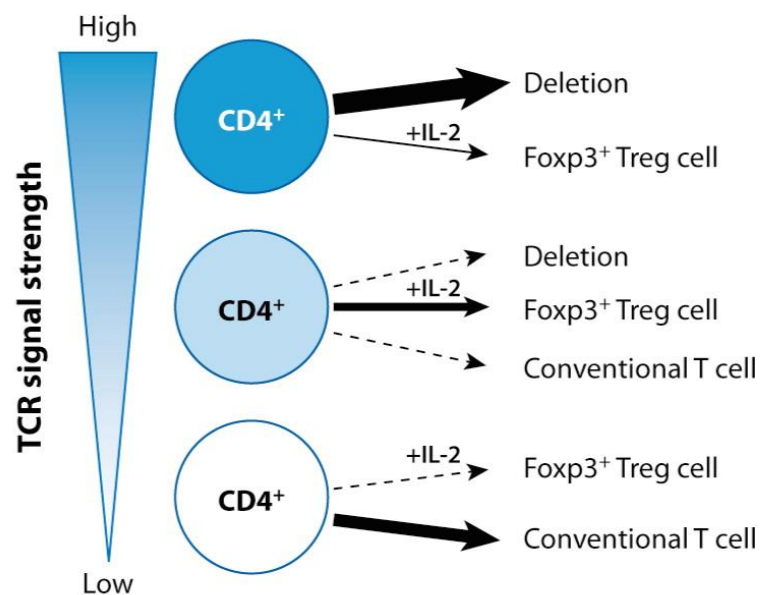
Treg představují významnou součást imunitního systému, která je zodpovědná za udržování tolerance vůči tělu vlastním tkáním a antigenům z prostředí, jako například potravinovým antigenům (Sakaguchi *et al.*, 2010). Treg jsou schopny regulovat a inhibovat funkci složek adaptivní a vrozené imunity, jako např. CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů, NK buněk, B-lymfocytů a APC (Sakaguchi *et al.*, 2008).

V současné době byla identifikována celá řada subtypů Treg. Nejvýznamnějším a nejvíce studovaným typem jsou CD4<sup>+</sup> Treg charakteristické vysokou expresí CD25 a především expresí transkripčního faktoru FoxP3 (Sakaguchi *et al.*, 1995; Fontenot *et al.*, 2003). Ačkoliv je FoxP3 považován za nejspolehlivější znak Treg, k jeho expresi může v menší míře docházet i během aktivace efektorových T-lymfocytů, které nemají imunosupresivní vlastnosti

(Morgan *et al.*, 2005; Gavin *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007). Pro další zpřesnění fenotypu je možné přidat expresi dalších znaků jako např. CD127, jenž je na rozdíl od efektorových T-lymfocytů na Treg exprimován v menší míře (Liu *et al.*, 2006; Seddiki *et al.*, 2006). Fenotyp CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> zahrnuje 2 skupiny Treg a to tzv. přirozené nTreg a indukované iTreg. Pro jejich rozlišení se dá použít exprese Neuropilinu 1 a TF Helios, která je typická především pro nTreg (Weiss *et al.*, 2012; Yadav *et al.*, 2012; Sugimoto *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2013). Tyto dvě skupiny se liší v několika ohledech a to svou diferenciací, metylací genomu, expresí některých genů a předpokládanou funkcí.

#### 2.2.2.1.1.1.5.1.nTreg

Hlavní funkcí nTreg je inhibice sebepoškozující imunitní reakce, při které jsou rozpoznávány tělu vlastní antigeny. K diferenciaci Treg dochází během vývoje T-lymfocytů v thymu z CD4<sup>+</sup> thymocytů, které nesou autoreaktivní TCR rozpoznávající komplex MHC a tělu vlastních peptidů (Jordan *et al.*, 2001; Stritesky *et al.*, 2012). Dle síly počáteční signalizace z TCR může dojít v thymocytech k indukci FoxP3 a diferenciaci v nTreg, nebo v případě silného stimulu k delecii v rámci negativní selekce (Obr. 3). Na rozhodování se v tomto případě podílí rodina jaderných receptorů Nr4a převádějící sílu signálu z TCR na expresi FoxP3 (Sekiya *et al.*, 2013). Intenzita TCR signalizace nejprve reguluje expresi TF Nr4a, který se následně váže do promotoru FoxP3, což je asociováno se změnou represivních histonových modifikací na transkripčně přístupné (Sekiya *et al.*, 2011). Pokud je ovšem TCR signalizace příliš silná zvyšuje se exprese Nr4a dále a toto vede k indukci apoptózy (Fassett *et al.*, 2012; Luo a Li, 2013).



Obr. 3: Síla TCR signalizace a její vliv na diferenciaci CD4<sup>+</sup> thymocytů (Josefowicz *et al.*, 2012)

Nezralé CD4<sup>+</sup> thymocyty, které obdrží prostřednictvím TCR silný signál jsou nejčastěji odstraněny negativní selekcí. Pokud je signalizace vycházející z TCR střední intenzity, mohou thymocyty uniknout delecí a diferencují v nTreg. Thymocyty, které obdržely signály nízké intenzity, dávají vznik konvenčním naivním T-lymfocytům. Tloušťka šípek odráží relativní pravděpodobnost indikovaných diferenciačních osudů.

Ještě před expresí FoxP3 a následně souběžně s ní dochází v thymocytech pod vlivem signálů z TCR k epigenetickým změnám důležitým pro zajištění stability fenotypu nTreg (Ohkura *et al.*, 2012; Samstein *et al.*, 2012). Na úrovni metylace CpG sekvencí je ustanoven vzor specifický pro nTreg, který se vyznačuje především hypometylací genů důležitých pro funkci nTreg jako jsou FoxP3, CD25, CTLA-4, GITR (Ohkura *et al.*, 2012). Metylační vzor nTreg je odlišný od metylace pozorované u iTreg, které až postupem času získávají podobnou metylaci důležitých genetických úseků jako nTreg (Luo a Li, 2013). Dále dochází ke změnám v chromatinové struktuře, při nichž jsou pomocnými faktory předpřipraveny enhancerové regulační elementy pro vazbu FoxP3 (Samstein *et al.*, 2012).

Exprese FoxP3 je řízena z proximálního promotoru a regulačních elementů CNS1 až 3, z nichž každý plní jinou funkci. Zatímco element CNS3 je důležitý pro indukci exprese Foxp3, CNS2 je zodpovědný za udržení jeho stabilní exprese. Element CNS1 je pak důležitý zejména pro iTreg (Zheng *et al.*, 2010). Primární signály pro indukci exprese FoxP3 vycházející nejen z TCR, ale také z kostimulačního receptoru CD28. Bylo pozorováno, že myši postrádající funkční CD28 mají výrazně sníženou tvorbu nTreg (Tai *et al.*, 2005). TCR společně s CD28 spouští signalizaci, která vede k aktivaci NF-κB. Významný je především NF-κB protein c-Rel, jehož delece vede ke snížení tvorby nTreg v thymu (Isomura *et al.*, 2009). C-Rel se přímo podílí na iniciaci transkripce FoxP3 a to několika způsoby. Váže se na CNS3 element, což vede k demetylací CpG sekvencí v této oblasti a umožňuje vazbu dalších TF, jako jsou ATF a CREB (Long *et al.*, 2009). Prvotní vazba c-Rel na CNS3 se zřejmě podílí na zpřístupnění genového lokusu *FoxP3* pro transkripci (Zheng *et al.*, 2010). Dále se c-Rel váže do promotoru genu pro FoxP3, kde organizuje tvorbu enhanceozomu tvořeného NFAT, Smad3 a CREB (Ruan *et al.*, 2009). Kromě NF-κB je v důsledku signalizace TCR a CD28 aktivována řada dalších faktorů jako např. NFAT, AP-1, CREB a ATF které plní více či méně prozkoumané funkce v indukci FoxP3 (Luo a Li, 2013).

Na diferenciaci nTreg se podílejí také cytokiny aktivující TF STAT-5. Jedná se především o IL-2, ale v menší míře rovněž o IL-7 a IL-15 (Vang *et al.*, 2008). Aktivovaný STAT-5 se následně váže do promotoru genu pro FoxP3, čímž indukuje jeho expresi (Burchill *et al.*, 2007). Jistou roli hraje v procesu vývoje nTreg také TGF-β. Jeho význam v tomto případě nespočívá v indukci FoxP3, jako u iTreg, ale spočívá v indukci signalizace chránící prekurzory nTreg v thymu před indukci apoptózy v procesu negativní selekce (Ouyang *et al.*, 2010). Pokud tedy

CD4<sup>+</sup> thymocyt obdrží ty správné signály, dochází k expresi FoxP3, který interaguje s celou řadou proteinů, např. NFAT, NF-κB, RORγt, Runx-1, Eos. Vznikají tak multiproteinové komplexy spouštějící transkripční program charakteristický pro nTreg (Fu *et al.*, 2012; Rudra *et al.*, 2012). Vzniklé komplexy se pak podílejí na inhibici exprese efektorových cytokinů jako např. IL-2, IL-4, IL-17, INF-γ (Bettelli *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2006; Ono *et al.*, 2007; Ichiyama *et al.*, 2008; Pan *et al.*, 2009). Příkladem může být komplex NFAT a FoxP3, který se váže do promotoru genu pro IL-2, což vede k inhibici jeho exprese (Wu *et al.*, 2006). Naopak v jiných případech mohou komplexy FoxP3 s NFAT, NF-κB a Runx-1 fungovat jako transkripční aktivátory, kdy iniciují expresi CD25, CTLA-4 a GITR, které jsou na Treg stabilně exprimovány (Wu *et al.*, 2006; Camperio *et al.*, 2012; Ono *et al.*, 2007). Komplex FoxP3-Runx-1-CBFβ je dále významný svou vazbou do CNS2 oblasti genu pro FoxP3, čímž zajišťuje jeho stabilní expresi a funkci nTreg (Kitoh *et al.*, 2009; Rudra *et al.*, 2009).

Výsledkem diferenciaci v thymu jsou buňky, které můžeme považovat za naivní nTreg. Vyznačují se fenotypem CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>FoxP3<sup>low</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>HLA-DR<sup>-</sup>CD95<sup>-</sup>CTLA-4<sup>-</sup> a již mají supresivní vlastnosti (Miyara *et al.*, 2009; Sakaguchi *et al.*, 2010). Tyto buňky migrují do periferie a do lymfatických orgánů, kde přetrvávají v klidovém stavu. Pokud dojde k aktivaci jejich TCR např. za situace, kdy v těle při zánětu dochází k odhalení tělu vlastních antigenů, naivní nTreg rychle proliferují a konvertují na efektorové nTreg (Miyara *et al.*, 2009). Během konverze dochází ke zvýšení exprese FoxP3 a získání efektorového fenotypu CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>FoxP3<sup>hi</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup>CD95<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> (Miyara *et al.*, 2009; Sakaguchi *et al.*, 2010). Ani tento fenotyp ovšem není definitivní. Bylo pozorováno, že efektorové nTreg jsou vysoce fenotypově plastické. Pod vlivem různých zánětlivých stimulů může dojít k jejich další polarizaci prostřednictvím koexprese TF typických pro efektorové T-lymfocyty jako např. T-bet, GATA-3, RORγt, IRF-4 a STAT-3 (Koch *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2009; Chaudhry *et al.*, 2009; Duhon *et al.*, 2012). Koexprese efektorových TF dává vzniknout nTreg, které se expresí chemokinových receptorů podobají efektorovým T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2 a T<sub>H</sub>17 lymfocytům (Duhon *et al.*, 2012). Tímto způsobem je zřejmě zajištěno, aby se nTreg mohly dostat do stejných míst jako efektorové T-lymfocyty.

#### 2.2.2.1.1.1.5.2.iTreg

Předpokládá se, že iTreg jsou zodpovědné za udržování tolerance proti environmentálním antigenům. Představují nástroj, který imunitnímu systému umožňuje adaptaci na vnější prostředí tím, že brání vzniku sebepoškozujících alergických a zánětlivých reakcí (Curotto de Lafaille a Lafaille, 2009). Významná je především role iTreg v regulaci imunitní odpovědi na sliznicích a to zejména na střevní sliznici, kde se podílejí na udržování orální tolerance (Mucida *et al.*, 2005; Coombes *et al.*, 2007). Myší studie odhalily, že se ve střevní lamina propria nacházejí DC, které indukují diferenciaci iTreg z naivních T-lymfocytů (Coombes *et al.*, 2007;

Sun *et al.*, 2007). V současné době je rovněž diskutována role iTreg v udržování tolerance vůči komenzálním bakteriím ve střevě (Lathrop *et al.*, 2011; Cebula *et al.*, 2013). Pro placentální savce jsou iTreg vysoce významné v době těhotenství, kdy je třeba udržovat toleranci vůči paternálním antigenům. Geneticky modifikované myši postrádající CNS1 element ve *FoxP3* lokusu nemohou tvořit iTreg a dochází u nich k resorpci alogenního embrya, která je spojena s infiltrací aktivovaných T-lymfocytů v placentě (Samstein *et al.*, 2012).

K diferenciaci iTreg dochází za podmínek, které nejsou optimální pro vznik efektorových T-lymfocytů. Iniciačním signálem je aktivace TCR v důsledku rozpoznání komplexu MHC se silným agonistickým peptidem, který je na APC prezentován v suboptimálním množství (Kretschmer *et al.*, 2005; Gottschalk *et al.*, 2010; Daniel *et al.*, 2011). Stejně jako v případě nTreg dochází k aktivaci NF- $\kappa$ B a Nr4a (Ruan *et al.*, 2009; Sekiya *et al.*, 2011; Sekiya *et al.*, 2013). Signalizace vycházející z TCR dále aktivuje TF NFAT a AP-1, které se váží do regulační oblasti CNS1 genu pro FoxP3 a zřejmě se podílejí na indukci jeho exprese (Vaeth *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2010). Z hlediska nároků na kostimulační molekuly se předpokládá, že k diferenciaci iTreg dochází za podmínek suboptimální kostimulace (Kretschmer *et al.*, 2005). Bylo pozorováno, že silná kostimulace vycházející z CD28 inhibuje diferenciaci iTreg (Benson *et al.*, 2007; Semple *et al.*, 2011). Negativní vliv kostimulace prostřednictvím CD28 může být vysvětlen aktivací PI3K-Akt-mTOR dráhy, která inhibuje expresi FoxP3 (Battaglia *et al.*, 2005; Haxhinasto *et al.*, 2008). Inhibice je dána fosforylací TF z rodiny Foxo prostřednictvím Akt, které následně nemohou vstupovat do jádra, vázat se do promotoru a CNS oblastí *FoxP3* lokusu a podílet se na indukci jeho exprese (Merkenschlager a von, 2010). Diferenciace iTreg naopak vyžaduje signalizaci vycházející z koinhibiční molekuly CTLA-4 (Zheng *et al.*, 2006).

Intenzita signálů z TCR a kostimulačních molekul je dále modulována vnějšími faktory jako např. TGF- $\beta$  a kyselinou retinovou (Gabrysova *et al.*, 2011). Přítomnost TGF- $\beta$ , který je považován za hlavní cytokin řídící diferenciaci iTreg, vede k aktivaci Smad3 (Chen *et al.*, 2003). Fosforylovaný Smad3 následně vstupuje do jádra, kde se společně s NFAT váže do CNS1 elementu ve *FoxP3* lokusu (Tone *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2010). V pozdějších fázích pak Smad3 translokuje do promotoru *FoxP3* genu, kde se společně s NFAT, NF- $\kappa$ B a CREB podílí na tvorbě enhanceozomu (Ruan *et al.*, 2009). Diferenciace iTreg indukovaná TGF- $\beta$  je dále posilována IL-2 (Davidson *et al.*, 2007). Ten aktivuje transkripční faktor STAT-5 čímž inhibuje diferenciaci T<sub>H</sub>17 lymfocytů, jelikož STAT-5 kompetuje se STAT-3 o vazebná místa (Yang *et al.*, 2011). Navíc se STAT-5 váže do promotoru *FoxP3* genu a pomáhá ho aktivovat (Burchill *et al.*, 2007). Diferenciace iTreg je kromě cytokinů podporována kyselinou retinovou, která aktivuje jaderné receptory RAR (Coombes *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2007). Ty následně migrují do jádra, kde se váží jak do CNS1 elementu, tak do promotoru genu pro FoxP3 (Xu *et al.*, 2010).

### 2.2.2.1.1.1.5.3. Role Treg v nádorovém mikroprostředí

Většina antigenů exprimovaných nádory jsou ve své podstatě tělu vlastní antigeny, které jsou rozpoznávané Treg (Zou 2006; Oleinika *et al.*, 2013). Ty pak v rámci udržování periferní tolerance mohou potlačovat funkci efektorových T-lymfocytů rozpoznávající nádorové antigeny (Nishikawa a Sakaguchi, 2014). Negativní vliv Treg na průběh nádorového onemocnění byl pozorován např. u melanomů, karcinomu prsu, renálního karcinomu, nádorů plic, karcinomu pankreatu a hepatocelulárního karcinomu (Miracco *et al.*, 2007; Mougiakakos *et al.*, 2010; Bates *et al.*, 2006; Gobert *et al.*, 2009; Lal *et al.*, 2013; Griffiths *et al.*, 2007; Jensen *et al.*, 2009; Shimizu *et al.*, 2010; Tao *et al.*, 2012; Hiraoka *et al.*, 2006; Fu *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2007).

Lze předpokládat, že k ustanovení populace Treg v nádorovém mikroprostředí dochází ve dvou fázích. V první fázi dochází k aktivaci naivních nTreg, které svým autoreaktivním TCR rozpoznávají nádorové antigeny prezentované DC v lokálních lymfatických uzlinách (Nishikawa *et al.*, 2005). Aktivované nTreg pod vlivem zánětlivých stimulů řídicích protinádorovou imunitní reakci exprimují odpovídající chemokinové receptory (Duhon *et al.*, 2012). Nádorové buňky a komponenty nádorového mikroprostředí produkují chemokiny, jako např. CCL-5, CCL-17, CCL-22, CCL-28, CXCL-10 a -12, které následně nTreg přitahují (Tan *et al.*, 2009; Ishida *et al.*, 2006; Mizukami *et al.*, 2008; Gobert *et al.*, 2009; Qin *et al.*, 2009; Facciabene *et al.*, 2011; Redjimi *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2007; Jaafar *et al.*, 2009). Aktivované nTreg pod vlivem TCR signalizace v nádorech expandují (Miyara *et al.*, 2009). Expanze je dále podporována TGF- $\beta$ , který je sekretován nádorovými buňkami, nezralými DC, MDSC a TAM (Pardali a Moustakas, 2007; Ghiringhelli *et al.*, 2005; Serafini *et al.*, 2008; Biswas *et al.*, 2006). Důležitou roli v regulaci imunitní odpovědi hrají rovněž exozomy produkované nádorovými buňkami. Tyto mohou obsahovat mRNA, miRNA a různé proteiny, jako např. nádorové antigeny, MHC I, FasL, IL-10, TGF- $\beta$ . Při kontaktu exozomů s Treg dochází k jejich aktivaci a expanzi (Wieckowski *et al.*, 2009; Szajnik *et al.*, 2010). Na druhou stranu bylo pozorováno, že přítomnost exozomů inhibuje CD8<sup>+</sup> CTL (Wieckowski *et al.*, 2009). V nádorovém prostředí dochází rovněž k ovlivnění maturace DC. Mohou tak vznikat plně maturované tolerogenní DC, které se vyznačují expresí indolamin-2,3-dioxygenázy (IDO). Tyto tolerogenní DC blokují expanzi efektorových T-lymfocytů a naopak podporují aktivaci a expanzi Treg (Chung *et al.*, 2009). Bylo rovněž pozorováno, že IDO<sup>+</sup> DC a Treg vytváří pozitivní regulační zpětnovazebnou smyčku, která dále posiluje expanzi Treg. Na povrchu Treg je konstitutivně exprimována molekula CTLA-4. Po interakci mezi CTLA-4 a CD80/CD86 na povrchu DC, dostává DC signály vedoucí k indukci exprese IDO (Fallarino *et al.*, 2003). V neposlední řadě se na expanzi Treg podílí IL-2 (Zorn *et al.*, 2006; Sim *et al.*, 2014). Jelikož Treg IL-2 neprodukují, dá se předpokládat, že pro svou expanzi využívají IL-2 sekretovaný efektorovými T-lymfocyty v nádorovém mikroprostředí (Quezada *et al.*, 2011).

V druhé fázi dochází k *de novo* diferenciaci iTreg z naivních T-lymfocytů. V tomto případě je využíváno mechanismů popsaných v kapitole 2.2.2.1.1.5.2. Důležitou roli hraje TGF- $\beta$  sekretovaný nádorovými buňkami, který následně indukuje v naivních CD4<sup>+</sup> T-lymfocytech diferenciaci na iTreg (Liu *et al.*, 2007; Valzasina *et al.*, 2006; Yamagiwa *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2003). Nádorové mikroprostředí rovněž ovlivňuje maturaci a funkci DC. Mohou tak vznikat DC s různým stupněm maturace, sníženou expresí kostimulačních molekul a MHC, které v důsledku suboptimální kostimulace a antigenní prezentace indukují diferenciaci iTreg (Gabrilovich, 2004; Ma *et al.*, 2012; Mahnke *et al.*, 2003; Kretschmer *et al.*, 2005). Na druhou stranu mohou tyto DC exprimovat koinhibiční molekuly jako např. PD-1L, které společně s TGF- $\beta$  opět podporují indukci iTreg (Wang *et al.*, 2008). Při maturaci v nádorovém stromatu získávají DC tolerogenní fenotyp, který se vyznačuje expresí protizánětlivých cytokinů (Ma *et al.*, 2012). Tolerogenně působí například DC exprimujícíIDO. Na indukci iTreg se v tomto případě podílí nedostatek tryptofanu a zvýšená hladina tryptofanových katabolitů produkovanýchIDO (Fallarino *et al.*, 2006). V nádorovém mikroprostředí se můžeme setkat s heterogenní populací MDSC, která je rovněž schopna indukovat diferenciaci iTreg z naivních T-lymfocytů (Hoechst *et al.*, 2008). Ve výsledku tak dochází ke vzniku populace iTreg, která spolupracuje s expandovanou populací nTreg na inhibici protinádorové imunity (Zhou a Levitsky, 2007).

Populace Treg v nádorech využívá k inhibici vrozené a adaptivní imunitní odpovědi několik mechanismů. Prvním z nich je sekrece protizánětlivých cytokinů TGF- $\beta$  a IL-10. Nejvýznamnějším cytokinem nádorového prostředí je TGF- $\beta$ , který je schopný modulovat aktivaci, diferenciaci a maturaci buněk vrozené i adaptivní imunity (Flavell *et al.*, 2010). Treg produkují TGF- $\beta$  v latentní formě detekovatelné na jejich povrchu po aktivaci TCR (Ghiringhelli *et al.*, 2005; Andersson *et al.*, 2008). Je využíván k inhibici NK buněk, které pod jeho vlivem snižují svou cytotoxicitu, expresi aktivačního receptoru NKG2D a sekreci IFN- $\gamma$  (Ghiringhelli *et al.*, 2005; Laouar *et al.*, 2005). Snížením sekrece IFN- $\gamma$  Treg blokují primární signály poskytované naivním T-lymfocytům pro diferenciaci na protinádorový T<sub>H</sub>1 fenotyp (Laouar *et al.*, 2005). Prostřednictvím TGF- $\beta$  naopak v naivních T-lymfocytech iniciují diferenciaci v iTreg, čímž dále přispívají k rozšíření supresivní populace Treg v nádorovém mikroprostředí (Andersson *et al.*, 2008). Treg využívají TGF- $\beta$  rovněž k inhibici protinádorových CD8<sup>+</sup> CTL, které snižují svou cytotoxickou aktivitu a expresi NKG2D (Chen *et al.*, 2005; Crane *et al.*, 2010). TGF- $\beta$  dále inhibuje diferenciaci centrálních paměťových CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů a navíc podporuje delecí protinádorových CTL indukci apoptózy (Takai *et al.*, 2013; Tinoco *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2012). Treg prostřednictvím TGF- $\beta$  mohou ovlivňovat také APC buňky, kdy dochází k inhibici maturace DC a jejich schopnosti migrovat a prezentovat nádorové antigeny v lokální lymfatické uzlině (Tanaka *et al.*, 2010; Flavell *et al.*, 2010). Alternativně může v důsledku působení TGF- $\beta$  dojít

k indukci tolerogenních DC, které naopak podporují diferenciaci a expanzi Treg (Flavell *et al.*, 2010). TGF- $\beta$  dále ovlivňuje TAM, kdy podporuje jejich polarizaci na pro-nádorový M2 fenotyp (Gong *et al.*, 2012). Dalším cytokinem, který Treg používají k modulaci funkce APC je IL-10 blokující jejich aktivaci (Ito *et al.*, 2008; Mittal a Roche, 2015). Stejně jako TGF- $\beta$  i IL-10 ovlivňuje diferenciaci makrofágů, kdy podporuje jejich polarizaci směrem k získání M2 fenotypu (Sica *et al.*, 2006). Kromě toho může přítomnost IL-10 vést k diferenciaci alternativních regulačních Tr1 lymfocytů z naivních CD4<sup>+</sup> T-lymfocytů (Roncarolo *et al.*, 2006). V myších modelech byla identifikována role dalšího protizánětlivého cytokinu IL-35. Jeho exprese nebyla zatím v lidských CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Treg pozorována a je předmětem studia (Bardel *et al.*, 2008). Aktivované Treg kromě cytokinů sekretují nebo na svém povrchu vystavují galektin-1, který se váže na glykoproteiny jako např. CD45, CD43, CD7, což vede k inhibici proliferace, produkce cytokinů a indukci apoptózy aktivovaných efektorových T-lymfocytů (Garin *et al.*, 2007). Dalším solubilním faktorem produkovaným Treg je PGE<sub>2</sub>, který je produkován COX-2<sup>+</sup> iTreg a je schopný inhibovat NK buňky, T<sub>H</sub>1 lymfocyty, CD8<sup>+</sup> CTL a naopak podporovat diferenciaci iTreg (Mahic *et al.*, 2006; Yaqub *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2010; Kalinski 2012).

Další mechanismus, který Treg používají k inhibici imunitního systému, spočívá v modulaci hladiny ATP a produkci supresivně působícího adenosinu. Při poškození tkáně nebo v případě rychlého nádorového růstu dochází k nekontrolované buněčné smrti, při níž se do prostředí uvolňuje velké množství ATP, které slouží jako signál nebezpečí schopný aktivovat imunitní systém (Trautmann 2009). Treg v nádorovém mikroprostředí snižují množství přítomného ATP díky expresi ektonukleotidázy CD39, která štěpí ATP na ADP a následně na AMP (Mandapathil *et al.*, 2009; Dwyer *et al.*, 2010; Robson *et al.*, 1997). Vzniklé AMP pak může být další ektonukleotidázou CD73 konvertováno na adenosin. Zatímco u myších Treg byla pozorována koexprese CD39 a CD73, u lidských Treg je tato situace nejasná (Deaglio *et al.*, 2007). Populace lidských Treg obsahuje pouze malé množství buněk koexprimujících CD39 a CD73 na svém povrchu (Mandapathil *et al.*, 2010; Schuler *et al.*, 2014). Je tedy možné, že ektonukleotidáza CD73 je skladována intracelulárně a po aktivaci dochází k jejímu rychlému transportu na povrch Treg, odkud se rychle uvolňuje (Mandapathil *et al.*, 2010; Schuler *et al.*, 2014). Alternativně bylo pozorováno, že je možné izolovat dvě populace Treg CD39<sup>+</sup>CD73<sup>-</sup> a CD39<sup>-</sup>CD73<sup>+</sup>, které by spolu na produkci adenosinu mohly spolupracovat. Zdrojem CD73 mohou být rovněž exozomy produkované nádorovými buňkami či buňkami nádorového mikroprostředí (Schuler *et al.*, 2014). Produkovaný adenosin pak působí na infiltrující buňky imunitního systému (Antonioli *et al.*, 2013). Je schopný inhibovat aktivaci M1 makrofágů, kdy inhibuje produkci prozánětlivých cytokinů, jako např. TNF- $\alpha$  (Kumar a Sharma, 2009). Naopak podporuje diferenciaci M2 makrofágů, v nichž posiluje expresi IL-10 a VEGF (Kumar a Sharma, 2009; Antonioli *et al.*, 2013). Adenosin dále

ovlivňuje diferenciaci DC z monocytů, kdy bylo pozorováno, že za přítomnosti adenosinu vznikají buňky, které zřejmě představují diferenciační mezistupeň, jelikož exprimují znak DC CD209, ale mají velmi nízkou nebo žádnou expresi CD1a. Na druhou stranu tyto buňky stále exprimují znak monocytů CD14 (Novitskiy *et al.*, 2008). Kromě diferenciaci je také ovlivněna maturace a funkce DC. Bylo pozorováno, že přítomnost adenosinu snižuje prezentaci nádorových antigenů, expresi MHC II, kostimulační molekuly CD86, IFN- $\gamma$  a chemokinu CXCL-10, které jsou důležité pro aktivaci a migraci protinádorových efektorových T-lymfocytů (Wilson *et al.*, 2009; Antonioli *et al.*, 2013). Naopak podporuje vznik tolerogenních DC vyznačujících se expresí COX-2, IDO, VEGF, TGF- $\beta$  a IL-10 (Kumar a Sharma, 2009). Složkou vrozené imunity důležitou pro protinádorovou obranu, jsou NK buňky. Přítomnost vysoké hladiny adenosinu v nádorovém mikroprostředí inhibuje schopnost NK buněk adherovat k nádorovým buňkám a exocytovat cytotoxické granule, čímž dochází k inhibici perforinem a granzymem zprostředkované apoptózy. Inhibovaná je rovněž schopnost NK buněk lyzovat nádorové buňky prostřednictvím FasL (Antonioli *et al.*, 2013). Pod vlivem adenosinu dochází dále k supresi produkce INF- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$  a GM-CSF (Lokshin *et al.*, 2006). V neposlední řadě se adenosin podílí na inhibici adaptivní imunity. Bylo pozorováno, že Treg prostřednictvím adenosinu suprimují protinádorové efektorové T-lymfocyty (Mandapathil *et al.*, 2009). Děje se tak na základě ovlivnění efektorových funkcí T-lymfocytů, kdy přítomnost adenosinu inhibuje produkci IL-2, IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$ . V případě CD8<sup>+</sup> CTL adenosin inhibuje expresi FasL, granzymu a perforinu. Zároveň je blokována také exocytóza cytotoxických granulí a schopnost CTL adherovat k nádorovým buňkám (Hoskin *et al.*, 2008).

Pro inhibici protinádorové imunitní odpovědi využívají Treg také mechanismus mezibuněčného kontaktu. Treg na svém povrchu konstitutivně exprimují koinhibiční molekulu CTLA-4, která s vysokou afinitou váže CD80 a CD86 na DC. Vazba CTLA-4 na cílové receptory vede k indukci signalizace aktivující STAT-3 a snižující NF- $\kappa$ B, což má za následek inhibici maturace DC. Konkrétně dochází ke snížení produkce IL-12 a snížení transkripce genů CD80 a CD86 (Kowalczyk *et al.*, 2014). Takové DC buňky pak nejsou schopny efektivně stimulovat proliferaci efektorových CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů (Oderup *et al.*, 2006). Ke snížení exprese CD80 a CD86 může přispívat také CTLA-4 zprostředkovaná trans-endocytóza těchto molekul. Treg v tomto případě odebírají z povrchu DC CD80 a CD86, které směřují do endocytické dráhy k následné degradaci v lysozomech (Qureshi *et al.*, 2011). Signalizace indukovaná CTLA-4 navíc vede v DC k indukci exprese IDO a získání tolerogenního fenotypu (Munn *et al.*, 2004; Fallarino *et al.*, 2006). Treg v nádorovém mikroprostředí mohou inhibovat funkci DC dále prostřednictvím LAG-3 (Camisaschi *et al.*, 2010; Liang *et al.*, 2008). Jedná se o transmembránový protein příbuzný CD4, který s vysokou afinitou váže MHC II. třídý. Prostřednictvím vazby MHC II molekulou LAG-3 dochází v DC k sestavení signální platformy, jejíž součástí je fosfatáza SHP-1, a ze které vychází signály inhibující expresi

kostimulačních molekul a maturaci DC (Liang *et al.*, 2008). Dalším kontaktním mechanismem, který Treg využívají pro inhibici protinádorové imunitní odpovědi, je tvorba tzv. vodivých mezibuněčných spojů. Bylo pozorováno, že Treg vytvářejí vodivé spoje s efektorovými T-lymfocyty, B-lymfocyty a DC (Bopp *et al.*, 2007; Vaeth *et al.*, 2011; Ring *et al.*, 2010). Prostřednictvím těchto spojů dochází k transportu cAMP z Treg do cílových buněk. V případě efektorových T-lymfocytů dochází v důsledku zvýšení hladiny cAMP k aktivaci TF ICER, který následně vstupuje do jádra, kde se váže do promotoru genů pro IL-2 a NFAT a tak inhibuje jejich transkripci (Vaeth *et al.*, 2011). Podobně i u DC buněk dochází k transportu cAMP z Treg, což je spojeno se sníženou expresí kostimulačních molekul a získáním tolerogenního fenotypu (Fassbender *et al.*, 2010; Ring *et al.*, 2010).

V procesu udržování tolerance proti tělu vlastním a nádorovým antigenům mohou Treg využívat také mechanismus založený na cytolýze. Exprimují na svém povrchu FasL (CD178), který je schopný vázat Fas (CD95) na efektorových CD8<sup>+</sup> T-lymfocytech, monocitech a jiných buňkách imunitního systému, což v nich následně spouští apoptózu (Strauss *et al.*, 2009; Venet *et al.*, 2006; Daniel *et al.*, 2013). Treg mohou rovněž produkovat perforin, granzym A a granzym B, jejichž prostřednictvím mohou indukovat apoptózu v efektorových T-lymfocytech, monocitech a DC prezentujících nádorové autoantigeny (Grossman *et al.*, 2004; Lehe *et al.*, 2008; Efimova a Kelley, 2009; Perrella *et al.*, 2014).

Minoritním a stále diskutovaným mechanismem inhibice efektorových T-lymfocytů by mohla být deplece IL-2 z prostředí, která je zprostředkována expresí vysokoafinitního IL-2R na Treg (Pandiyan *et al.*, 2007).

#### **2.2.2.1.1.2. CD8<sup>+</sup> lymfocyty**

CD8<sup>+</sup> CTL představují významnou součást adaptivního imunitního systému podílející se na obraně těla proti intracelulárním parazitům a nádorově transformovaným buňkám. Prostřednictvím svého TCR rozpoznávají antigenní peptidy v komplexu s MHC glykoproteiny I. třídy prezentované na povrchu transformovaných či infikovaných buněk. V současné době byla identifikována celá řada antigenů exprimovaných nádorovými buňkami. Tyto zahrnují unikátní neoantigeny specifické pro nádory vzniklé mutací v genech pro běžné proteiny nebo v důsledku chromozomové nestability. Příkladem mohou být PML-RAR $\alpha$  a mutovaný Flt3 vyskytující se u akutní promyelocitické leukemie resp. AML, případně mutovaný K-ras v adenokarcinomech (Osman *et al.*, 1999; Graf *et al.*, 2007; Gjertsen *et al.*, 1997). Druhou velkou skupinu představují antigeny asociované s nádory, které jsou ve zvýšené míře exprimovány nádory, ale také v normálních tkáních. Z hlediska imunoterapie se v tomto případě jako atraktivní jeví tzv. nádorové testikulární antigeny, např. MAGE-A1, NY-ESO-1, k jejichž expresi dochází kromě nádorů pouze v germinálních buňkách, které ovšem neexprimují MHC I a MHC II (Hofmann *et al.*, 2008; Restifo *et al.*, 2012).

Po rozpoznání antigenního peptidu aktivují CD8<sup>+</sup> CTL své efektorové mechanismy zahrnující především sekreci cytotoxických granulí. Dochází tak k uvolnění perforinu a granzymu, pomocí nichž je v nádorových buňkách indukována apoptóza (Barry a Bleackley, 2002; Weigelin *et al.*, 2011). Alternativně může k indukci apoptózy dojít prostřednictvím buněčného kontaktu pomocí FasL, který váže svůj receptor na povrchu nádorové buňky (Weigelin *et al.*, 2011; Barry a Bleackley, 2002). CD8<sup>+</sup> CTL jsou rovněž producenty TNF- $\alpha$  a INF- $\gamma$ , které mohou indukovat apoptózu, resp. zvyšovat expresi MHC I jak na nádorových buňkách tak infiltrujících APC (Restifo *et al.*, 2012). CD8<sup>+</sup> CTL se tedy významně podílejí na protinádorové imunitní odpovědi a řada studií ukázala pozitivní vliv jejich přítomnosti v nádorovém mikroprostředí na přežívání pacientů s karcinomem prsu, jícnu, ovarií, ledvin, s kolorektálním karcinomem a karcinomem merkelových buněk (Mahmoud *et al.*, 2011; Cho *et al.*, 2003; Hamanishi *et al.*, 2007; Nakano *et al.*, 2001; Mlecnik *et al.*, 2011; Paulson *et al.*, 2011). I přes přítomnost antigeně specifických CD8<sup>+</sup> CTL dochází ovšem k růstu nádorů a progresi onemocnění. Bylo pozorováno, že CD8<sup>+</sup> CTL v nádorovém mikroprostředí jsou nefunkční nebo funkčně značně omezené (Ahmadzadeh *et al.*, 2009; Fourcade *et al.*, 2010; Crespo *et al.*, 2013).

Z hlediska funkce CD8 T-lymfocytů může být v případě nádorů problematická již samotná aktivace, kdy může dojít k indukci anergie (Crespo *et al.*, 2013). K aktivaci naivních CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů dochází v lymfatických uzlinách, kde se setkávají s APC prezentujícími antigenní peptidy na MHC I a podávají kostimulační signály (Hickman *et al.*, 2008). Signalizace vycházející z kostimulačních molekul CD28, OX40, 4-1BB, CD27 a GITR indukuje v naivních CD8<sup>+</sup> T-lymfocytech prostřednictvím NF- $\kappa$ B dráhy expresi perforinu, granzymu a efektorových cytokinů jako IL-2 a IFN- $\gamma$  (Acuto a Michel, 2003; Zhou *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2006; Wortzman *et al.*, 2013). Zároveň posiluje TCR zprostředkovanou aktivaci Ras-MAPK a PI3K-Akt-mTOR dráhy, které spouští metabolické reprogramování, při němž je zvýšena glykolýza a syntéza lipidů, a naopak je utlumena fosforylační oxidace a oxidace lipidů (Jones a Thompson, 2007; Chappert a Schwartz, 2010; Zhang a Bevan, 2011). Souběžně dochází ke zvýšení exprese důležitých přenašečů pro glukózu, aminokyseliny a transferin (Jones a Thompson, 2007; Chappert a Schwartz, 2010). Signální dráha PI3K-Akt-mTOR kromě metabolického reprogramování reguluje také expresi genů indukujících anergii, kdy buď inhibuje jejich expresi nebo podporuje degradaci kódovaných proteinů (Dure a Macian, 2009; Lin *et al.*, 2009). Všechny tyto změny umožňují aktivovanému CD8<sup>+</sup> CTL vstoupit do fáze klonální expanze, charakteristické masivním buněčným dělením, při kterém vzniká populace paměťových a efektorových T-lymfocytů schopných eliminovat antigen (Kaech a Cui, 2012).

V případě nádorů mohou být nádorové antigeny prezentovány na nezralých DC, které mají sníženou expresi kostimulačních molekul. V takovém případě získává naivní CD8<sup>+</sup> T-lymfocyt

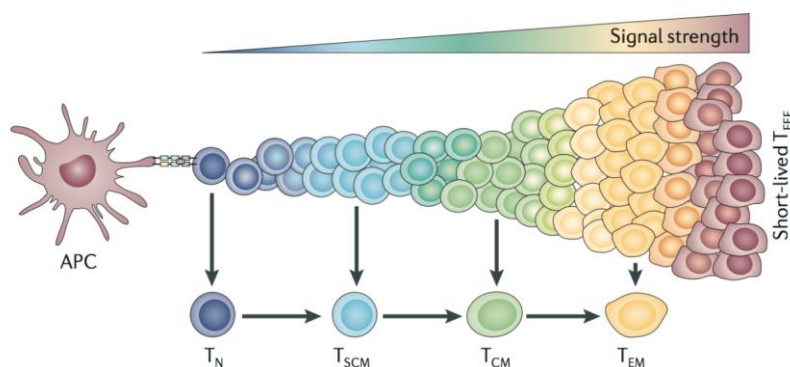
signály pouze z TCR, které aktivují signální dráhu NFAT, ale již nedochází k aktivaci Ras-MAPK a PI3K-Akt-mTOR dráhy. Je tak spuštěn anergizační program, při kterém jsou odpojeny signální dráhy vycházejících z TCR (Soto-Nieves *et al.*, 2009; Wells 2009). Anergický T-lymfocyt tak není schopný reagovat na přítomnost antigenu a to ani v případě následné optimální prezentace. Stav anergie se dále vyznačuje neschopností T-lymfocytů produkovat cytokiny a prolifеровat, v důsledku zastavení buněčného cyklu v kontrolním bodě G1/S(Choi a Schwartz, 2007; Chappert a Schwartz, 2010). Anergické T-lymfocyty jsou rovněž metabolicky inertní a nemají schopnost zvýšit expresi transportérů pro aminokyseliny a glukózu (Zheng *et al.*, 2009; Chappert a Schwartz, 2010). Anergie je aktivně udržovaný stav, na jehož regulaci se významně podílí signální dráha NFAT, která indukuje expresi TF Erg2 a Erg3. Společně pak NFAT, Erg2 a Erg3 řídí expresi E3 ubiquitinligáz Cbl-b, Itch, GRAIL a Deltex-1, které inhibují signalizaci vycházející z TCR a kostimulačních receptorů (Soto-Nieves *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2012; Safford *et al.*, 2005; Chappert a Schwartz, 2010). Významnou roli hraje ubiquitinligáza GRAIL, která řídí degradaci komplexu TCR-CD3 (Heissmeyer *et al.*, 2004; Nurieva *et al.*, 2010). Ostatní ubiquitinligázy se podílejí především na regulaci komponent signálních drah. Ligáza Cbl-b je schopna ubiquitinovat regulační podjednotku p85 PI3K a tak bránit její translokaci k CD28 (Fang a Liu, 2001). Ubiquitinligáza Itch je schopna řídit degradaci PLC- $\gamma$  a PKC- $\theta$  v anergických buňkách (Heissmeyer *et al.*, 2004). Deltex-1 se na udržování anergie podílí svou schopností degradovat MAP3K (Liu a Lai, 2005). Kromě ubiquitinligáz indukuje Erg2 expresi kinázy DGK $\alpha$ , která fosforyluje diacylglycerol na kyselinu fosfatidovou a tak snižuje aktivitu RasGRP-1, čímž inhibuje Ras-MAPK dráhu (Zheng *et al.*, 2012; Zha *et al.*, 2006; Wells 2009). Na udržování stavu anergie se podílí také TF Ikaros, který do promotoru genu pro IL-2 navádí histondeacetylázy, čímž inhibuje jeho expresi (Thomas *et al.*, 2007).

Nádorové antigeny mohou být prezentovány také na tolerogenních DC, které jsou charakteristické expresí IDO, Arg1, iNOS (Cobbold *et al.*, 2009). Prostřednictvím těchto enzymů dochází v prostředí k vyčerpání esenciálních aminokyselin. Nedostatek aminokyselin následně vnímají naivní CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty prostřednictvím GCN2 kinázy, která rozpoznává nenabitě tRNA a spouští stresovou odpověď, při níž GCN2 fosforyluje eIF2 $\alpha$ , což vede k snížení translace mRNA (Munn *et al.*, 2005; Grallert a Boye, 2013). Navíc dochází k zastavení buněčného cyklu na vstupu do S fáze. Chybění esenciálních aminokyselin vede rovněž k inhibici mTOR dráhy, což má za následek indukci anergie (Cobbold *et al.*, 2009; Powell *et al.*, 1999).

Na indukci anergie v CD8<sup>+</sup> T-lymfocytech se mohou podílet rovněž Treg a to produkcí adenosinu prostřednictvím CD39 a CD73(Mandapathil *et al.*, 2009; Schuler *et al.*, 2014). Během aktivace dochází v T-lymfocytech k indukci exprese adenosinového receptoru A<sub>2A</sub>,

jehož aktivace, i v případě správné kostimulace, vede k inhibici Ras-MAPK signální dráhy a indukci anergie (Zarek *et al.*, 2008).

Pokud dojde k plné aktivaci, vstupují  $CD8^+$  CTL do fáze klonální expanze. V této fázi dochází k vytvoření populace terminálně diferencovaných efektorových T-lymfocytů ( $T_{EFF}$ ) a heterogenní populace paměťových buněk, která zahrnuje paměťové kmenové buňky ( $T_{SCM}$ ), centrální paměťové buňky ( $T_{CM}$ ), efektorové paměťové buňky ( $T_{EM}$ ) (Kaech a Cui, 2012; Chang *et al.*, 2014). Přesná posloupnost dějů vedoucí ke vzniku paměťových T-lymfocytů a  $T_{EFF}$  je stále předmětem bádání. Pro jednoduchost budu dále vycházet z recentního modelu předpokládajícího postupnou diferenciaci, kdy nejprve z naivních T-lymfocytů vznikají  $T_{SMC}$ , které asymetrickým dělením dávají vznik  $T_{CM}$  z nichž dalším dělením vznikají  $T_{EM}$  a z nich nakonec  $T_{EFF}$  (Obr. 4) (Gattinoni *et al.*, 2011; Gattinoni *et al.*, 2012). Diferenciace  $CD8^+$  CTL na paměťové buňky je řízena především TF EOMES, ale podílejí se na ní rovněž TF Bcl6, ID3 a FOXO-1. Naopak pro vznik  $T_{EFF}$  je důležitý především TF T-bet, Blimp-1 a ID-2 (Obr. 5) (Kaech a Cui, 2012; Chang *et al.*, 2014). Exprese EOMES, Bcl-6, ID3 je nejvyšší u  $T_{SCM}$  a následně klesá při diferenciaci k  $T_{EFF}$ . Naopak exprese T-bet, Blimp-1 a ID-2 se směrem k  $T_{EFF}$  zvyšuje (Gattinoni *et al.*, 2011). Ačkoliv je funkce EOMES a T-bet při diferenciaci paměťových T-lymfocytů a  $T_{EFF}$  do jisté míry antagonistická, je kooperace obou těchto TF vyžadována v raných fázích diferenciaci pro indukci exprese granzymu B, perforinu a chemikonových receptorů CXCR-3 a CXCR-4 důležitých pro migraci (Kaech a Cui, 2012).



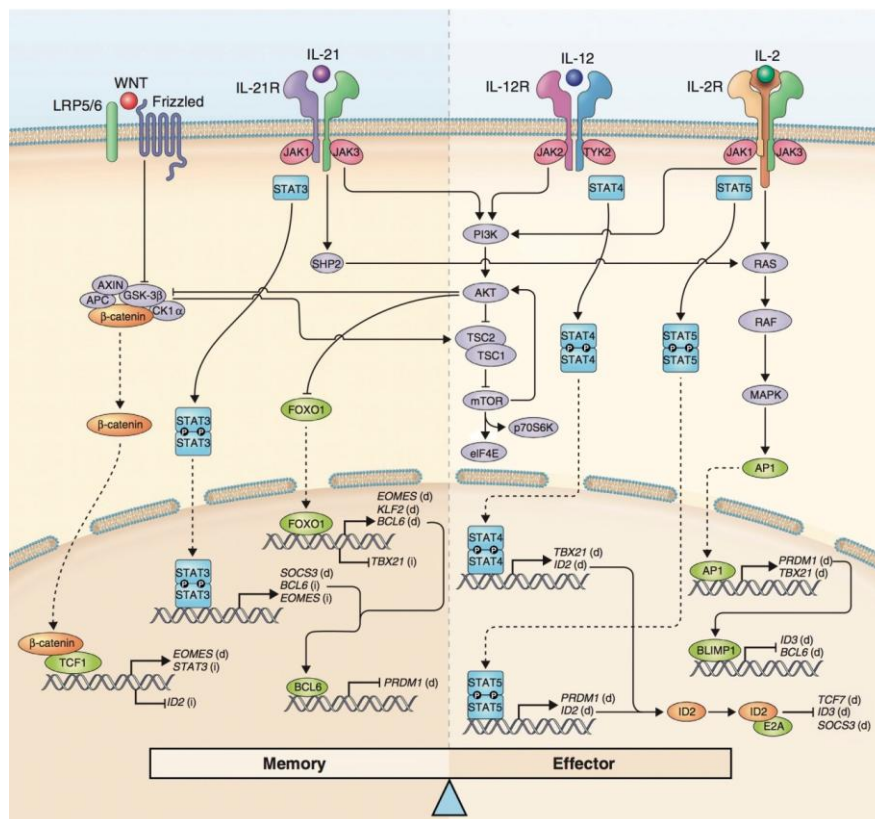
**Obr. 4: Diferenciace  $CD8^+$  CTL na  $T_{EFF}$  (Gattinoni *et al.*, 2012)**

Naivní  $CD8^+$  T-lymfocyt rozpoznává antigenní peptidy na APC, od které získává kostimulační signály a zahajuje diferenciaci na  $T_{TSCM}$ . Pokud antigenní a zánětlivé stimuly přetrvávají, dochází k další proliferaci a diferenciaci na  $T_{CM}$ , následně  $T_{EM}$ , až na konci vzniká populace terminálně diferencovaných  $T_{EFF}$ .

V diferenciaci paměťových T-lymfocytů hraje důležitou roli EOMES, jehož delece zcela inhibuje schopnost  $CD8^+$  CTL vytvářet paměťové buňky (Banerjee *et al.*, 2010; Paley *et al.*, 2013). Na zajištění exprese EOMES se podílí TF FOXO-1, který zároveň

podporuje expresi Bcl6, a dále aktivní WNT signalizace, při níž může docházet k translokaci  $\beta$ -catenin do jádra (Obr. 5) (Rao *et al.*, 2012; Oestreich *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2010). V jádře vytváří  $\beta$ -catenin komplex s TCF-1 podporující expresi EOMES, STAT-3 a inhibuje expresi TF ID2 řídícího diferenciaci na T<sub>EFF</sub> (Zhou *et al.*, 2010; Hao *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2012). Zvýšená exprese STAT-3 následně umožňuje buňce integrovat signály z receptorů pro IL-6 a IL-21 (Gattinoni *et al.*, 2012). Vazba těchto cytokinů na receptory vede k fosforylaci STAT-3, který následně může stabilizovat expresi EOMES a zvýšit expresi Bcl6 (Cui *et al.*, 2011). Bcl6 následně podporuje diferenciaci paměťových lymfocytů díky inhibici exprese Blimp-1, jehož funkcí je řízení terminální diferenciace T<sub>EFF</sub> (Ichii *et al.*, 2004; Tunyaplin *et al.*, 2004; Rutishauser *et al.*, 2009). Aktivovaný STAT-3 dále zahajuje expresi SOCS3, který inhibuje signály vycházející z IL-12R vedoucí k indukci T<sub>EFF</sub> (Cui *et al.*, 2011). Důležitou roli při vývoji paměťových T-lymfocytů hraje také TF ID3, jehož funkcí je mimo jiné inhibice exprese Blimp-1 (Yang *et al.*, 2011).

V průběhu klonální expanze musí postupně dojít k přepnutí na diferenciaci směrem k T<sub>EFF</sub>. Jednou ze signálních drah zodpovědných za spuštění diferenciace T<sub>EFF</sub> je evolučně konzervovaná dráha Hippo. K expresi jejích komponent v CD8<sup>+</sup> CTL dochází v důsledku antigenní stimulace a signálů z IL-2R (Thaventhiran *et al.*, 2012). Důležitou komponentou signální dráhy Hippo je transkripční kofaktor YAP, který podporuje expresi EOMES a naopak



Obr. 5: Signální dráhy modulující vznik paměťových a efektorových CD8<sup>+</sup> CTL (Thaventhiran *et al.*, 2013) Signály zprostředkované vazbou WNT a IL-21 na odpovídající receptory vedou k expresi EOMES, Bcl6, STAT-3 a

SOCS3, které podporují diferenciaci paměťových buněk. Zároveň dochází k inhibici TF T-bet, Blimp-1 a ID2 řídících diferenciaci  $T_{EFF}$ . Naopak zánětlivé cytokiny IL-12 a IL-2 prostřednictvím aktivace STAT-4, STAT-5, PI3K-Akt-mTOR a Ras-MAPK dráhy podporují expresi T-bet, Blimp-1 a ID2, což je spojeno s terminální diferenciací  $CD8^+$  CTL na  $T_{EFF}$ . Paralelně dochází k inhibici TF podporující vznik paměťových T-lymfocytů FOXO-1, Bcl6 a ID3.

inhibuje expresi Blimp-1 (Thaventhiran *et al.*, 2012). Během klonální expanze vytvářejí aktivované CTL v lymfatických uzlinách agregáty, což vede k aktivaci Hippo dráhy vedoucí k degradaci YAP a indukci exprese Blimp-1 (Thaventhiran *et al.*, 2012). TF Blimp-1 inhibuje transkripci genů podílejících se na tvorbě paměťových T-lymfocytů, čímž se podílí na terminální diferenciaci  $T_{EFF}$  (Rutishauser *et al.*, 2009). Exprese Blimp-1 zároveň podporuje funkci  $T_{EFF}$ , jako je migrace do míst zánětu, zvyšuje expresi IFN- $\gamma$  a granzymu B (Kallies *et al.*, 2009; Kaech a Cui, 2012). Bylo pozorováno, že  $CD8^+$  CTL postrádající Blimp-1 nejsou schopny eliminovat virovou infekci v důsledku špatné migrace do místa infekce a omezené cytotoxické funkce (Kallies *et al.*, 2009). Mezi další signály podporující vznik  $T_{EFF}$  patří především prozánětlivý cytokin IL-12, který aktivuje TF STAT-4 a ten následně řídí expresi TF T-bet, jenž je pro tvorbu  $T_{EFF}$  nepostradatelný (Obr. 5) (Joshi *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007). T-bet dokáže např. vázat Bcl6, čímž blokuje jeho schopnost inhibovat expresi Blimp-1 (Oestreich *et al.*, 2012). V komplexu s Bcl6 funguje T-bet navíc jako represor schopný inhibovat expresi genů jako TCF-1 a SOCS3 (Oestreich *et al.*, 2011). Kromě toho STAT-4 indukuje expresi ID2, který podporuje diferenciaci a přežívání  $T_{EFF}$ , kdy zajišťuje expresi T-bet, anti-apoptotických proteinů Bcl2, Spi-6 a naopak snižuje expresi apoptotického proteinu Bim (Yang *et al.*, 2011; Masson *et al.*, 2013; Cannarile *et al.*, 2006). TF ID2 navíc inhibuje expresi genů pro TCF-1, SOCS3 a ID3 (Masson *et al.*, 2013). Důležitým diferenciačním faktorem pro  $T_{EFF}$  je rovněž IL-2, který aktivuje STAT-5 a tak indukuje expresi Blimp-1 a ID-2 (Pipkin *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2011). Naopak STAT-5 inhibuje expresi Bcl6 (Pipkin *et al.*, 2010; Oestreich *et al.*, 2012). Společně IL-12 a IL-2 aktivují také PI3K-Akt-mTOR dráhu, která prostřednictvím Akt fosforyluje TF FOXO-1, což vede k jeho vazbě na cytoplazmatický protein 14-3-3 (Rao *et al.*, 2010; Thaventhiran *et al.*, 2013). V důsledku nepřítomnosti FOXO-1 v jádře dochází k inhibici exprese EOMES a Bcl6 a naopak zvýšení exprese T-bet (Rao *et al.*, 2010; Rao *et al.*, 2012; Oestreich *et al.*, 2012).

Vzniklé  $T_{EFF}$  následně na základě chemokinových signálů migrují do místa zánětu a výskytu antigenu. K migraci mohou přispívat aktivované  $T_H1$  lymfocyty, které produkcí IFN- $\gamma$  indukují v epiteliálních buňkách sekreci CXCL-9 a CXCL-10 (Nakanishi *et al.*, 2009).  $T_{EFF}$  tak mohou vstupovat do nádorů, kde ničí nádorové buňky. V důsledku působení různých faktorů se ovšem nedaří eliminovat všechny nádorové buňky a imunitní reakce zprostředkovaná  $CD8^+$  CTL vstupuje do chronické fáze, která se podobá chronickým virovým infekcím. Během dlouhodobé antigenní stimulace dochází postupně k funkčnímu vyčerpání  $CD8^+$  CTL (Schieteringer a

Greenberg, 2014). Funkční vyčerpání je proces, při kterém  $T_{EFF}$  postupně ztrácí své efektorové funkce (Wherry 2011). Jako první přicházejí o schopnost proliferovat v důsledku antigenní stimulace, sekretovat IL-2 a zabíjet *ex vivo* cílové buňky. Následně přichází  $T_{EFF}$  o schopnost sekretovat TNF- $\alpha$ . Nakonec, při maximálním vyčerpání, nejsou schopny sekretovat IFN- $\gamma$  a degranulovat (Wherry 2011). Paralelně se ztrátou funkce dochází u  $T_{EFF}$  infiltrujících nádory ke zvýšení exprese inhibičních receptorů PD-1, LAG-3, 2B4, TIM-3 a CTLA-4 (Schietinger a Greenberg, 2014). Přičemž platí, že čím je stupeň vyčerpanosti vyšší, tím více inhibičních receptorů je koexprimováno (Blackburn *et al.*, 2009). Přítomnost funkčně vyčerpaných  $CD8^+$  CTL byla pozorována např. u pacientů s melanomem, ovariálním a hepatocelulárním karcinomem (Baitsch *et al.*, 2011; Matsuzaki *et al.*, 2010; Gehring *et al.*, 2009).

Proces funkčního vyčerpání je řízen různými TF (Wherry 2011). Důležitou roli hrají TF Blimp-1 a T-bet, které spolu kooperují na diferenciaci  $T_{EFF}$  a získání plné efektorové funkce, jako je produkce IFN- $\gamma$ , perforinu a granzymu B (Kaech a Cui, 2012). Z hlediska funkčního vyčerpání mají ovšem T-bet a Blimp-1 funkce protichůdné. T-bet brání funkčnímu vyčerpání a podporuje dlouhotrvající imunitní odpověď, díky své schopnosti inhibovat expresi PD-1 a zřejmě také dalších inhibičních molekul jako LAG-3, CD160 a BTLA (Kao *et al.*, 2011). V průběhu chronické stimulace se ovšem exprese T-bet snižuje (Kao *et al.*, 2011; Paley *et al.*, 2012). Paralelně se ztrátou T-bet ovšem dochází ke zvýšení exprese TF EOMES, který je důležitý pro diferenciaci paměťových T-lymfocytů (Paley *et al.*, 2012; Kaech a Cui, 2012). Ke vzniku paměťových T-lymfocytů z terminálně diferencovaných  $T_{EFF}$  ovšem nemůže dojít mimo jiné v důsledku vysoké exprese Blimp-1 (Kaech a Cui, 2012). Vyčerpané  $CD8^+$  CTL se tak mohou vyznačovat přechodným fenotypem připomínajícím jak paměťové, tak  $T_{EFF}$  (Buggert *et al.*, 2014). V případě TF Blimp-1 dochází v důsledku stimulace k dalšímu zvýšení exprese, což vede jednak k inhibici exprese IL-2 a dále také k expresi inhibičních receptorů jako PD-1, LAG-3 a 2B4 (Gong a Malek, 2007; Shin *et al.*, 2009). Inhibiční receptory pak aktivací neredundantních signálních drah kooperují na inhibici efektorové funkce  $CD8^+$  CTL. V případě PD-1 dochází po vazbě ligandů PD-L1 a PD-L2, které jsou exprimovány na APC v nádorech a na samotných nádorových buňkách, k fosforylaci ITIM motivu na cytoplazmatické části molekuly (Crespo *et al.*, 2013). K ITIM se následně váží fosfatázy SHP-1 a SHP-2, které jsou schopny defosforylovat komponenty komplexu TCR (Keir *et al.*, 2008). Navíc PD-1 zvyšuje aktivitu fosfatázy PTEN a tak blokuje aktivaci signální dráhy PI3K-Akt. Ve výsledku tak dochází ke snížení produkce IL-2, proliferaci a ovlivnění přežívání  $CD8^+$  CTL (Pedoeem *et al.*, 2014).

### **2.2.2.2. Makrofágy asociované s nádory**

Makrofágy představují skupinu mononukleárních fagocytujících buněk, která se podílí na procesech embryonálního a postembryonálního vývoje tkání, regenerace a hematopoéze

(Wynn *et al.*, 2013). Hrají důležitou roli v regulaci metabolismu. Jsou rovněž nepostradatelnou součástí imunitního systému, podílejí se na obraně proti bakteriím, virům a protozoálním parazitům (Wynn *et al.*, 2013; Murray a Wynn, 2011). Pro klasifikaci makrofágů používáme model funkční polarizace rozlišující klasicky aktivované M1 a alternativně aktivované M2 makrofágy (Murray a Wynn, 2011). K aktivaci M1 makrofágů dochází pod vlivem INF I. třídy, IFN- $\gamma$  a signálů z TLR, jako např. z TLR4 rozpoznávajícího LPS (Tugal *et al.*, 2013). Signalizace vycházející z TLR vede k aktivaci na MyD88 závislé signální dráhy, která aktivuje NF- $\kappa$ B a expresi prozánětlivých cytokinů. Alternativně může být přes TRIF a IRF-3 iniciována exprese IFN- $\beta$  (Tugal *et al.*, 2013). V důsledku signálů z TLR dochází k aktivaci IRF5, který translokuje do jádra a tak je dále posílena exprese IL-6, IL-12 a TNF- $\alpha$  (Takaoka *et al.*, 2005).

Vazba IFN I na odpovídající receptory vede k fosforylaci STAT-1 a STAT-2 a jejich následné heterodimerizaci. Vzniklý heterodimer STAT-1-STAT-2 následně prostřednictvím vazby proteinu IRF-9 navádí transkripční aktivátorový komplex ISGF-3 do regulačních sekvencí genů, jejichž exprese je aktivována v důsledku IFN signalizace (Tugal *et al.*, 2013). Obdobně vazba IFN- $\gamma$  na receptor způsobuje aktivaci a homodimerizaci STAT-1, který se váže do promotorových oblastí genů jako např. IL-12 a iNOS (Tugal *et al.*, 2013). STAT-1 vazbou do promotoru indukuje expresi IRF-5, který následně indukcí transkripce IL-12, IL-23 a inhibicí transkripce IL-10 podporuje M1 polarizaci (Krausgruber *et al.*, 2011).

Důležitou roli v polarizaci makrofágů směrem k získání M1 fenotypu hraje také MAPK signální dráha. Na základě zánětlivých signálů je aktivována kináza JNK, která fosforyluje c-Jun, což je spojeno s následnou heterodimerizací s c-Fos za vzniku TF AP-1. AP-1 spolupracuje s NF- $\kappa$ B na expresi prozánětlivých genů (Tugal *et al.*, 2013). Získané signály tak v makrofázích vedou k indukci exprese zánětlivých cytokinů IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-23 a TNF- $\alpha$ . Aktivované M1 makrofágy zahajují také produkci reaktivních kyslíkových radikálů a díky expresi iNOS produkují NO (Mantovani *et al.*, 2005; Tugal *et al.*, 2013). Dochází rovněž ke zvýšení exprese MHC I. a II. třídy a kostimulačních molekul, čímž se z M1 makrofágů stávají profesionální antigen prezentující buňky, schopné aktivovat adaptivní T-buněčnou odpověď (Hoebe *et al.*, 2003; Verreck *et al.*, 2004; Chanmee *et al.*, 2014).

K aktivaci M2 makrofágů dochází pod vlivem cytokinů IL-4, IL-10, IL-13 a TGF- $\beta$  (Baay *et al.*, 2011). Cytokiny IL-4 a IL-13 vedou k aktivaci TF STAT-6. Ten následně indukuje expresi histon demethylázy Jmjd3, která snižuje inaktivační tri- a di-metylace H3K27 v oblasti genu pro IRF4, čímž zvyšuje jeho expresi (Ishii *et al.*, 2009; Satoh *et al.*, 2010). Následně IRF4 společně se STAT-6 aktivuje promotory genů podílejících se na M2 fenotypu, jako např. Arg-1 a manózoový receptor Mrc-1 (Tugal *et al.*, 2013). STAT-6 dále zvyšuje expresi jaderných receptorů a TF PPAR- $\gamma$  a PPAR- $\delta$ , které inhibují funkci TF STAT-1, NF- $\kappa$ B a AP-1, důležitých pro M1 polarizaci (Szanto *et al.*, 2010; Odegaard *et al.*, 2008; Ricote *et al.*, 1998). Předpokládá

se, že za inhibicí stojí stabilizace korepresorového komplexu v promotorech cílových genů, který blokuje jejich transaktivaci (Tugal *et al.*, 2013). PPAR- $\gamma$  a PPAR- $\delta$  naopak společně se STAT-6 podporují expresi genů důležitých pro M2 polarizaci, jako např. Arg-1 (Szanto *et al.*, 2010; Odegaard *et al.*, 2008). IL-4 prostřednictvím STAT-6 indukuje rovněž expresi TF KLF-2 a KLF-4, které rovněž hrají důležitou roli v procesu polarizace směrem k M2 fenotypu. Fungují jednak jako inhibitory transkripce prozánětlivých cytokinů a efektorových molekul. Bylo pozorováno, že KLF-2 a KLF-4 v tomto případě blokuje sestavení koaktivátorového komplexu, kdy brání navázání PCAF/p300 na NF- $\kappa$ B (Liao *et al.*, 2011; Mahabeleshwar *et al.*, 2011). Naopak podporují expresi genů Arg-1, Mrc-1, PPAR- $\gamma$ . Na základě obdržených diferenciačních signálů, tak vznikají makrofágy, které se vyznačují vysokou sekrecí IL-10 a naopak velmi nízkou sekrecí IL-12 a IL-23. Exprimují rovněž velké množství scavengerových, manózových a galaktózových receptorů. M2 makrofágy dále vysokou měrou exprimují IL-1RA, IL-1RII (Mantovani *et al.*, 2005). Jsou schopny sekretovat celou řadu růstových faktorů, jako např. EGF, bFGF, VEGF, PDGF a IGF-1 (Galdiero *et al.*, 2013; Wynes a Riches, 2003).

Z hlediska imunitního systému jsou oba fenotypy makrofágů důležité. M1 makrofágy iniciují zánět a podílejí se na obraně proti intracelulárním patogenům, jako jsou některé bakterie a viry. Po odstranění patogenu dochází k postupnému přechodu na diferenciaci v M2 makrofágy, které následně utlumují zánět a podílejí se na regeneraci postižené tkáně odstraňováním poškozených buněk a sekrecí růstových faktorů (Allavena a Mantovani, 2012; Sica a Mantovani, 2012; Galdiero *et al.*, 2013). Jsou to právě vlastnosti M2 polarizovaných makrofágů, jenž jsou nádory zneužívány.

Makrofágy se v dospělém organismu vyskytují ve všech tkáních a jako takové představují zřejmě jednu z prvních leukocytárních populací, která infiltruje nádory (Wynn *et al.*, 2013; Clark *et al.*, 2007). Zdrojem TAM makrofágů jsou monocyty, které jsou do nádorů přitahovány a následně diferencují na TAM (Franklin *et al.*, 2014). Jako hlavní chemoatraktant pro monocyty slouží CCL-2, který je produkován nádorovými buňkami, popř. buňkami nádorového stromatu (Arenberg *et al.*, 2000; Qian *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2010). Bylo ovšem pozorováno, že migraci monocytů mohou řídit i další chemokiny, jako např. CCL-3, CCL-4, CCL-5 a CCL-22 (Chanmee *et al.*, 2014). Kromě CCL-2 mohou chemotakticky působit také růstové faktory jako VEGF a PDGF (Barleon *et al.*, 1996; Krettek *et al.*, 2001). V nádorovém mikroprostředí dochází k rozsáhlé přestavbě ECM a může docházet k produkci matrikinů. Na monocyty chemotakticky působí např. proteolytické fragmenty elastinu (Senior *et al.*, 1980; Senior *et al.*, 1984; Houghton *et al.*, 2006). Migraci monocytů a makrofágů do nádorového prostředí může podporovat rovněž hyaluronan (Kobayashi *et al.*, 2010). Monocyty v nádorovém mikroprostředí pod vlivem M-CSF diferencují na makrofágy (Stanley *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 2001; Allavena a Mantovani, 2012). V raných stádiích vývoje nádorů mají TAM

fenotyp podobný M1- makrofágům. Produkují prozánětlivé cytokiny IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 a produkují reaktivní kyslíkové radikály a NO. Vyznačují se také vysokou expresí MHC II (Wang *et al.*, 2011). Tyto M1 polarizované TAM jsou cytotoxické vůči nádorovým buňkám a předpokládá se, že jsou součástí protinádorové imunity (Dumont *et al.*, 2008). Navíc mohou podporovat indukci T<sub>H</sub>1 (Biswas a Mantovani, 2010). Pozitivní vliv M1 makrofágů byl pozorován např. u pacientů s kolorektálním karcinomem (Ohtani *et al.*, 1997; Forssell *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2010). Ačkoliv se tedy zdá, že M1 makrofágy jsou protinádorové, mohou produkcí oxidových radikálů a NO vytvářet mutagenní prostředí. Navíc může IL-6 podporovat proliferaci transformovaných buněk (Schmieder *et al.*, 2012).

V pozdějších fázích dochází k expanzi makrofágů s M2 fenotypem, které sekretují IL-10, TGF- $\beta$ , VEGF a mají nízkou expresi MHC II (Wang *et al.*, 2011). Výskyt M2 makrofágů v nádorech koreluje s horší prognózou u pacientů s Hodgkinovými lymfomy, melanomy, karcinomy močového měchýře, prsu, jícnu a hepatocelulárním karcinomem (Steidl *et al.*, 2010; Makitie *et al.*, 2001; Hanada *et al.*, 2000; Mahmoud *et al.*, 2012; Koide *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2008). M2 makrofágy následně podporují neoangiogenezi, růst nádorů, tvorbu metastáz a inhibují protinádorovou imunitní odpověď.

#### **2.2.2.2.1. Úloha TAM v angiogenezi, růstu a diseminaci nádorů**

TAM v nádorovém mikroprostředí pod vlivem VEGF, endothelinu 2, EMAPII a Semaforinu-3A preferenčně infiltrují do hypoxických oblastí, kde dochází k jejich akumulaci (Chanmee *et al.*, 2014). V hypoxických oblastech ztrácí TAM schopnost migrovat, což je dáno několika mechanismy. V případě Semaforinu-3A vychází pro-migrační signalizace z komplexu Nrp-1/PlexinA1/PlexinA4. V hypoxickém prostředí dochází ovšem ke snížení exprese Nrp-1 a samotný komplex PlexinA1/PlexinA4 podává buňce stop signál (Casazza *et al.*, 2013). V hypoxickém prostředí je dále inhibována migrace aktivovaná MAPK signální dráhou. Děje se tak v důsledku zvýšení exprese MAPK fosfatázy 1, která defosforyluje ERK-1 a ERK-2 (Grimshaw a Balkwill, 2001). V neposlední řadě hypoxie snižuje expresi chemokinových receptorů, jako např. CCR5 (Bosco *et al.*, 2004). TAM vnímají hypoxické prostředí a reagují na něj zvýšením exprese HIF-1 $\alpha$  (Werno *et al.*, 2010). Pod vlivem HIF-1 $\alpha$  exprimují TAM angiogenní VEGF, které zvyšuje počet cév a jejich rozvětvení (Cramer *et al.*, 2003; Laoui *et al.*, 2014). Bylo pozorováno, že TAM mohou sekretovat i celou řadu dalších faktorů podporujících nádorovou neoangiogenezi, mezi něž patří PDGF, FGF, IL-8, tymidinfosforyláza, uPA a adrenomedulin (Allavena *et al.*, 2008; Chanmee *et al.*, 2014). Dále sekretují WNT7b, který v endoteliálních buňkách indukuje expresi VEGF (Yeo *et al.*, 2014). TAM sekretují celou řadu MMP. Patří mezi ně také MMP-2 a MMP-9, které jsou schopné uvolňovat VEGF skladovaný v ECM (Lewis a Pollard, 2006; Belotti *et al.*, 2003).

Kromě angiogeneze mohou TAM podporovat sekrecí VEGF-C a VEGF-D také lymfangiogenezi (Schoppmann *et al.*, 2002).

Růstové faktory EGF, FGF, VEGF, PDGF a TGF- $\beta$  sekretované TAM mohou působit přímo na nádorové buňky a podporovat jejich růst (Allavena a Mantovani, 2012). Nádorové buňky na druhou stranu mohou aktivovat TAM. U buněk plicního karcinomu bylo pozorováno, že sekretují proteoglykan versican, který prostřednictvím TLR-2 a TLR-6 indukuje v TAM produkci TNF- $\alpha$  a IL-6 (Kim *et al.*, 2009). TNF- $\alpha$  následně může v buňkách indukovat expresi cytidinové deaminázy AID, což může vést k mutacím v p53 a c-myc (Komori *et al.*, 2008). V důsledku působení TNF- $\alpha$  dochází rovněž k aktivaci IKK $\beta$ , která následně dokáže fosforylovat protein TSC-1 a tak aktivovat mTOR dráhu podporující růst a vývoj nádorů (Lee *et al.*, 2007). Kromě toho aktivuje IKK TF NF- $\kappa$ B, který podporuje translokaci telomerázové podjednotky TERT do jádra a tak přispívá k immortalizaci buněk (Akiyama *et al.*, 2003). TNF- $\alpha$  v nádorových buňkách aktivuje také další signální dráhy podporující přežívání, jako např. PI3K-Akt a MAPK dráhu (Waters *et al.*, 2013). IL-6 pak aktivací STAT-3 podporuje přežívání nádorových buněk zvýšením exprese anti-apoptotických proteinů Bcl-XL, MCL-1 a survivinu (Lesina *et al.*, 2011).

TAM zřejmě také úzce interagují s CSC, které jsou zodpovědné za růst a diseminaci nádorů. Bylo pozorováno, že CSC v gliomech exprimují více CCL-2, CCL-5 a VEGF než ostatní gliomové buňky, což jim umožňuje přitahovat TAM (Yi *et al.*, 2011). Ty následně sekrecí EGF a IL-6 aktivují STAT-3 signální dráhu vedoucí ke zvýšení exprese TF Sox-2, který je vyžadován pro udržení kmenového fenotypu (Yang *et al.*, 2013). Bylo pozorováno, že při depleci TAM dochází v nádorech k poklesu v množství CSC (Mitchem *et al.*, 2013). TAM dále sekretují růstový faktor MFG-E8, který aktivuje Sonic Hedgehog a STAT-3 dráhu, čímž zvyšuje rezistenci CSC vůči chemoterapii (Jinushi *et al.*, 2011). Interakce mezi CSC a TAM je důležitá také z hlediska invaze do okolní tkáně. TAM produkují celou řadu faktorů, které vedou k expresi TF Snail, Zeb, Twist řídicích proces EMT. Sekretovaný TNF- $\alpha$  aktivací NF- $\kappa$ B indukuje expresi TF Zeb, což je spojeno se snížením exprese E-cadherinu (Maier *et al.*, 2010). Navíc dochází v důsledku TNF- $\alpha$  signalizace ke stabilizaci TF Snail (Wu *et al.*, 2009). TAM produkují dále IL-6 a EGF, které prostřednictvím STAT-3 mohou aktivovat expresi TF Twist (Wendt *et al.*, 2014). Pro pronikání do okolní tkáně je nutné rozvolnit ECM. TAM jsou významným zdrojem MMP, katepsinů a uPA (Lewis a Pollard, 2006; Chanmee *et al.*, 2014). Deplece TAM či jimi produkovaných proteáz vede ke snížené tvorbě metastáz, invazivitě a růstu nádorů (Almholt *et al.*, 2005; Condeelis a Pollard, 2006; Gocheva *et al.*, 2010). Ve výsledku TAM rozvolňují ECM a ruku v ruce s nádorovými buňkami invadují do okolní tkáně. Společný pohyb je zprostředkován parakrinní signalizací, při které nádorové buňky sekretují M-CSF indukující migraci TAM a ty zase produkují EGF aktivující migraci nádorových buněk (Wyckoff *et al.*, 2004). Jakmile je dosaženo cév, tak TAM asociují

s jejich povrchem a vytvářejí shluky, do kterých migrují nádorové buňky. Shluky TAM pak umožňují nádorovým buňkám vstup do krevního řečiště (Wyckoff *et al.*, 2007). Nádorové buňky v krevním řečišti produkují tkáňový faktor (CD142), který podporuje tvorbu mikrotrombů, v nichž krevní destičky chrání nádorové buňky před mechanickým poškozením a imunitním systémem. Pokud dojde k zachycení těchto trombů např. v plicích, dochází k přitahování makrofágů, které následně podporují přežívání nádorových buněk a tvorbu metastáz (Gil-Bernabe *et al.*, 2012).

#### **2.2.2.2.2. Imunosupresivní účinek TAM**

TAM jsou velmi špatné APC. Vyznačují se nízkou expresí MHC II. třídy a mají tudíž sníženou schopnost prezentovat antigeny CD4<sup>+</sup> T-lymfocytům (Wang *et al.*, 2011). Mohou exprimovat HLA-E a HLA-G, které jsou rozpoznávány inhibičními receptory NKG2 resp. KIR2DL4 a ILT-2 na NK-buňkách a CD8<sup>+</sup> T-lymfocytech (Kren *et al.*, 2010; Borrego *et al.*, 1998; Morandi *et al.*, 2007). U HLA-G bylo navíc pozorováno, že v případě neuroblastomů TAM sekretují jeho solubilní formu sHLA-G (Morandi *et al.*, 2007). Nádorové mikroprostředí může ovlivňovat expresi kostimulačních molekul na TAM. Bylo pozorováno, že IL-4 a IL-10, které podporují M2 polarizaci, snižují expresi CD80 a CD86 (Ambarus *et al.*, 2012). Hypoxie a cytokiny IL-10, TNF- $\alpha$  a IL-6 v TAM indukují expresi inhibičních molekul PD-1L, B7-H3 a B7-H4, což je spojeno se supresí protinádorových CD8<sup>+</sup> CTL (Noman *et al.*, 2014; Kuang *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2013; Kryczek *et al.*, 2006). Navíc TAM sekretují TGF- $\beta$  a IL-10, které inhibují aktivaci T-lymfocytů nebo v nich indukují diferenciaci na Treg či Tr1 (Wang *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2003; Roncarolo *et al.*, 2006). Sekretovaný IL-10 může působit autokrinně na TAM, v nichž inhibuje expresi IL-12 (Sica *et al.*, 2000). Pod vlivem signálů z nádorového stromatu je v TAM indukována expreseIDO a Arg-1, které v mikroprostředí vyčerpávají esenciální aminokyseliny tryptofan a arginin, což je spojeno s indukcí anergie v T-lymfocytech v důsledku inhibice mTOR dráhy (Zhao *et al.*, 2012; Chang *et al.*, 2001; Cobbold *et al.*, 2009; Powell *et al.*, 1999). Nedostatek argininu navíc vede ke snížení exprese CD3  $\xi$  řetězce, což negativně ovlivňuje signalizaci vycházející z TCR (Rodriguez *et al.*, 2003).

TAM produkují celou řadu chemokinů, prostřednictvím kterých mohou ovlivňovat složení leukocytů infiltrujících nádory. Produkci CCL-2 mohou podporovat infiltraci dalších monocytů, které mohou přispívat k rozšiřování populace TAM (Biswas *et al.*, 2006). CCL-2 funguje rovněž jako chemoatraktant pro imunosupresivní MDSC (Huang *et al.*, 2007). Navíc bylo pozorováno, že podporuje indukci T<sub>H</sub>2 lymfocytů, které mohou podporovat růst nádorů (Gu *et al.*, 2000). TAM dále prostřednictvím sekrece chemokinů CCL-20 a CCL-22 podporují infiltraci Treg (Liu *et al.*, 2011; Curiel *et al.*, 2004). TAM jsou také významným zdrojem CCL-18, který funguje jako atraktant pro naivní T-lymfocyty (Gunther *et al.*, 2011;

Baay *et al.*, 2011). Ty se v nádorovém mikroprostředí setkávají s nezralými či tolerogenními DC, TAM a MDSC, které v nich mohou indukovat anergii nebo diferenciaci na Treg (Baay *et al.*, 2011). Bylo rovněž pozorováno, že CCL-18 může konvertovat paměťové T-lymfocyty na Treg, jejichž přítomnost následně v makrofázích indukuje alternativní fenotyp a zvyšuje expresi CCL-18, čímž je uzavřena pozitivní zpětnovazebná smyčka (Chang *et al.*, 2010; Tiemessen *et al.*, 2007).

### **2.2.2.2.3. Terapie cílené proti TAM**

Díky svým schopnostem inhibovat protinádorovou imunitu, podporovat růst nádorů a jejich diseminaci, představují TAM atraktivní cíle pro modulaci vlastností nádorového stromatu. V současné době bylo testováno několik přístupů, jak TAM odstranit nebo repolarizovat na protinádorový fenotyp.

Jedním z možných přístupů je imunizace proti asparaginylové endopeptidáze legumain (EC 3.4.22.34), jejíž zvýšená exprese byla pozorována u celé řady nádorů, jako např. karcinomu prsu, tlustého střeva, žaludku, plic, prostaty a ovarií (Liu *et al.*, 2003; Gawenda *et al.*, 2007; Murthy *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2013; Ohno *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2012). Bylo pozorováno, že zvýšená exprese legumainu koreluje s invazivitou nádorů a jejich schopností metastazovat (Liu *et al.*, 2003). V rámci nádorového mikroprostředí mohou legumain kromě nádorových buněk exprimovat také stromální buňky a to především TAM (Liu *et al.*, 2003; Hashimoto *et al.*, 1999; Luo *et al.*, 2006; Haugen *et al.*, 2015). Z hlediska buněčné lokalizace se legumain nachází především v endozomálním a lysozomálním kompartmentu (Chen *et al.*, 1998). Na invazivní straně buněk se ovšem můžeme setkat s jeho sekrecí do extracelulárního prostředí, kde se prostřednictvím svého RGD motivu váže na integriny, což stabilizuje jeho strukturu a to především aktivní místo a umožňuje mu fungovat i za vyššího pH (Liu *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2012; Dall a Brandstetter, 2013). Předpokládá se, že legumain podporuje invazivitu nádorů dvěma způsoby. Podílí se na aktivaci enzymů degradující ECM, jako např. MMP-2 a katepsiny (Chen *et al.*, 2001; Shirahama-Noda *et al.*, 2003). Dále bylo pozorováno, že sám o sobě je schopný degradovat jednu z hlavních složek ECM fibronektin (Morita *et al.*, 2007).

Kromě imunizačního postupu prezentovaného v této práci, byly navrženy DNA vakcíny kódující buď fúzní protein legumainu a ubiquitinu nebo predikované epitopy kódující 8-10 aminokyselin dlouhé peptidy vázající se na MHC I. třídy (Luo *et al.*, 2006; Lewen *et al.*, 2008). V obou případech se podařilo indukovat CD8<sup>+</sup> CTL schopné lyzovat a snížit množství legumain<sup>+</sup> TAM (Luo *et al.*, 2006; Lewen *et al.*, 2008). Imunizace vedla k redukci angiogeneze a inhibovala růst nádorů a jejich schopnost metastazovat (Luo *et al.*, 2006).

Pro depleci TAM byly dále navrženy farmakologické postupy, jejichž příkladem může být podávání bisfosfonátů jako jsou kyselina zoledronová nebo lipozomů obsahujících klodronát.

Deplece TAM byla v těchto případech spojena s inhibicí růstu nádorů a angiogeneze (Zhang *et al.*, 2010; Gazzaniga *et al.*, 2007).

Další možná strategie zahrnuje blokování akumulace TAM v nádorovém mikroprostředí. Jako vhodné se v tomto případě jeví použití protilátky proti CCL-2, která snížila množství TAM a navíc způsobila jejich re-polarizaci (Fridlender *et al.*, 2011). Alternativně se dá pro snížení akumulace TAM v nádorech použít inhibitory kinázové aktivity receptoru pro M-CSF, jako např. PLX6134 (Ryder *et al.*, 2013). Bylo rovněž pozorováno, že subcytotoxické dávky chemoterapeutika trabectedinu mohou vést ke snížení množství TAM v důsledku inhibice sekrece CCL-2, CXCL-8 a VEGF v nádorových buňkách (Germano *et al.*, 2010).

V neposlední řadě se jako výhodná ukazuje strategie re-polarizace makrofágů z pronádorového M2 fenotypu na protinádorový M1 fenotyp. Repolarizace lze dosáhnout např. podáním inhibitoru protonových pump pantoprazolu, který v buňkách T-buněčného lymfomu snižuje expresi IL-4, IL-10 a TGF- $\beta$  podporujících M2 polarizaci a naopak zvyšuje expresi IL-6 a IFN- $\gamma$  a tak podporuje M1 polarizaci (Vishvakarma a Singh, 2010). Další možností je podání IL-12 nebo glykoproteinu bohatého na histidin (Watkins *et al.*, 2007; Rolny *et al.*, 2011).

### 3. Cíle práce

Cíle předložené práce lze shrnout do následujících bodů:

1. Zkonstruovat rVACV nesoucí ve svém genomu tumor supresorový gen IGFBP-3, pod kontrolou časného H5 či syntetického časně-pozdního E/L promotoru, a imunogen SigE7LAMP.
2. Charakterizovat připravené rVACV z hlediska exprese IGFBP-3, schopnosti indukovat protinádorovou imunitní odpověď a potlačit růst nádorů.
3. Pokusit se objasnit jaký mechanismus je zodpovědný za inhibici růstu nádorů.
4. Zavést postupy detekce M2 polarizovaných TAM exprimujících legumain.
5. Pomocí těchto metod charakterizovat nádorový model cervikálního karcinomu založený na buňkách MK16/ABC z hlediska obsahu TAM.
6. Připravit DNA vakcínu proti legumainu, v níž byla pro zvýšení imunogennosti modifikována jeho sekvence.
7. Stanovit, zda navržené genové modifikace a popřípadě jejich kombinace, zvyšují imunogennost a jsou schopné inhibovat růst nádorů.
8. Ověřit, zda imunita indukovaná připravenou DNA vakcínou ovlivňuje množství TAM v nádorech a je schopna omezit tvorbu plicních metastáz.

## 4. Materiály a metody

### 4.1. Restrikční enzymy a DNA ligáza

Všechny použité restrikční enzymy a použitá T4 DNA ligáza byly dodány firmou New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, USA).

### 4.2. Standardy molekulových hmotností

MassRuler High Range DNA Ladder, Ready-to-Use, 1500-10,000 bp a

MassRuler Low Range DNA Ladder, Ready-to-Use, 80-1031 bp (Thermo Fisher Scientific, Pittsburg, Pennsylvania, USA).

Prestained Protein Marker, Broad Range (7-175 kDa) (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA).

PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific).

### 4.3. Syntetické oligonukleotidy

Oligonukleotidy (Generi biotech s.r.o., Hradec Králové, Česká republika):

IGFBP/left pro detekci rekombinantních VACV exprimujících IGFBP-3.

TK-R pro sekvenaci IGFBP-3 vloženého do genu pro tymidin kinázu.

TK-L pro sekvenaci IGFBP-3 vloženého do genu pro tymidin kinázu.

Vv\_nem\_B<sup>+</sup> primer pro qPCR.

VV\_nem\_B<sup>-</sup> primer pro qPCR.

VV\_nem\_Bps#P Taq-Manovská sonda pro qPCR.

Oligonukleotidy (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, USA):

5'-GTGAATTCGCCGCCATGACCTGGAGAGTGGCTGT-3' použit pro amplifikaci genu pro legumain pomocí RT-PCR.

5'-GCGAATTCAGTAGTACTAAGACACAC-3' pro amplifikaci genu pro legumain pomocí RT-PCR.

5'-GCGTCACCTCCCAGCACGGCG-3' pro přípravu LgmnCCG cílenou mutagenezí.

5'-AGCTTCTGCGCCACCTCTCAG-3' pro přípravu LgmnRGG cílenou mutagenezí.

### 4.4. Peptidy

VACV E3<sub>140-148</sub> (VGPSNSPTF) (Clonestar Biotech, Brno, Česká republika).

HPV16 E7<sub>49-57</sub> (RAHYNIVTF) (Clonestar Biotech).

Lgmn<sub>108-120</sub> (EDVTPENFLAVLR) (GeneScript, Piscataway, New Jersey, USA)

TT<sub>947-967</sub> (FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE) (Clonestar Biotech).

## 4.5. Chemikálie

Akrylamid, Amonium persulfát, Azid sodný, N,N,N',N'- Tetramethylethyldiamin (TEMED), N,N'-Metylenbis-akrylamid (bisAA) (Serva, Heidelberg, SRN).

Agaróza pro separaci DNA, SeaKem® LE Agarose a SeaKem® GTG™ Agarose (Lonza, Basel, Švýcarsko). Zbylé chemikálie byly zakoupeny u firem Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA) nebo Lachema (Brno, ČR).

## 4.6. Protilátky

Oslí protilátka proti králičímu IgG značená DyLight 649 (Biolegend, San Diego, Kalifornie, USA).

Fab fragment rozpoznávající myší IgG značený AlexaFluor 488 (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA)

Kryší protilátka proti myšícímu CD11b značená FITC (Exbio, Vestec, ČR).

Kryší protilátka proti myšícímu F4/80 značená APC-eFluor 780 (eBioscience, San Diego, Kalifornie, USA).

Kryší protilátka proti myšícímu F4/80 značená PE-Cy5 (eBioscience).

Kozí monoklonální protilátka proti králičímu imunoglobulinu značená Alexa Fluor 546 (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornie, USA).

Myší monoklonální protilátka proti MHC II (mI-Ab) značená PE (BD Pharmingen, San Diego, Kalifornie, USA)

Králičí polyklonální protilátka proti myšícímu legumainu (Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, Texas, USA).

Kontrolní králičí imunoglobulin (Cell Signaling Technology Inc., Danvers, Massachusetts, USA)

Kozí polyklonální protilátka proti IGFBP-3 AF675 (R&D System, Minneapolis, Minnesota, USA)

Myší monoklonální protilátka proti IFN- $\gamma$  klon 1-D1K (Mabtech AB, Nacka Strand, Švédsko)

Myší monoklonální protilátka proti IFN- $\gamma$  klon 7-B6 konjugovaná s biotinem (Mabtech AB, Nacka Strand, Švédsko)

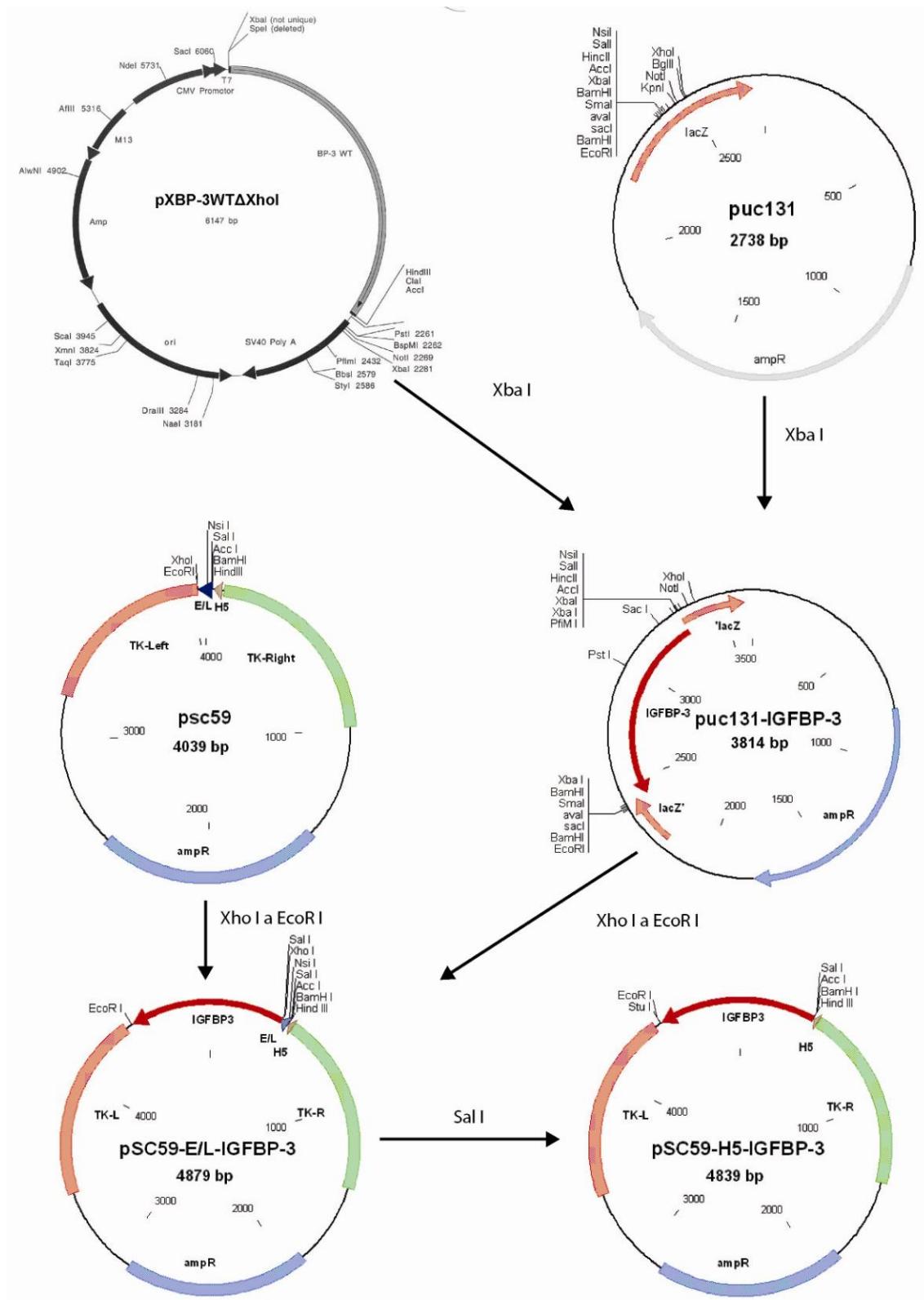
## 4.7. Pokusná zvířata

Samice myšího kmene C57BL/6 staré 6 – 8 týdnů (Charles River Laboratories, Sulzfeld, SRN). Myši určené pro pokusy s rekombinantními viry vakcinie byly umístěny na Státním zdravotním ústavu v Praze. Myši určené pro pokusy spojené s přípravou DNA vakcíny proti legumainu byly umístěny v Centru pro experimentální biomodely 1. Lékařské fakulty UK

v Praze. Všechna laboratorní zvířata byla udržována za standardních podmínek v souladu s platnou legislativou na ochranu zvířat proti týrání.

## 4.8. Plazmidy

Sekvenci pro lidský gen IGFBP-3 jsme obdrželi v plazmidu pXBP3-WT od Dr. W. Zwerschkeho (Universita Innsbruck) (Santer *et al.*, 2006). Pro další použití bylo ze sekvence plazmidu pXBP3-WT odstraněno restriční místo rozpoznávané enzymem Xho I. Pro delecí bylo použito restriční štěpení pomocí enzymů Xho I a Sal I s následnou ligací T4 DNA ligázou. Takto upravený plazmid byl nazván pXBP-3WT $\Delta$ XhoI. Z plazmidu pXBP-3WT $\Delta$ XhoI byla následně vyštěpena sekvence pro IGFBP-3 pomocí enzymu Xba I a vložena do plazmidu pUC131 štěpeného stejným restričním enzymem. Správná orientace vloženého genu pro IGFBP-3 byla ověřena štěpením restriktázami Pst I a EcoR I. Vzniklý plazmid byl pojmenován pUC131-IGFBP-3. Z tohoto plazmidu byl gen pro IGFBP-3 vyštěpen pomocí kombinace enzymů Xho I a EcoRI. Vyštěpený gen byl následně vložen do stejně štěpeného rekombinačního plazmidu pSC59-H5 (Nemeckova *et al.*, 2002). Takto vzniklý plazmid byl pojmenován pSC59-E/L-IGFBP-3. Pro vytvoření rekombinačního plazmidu, ve kterém je sekvence IGFBP-3 řízena časným H5 promotorem, byl z plazmidu pSC59-E/L-IGFBP-3 vyštěpen časně pozdní promotor (E/L) pomocí restričního enzymu Sal I.



**Obr. 6: Klonovací strategie pro přípravu rekombinačních plazmidů s IGFBP-3**

Sekvence pro gen IGFBP-3 byla vyštěpena z plazmidu pXBP-3WTΔXhoI pomocí XbaI a vložena do pUC131. Ze vzniklého pUC131-IGFBP-3 byl gen IGFBP-3 opět vyštěpen pomocí XhoI a vložen do stejné štěpeného pSC59. Vznikl tak pSC59-E/L-IGFBP-3, z něhož vyštěpení E/L promotoru pomocí SalI vznikl rekombinační plazmid pSC59-H5-IGFBP-3.

Plazmidy pro imunizaci proti legumainu byly připraveny Dr. Šmahelem. Sekvence kódující gen pro myši legumain byla získána pomocí metody RT-PCR. Nejprve byla vyzolována RNA z nádorů indukovaných TC-1 buňkami a sekvence pro legumain byla amplifikována pomocí soupravy Qiagen LongRange 2Step RT PCR (Qiagen, Hilden, SRN) a primerů 5'-GTGAATTCGCCGCCATGACCTGGAGAGTGGCTGT-3' (přímý směr) a 5'-GCGAATTCAGTAGTACTAAGACACAC-3' (zpětný). K amplifikovanému genu byla přidána sekvence Kozakové a takto vzniklý konstrukt byl vložen do plazmidu pBSC štěpeného restrikčním enzymem EcoR I.

Pro přípravu variant genu pro legumain, ve kterých byl zmutován RGD motiv (aa120-122), označených jako LgmnCGD a LgmnRGG, byla použita mutagenese pomocí soupravy Altered Sites II Mammalian Mutagenesis Systém (Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA) a oligonukleotidů 5'-GCGTCACCTCCAGCACGGCG-3' pro LgmnCGD a 5'-AGCTTCTGCGCCACCTCTCAG-3' pro LgmnRGG.

Pro přípravu fúzního genu byl za sekvenci kódující legumain nebo jeho mutované varianty vložen epitop p30, získaný amplifikací fragmentu C tetanického toxinu, a to buď v jeho zkrácené formě (TT1s) nebo dlouhé formě (TT11). Sekvence pro epitop p30 byla vložena do místa pro restrikční endonukleázu Hind III.

## 4.9. Buněčné linie

Buněčná linie BSC40 byla odvozena z ledvinných fibroblastů kočkodana zeleného adaptovaných na růst při 40°C (Brockman a Nathans, 1974). Linie CV-1 byla odvozena z ledvinných buněk dospělého samce kočkodana zeleného (JENSEN *et al.*, 1964). Lidské embryonální ledvinné epiteliální buňky 293T transformované adenovirovým E1A proteinem a velkým T antigenem viru SV40, byly získány od Dr. J. Kleinschmidta (DKFZ, Heidelberg, SRN). Nádorová buněčná linie MK16/1/IIIABC (MK16/ABC) byla odvozena z ledvinných buněk myšního kmene C57BL/6 transdukovaných onkoproteiny E6 a E7 lidského papilomaviru 16 (HPV16) a aktivním onkogenem H-ras (Smahel *et al.*, 2001). Buněčná linie NIH/3T3 byla odvozena od embryonálních fibroblastů embrya myšního kmene NIH/Swiss (TODARO a GREEN, 1963). Myší buněčná linie TC-1 odvozená z primárních epiteliálních buněk myšního kmene C57BL/6 transformovaných onkogeny HPV16 E6, E7 a c-Ha-ras (Lin *et al.*, 1996), byla získána od Dr. TC Wu (John Hopkins Medical Institutions, Baltimore, USA). Krysí buněčná linie RAT-2 byla odvozena od krysích embryonálních fibroblastů a postrádá expresi buněčné TK (Topp, 1981). Linie RMA-S byla odvozena od myšního T buněčného lymfomu s nefunkčním TAP-2 transportérem, a byla poskytnuta Dr. T Schumacherem (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, Nizozemí). Buněčné linie BSC40, 293T, MK16/ABC, NIH/3T3 byly kultivovány v médiu D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, PAA Laboratories,

Pasching, Rakousko) s vysokým obsahem glukózy s 10% FBS (PAA Laboratories, Pasching, Rakousko). Buněčné linie CV1 a TC-1 byly kultivovány v médiu E-MEM (Eagle's Minimum Essential medium, Sigma-Aldrich, Missouri, USA) s 5% FBS. Buněčná linie RAT-2 byla kultivována v médiu RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) s přidavkem 3% FBS. Buněčná linie RMA-S byla kultivována v médiu RPMI-1640 s přidavkem 10% FBS a  $10^{-5}$  M 2-merkaptoethanolu. Pro kultivaci buněk byly použity plastové kultivační lahvičky a panely (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Švýcarsko).

## 4.10. Víry

Virus vakcinie klon 13 kmene Praha (P13) byl získán plakovou purifikací z vakcíny proti pravým neštovicím VARIE Sevac používané na území Československa. (Kutinova *et al.*, 1995). Tento virus byl díky své vysoké imunogenicitě vybrán jako základ rekombinantních vakcín.

Virus P13-SigE7LAMP byl připraven naší laboratoří vložением fúzního genu SigE7LAMP do F7L lokusu viru P13 (Mackova *et al.*, 2004). Jako kontrolní virus sloužil v experimentech virus P13-SigE7LAMP-TK, který byl připraven přerušением genu pro virovou TK vložением 100bp odvozených od 11K promotoru VACV. Jako negativní kontrola při imunizacích sloužil virus P13-PreS2S exprimující obalový protein viru hepatitidy B (Kutinova *et al.*, 1994).

### 4.10.1. Práce s víry

#### 4.10.1.1. Plaková purifikace

Na Petriho misky bylo nasazeno 5 ml suspenze buněk RAT-2 o koncentraci  $2 \times 10^5$  buněk/ml. Po 48 hodinách byly buňky infikovány 200  $\mu$ l virové suspenze v ředění  $10^{-1}$  a  $10^{-2}$ . Po infekci byly buňky přelity 1% agarem doplněným médiem E-MEM s 5% FBS, doplněným 2 ml bikarbonátu sodného a 1 ml BUdR (zásobní 10  $\mu$ g/ml) na 100 ml směsi. Po 3 až 5 dnech inkubace byly vzniklé plaky obarveny druhým přelivem obsahujícím navíc 2 ml/100 ml směsi neutrální červeně. Po obarvení byly vypíchnuty plaky z terminálního ředění do 1 ml média RPMI-1640 se 3% FBS a postup byl opakován. První dvě purifikace probíhaly za přítomnosti BUdR, který vytváří selekční tlak. Třetí purifikace probíhala již bez BUdR. Vypíchnuté plaky byly resuspendovány v médiu RPMI-1640 se 3% FBS a uloženy na  $-70^{\circ}\text{C}$ . Na 24-jamkový panýlek byl nasazen 1 ml suspenze buněk RAT-2 o koncentraci 150 000 buněk/ml, která byla následně infikována 100  $\mu$ l purifikovaného materiálu. Po několika dnech byly buňky zpracovány pro detekci rekombinant pomocí PCR. Pozitivním materiálem (500  $\mu$ l) byly následně infikovány buňky CV-1 narostlé v kultivační lahvičce o ploše 25 cm<sup>2</sup>.

Úplně degenerovaná kultura byla třikrát zmrazena a rozmrazena a centrifugována při 300 g po dobu 10 min. při  $4^{\circ}\text{C}$ . Získaný supernatant byl rozdělen do několika mikrozkrumavek, z nichž

jedna byla použita k pomnožení viru na buňkách CV1 nebo BSC 40 a přípravě tzv. „rychlého koncentrátu“.

#### 4.10.1.2. Plaková titrace

Na Petriho misky bylo nasazeno 5 ml suspenze CV-1 buněk o koncentraci  $2 \times 10^5$  buněk/ml. Po 2 dnech buňky dorostly do plné konfluence a byly infikovány 200  $\mu$ l virové suspenze. Ta byla připravena naředěním materiálu z „rychlého koncentrátu“ médiem E-MEM na  $10^{-5}$ -  $10^{-7}$ . Infekce a následné kroky probíhaly stejně jako u plakové purifikace. Po obarvení plaků byly vybrány ty misky, které mají počet plaků do 120 a jejich počet byl přepočítán na tzv. PFU, udávající koncentraci funkčních virových částic ve virovém inokulu.

$$\text{PFU/ml} = \text{počet plaků} \times \text{ředění} \times 5$$

#### 4.10.1.3. Příprava virové suspenze

Plně narostlá kultura BSC40  $4 \times 10^6$  na 300 cm<sup>2</sup> láhev byla infikována virovým materiálem o známém titru MOI 0,1. Po 2 hodinách adsorpce byly buňky přelity 30 ml média D-MEM s 10 % FBS na láhev a uloženy do CO<sub>2</sub> inkubátoru. Po 48 hodinách následovala purifikace IMV přes sacharózový gradient (JOKLIK, 1962). Infikované buňky byly nejprve centrifugovány 60 min. při 53 000g a 4°C. Vzniklý pelet byl resuspendován v médiu D-MEM bez séra a znovu stočen 40 min při 53 000g a 4°C. Vzniklý pelet byl resuspendován ve 3 ml extrakčního pufru (1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH = 9) a sonikován 3  $\times$  1 min. na ledu, při amplitudě 6 na sonikátoru Soniprep 150 (MSE, Londýn, Velká Británie).

Sonikovaný materiál byl následně centrifugován na stupňovém gradientu při 4500 g a 4°C po dobu 10 min. Vzniklý pelet byl opět resuspendován v 3 ml čerstvého extrakčního pufru a supernatan byl uschován. Resuspendovaný pelet byl znovu sonikován a centrifugován. Obě získané frakce supernatantu byly převrstveny na 10 ml roztoku 36% sacharózy v 1mM Tris pH = 8 a centrifugovány 90 min. při 29800 g a 4°C. Získaný pelet byl opět rozpuštěn v čerstvém extrakčním pufru, převrstven na 30 ml stupňového sacharózového gradientu (15, 36 a 45 % sacharosa v extrakčním pufru) a stočen 20 min při 29 800 g, 4 °C a zpomaleném brzdění. Vzniklá opaleskující vrstva, která se zpravidla objevuje na rozhraní 36 a 45 % sacharózy, byla odebrána a naředěna ve 30 ml extrakčního pufru. Následovala další centrifugace 60 min. při 53 000g, 4°C. Sediment byl resuspendován v 1000  $\mu$ l extrakčního pufru a po sonikaci rozplněn. Výsledné množství izolovaného viru bylo stanoveno pomocí titrace.

## 4.10.2. Příprava rekombinantních virů nesoucích IGFBP-3

Pro přípravu rekombinantních virů vakcinie byl použit postup, který využívá homologní rekombinace mezi virem a rekombinačním plazmidem (Perkus *et al.*, 1986).

### 4.10.2.1. Rekombinace

Na Petriho misky bylo nasazeno 5 ml suspenze buněk CV-1 o koncentraci  $3 \times 10^5$  buněk/ml a necháno růst do druhého dne. Další den byl připraven roztok obsahující 25  $\mu$ g plazmidové DNA, přečištěné přes cesium-chloridový gradient, v celkovém objemu 50  $\mu$ l vody. Tento roztok byl smíchán se 175  $\mu$ l  $2 \times$  koncentrovaného HeBS. Dále byl připraven zásobní roztok obsahující 100  $\mu$ l viru, 700  $\mu$ l vody a 88,8  $\mu$ l  $\text{CaCl}_2$ . K 175  $\mu$ l tohoto roztoku bylo za stálého míchání přikapáno 225  $\mu$ l roztoku plazmidové DNA s HeBS.

Rekombinační plazmid pSC59-H5-IGFBP-3, v němž se IGFBP-3 nachází pod kontrolou časného H5 promotoru sloužil k vytvoření rekombinantního viru P13-H5-IGFBP-3, kdy rekombinace probíhala do rodičovského viru P13, a viru P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3, kdy byl jako základ na rekombinaci použit virus P13-SigE7LAMP. Rekombinační plazmid pSC59-E/L-IGFBP-3 byl použit pro tvorbu virů P13-E/L-IGFBP-3 resp. P13-SigE7LAMP-E/L-IGFBP-3. Směs plazmidové DNA a viru byla inkubována 30 min. při pokojové teplotě a následně k ní bylo přidáno 350  $\mu$ l média RPMI-1640 se 4% FBS. Vzniklá směs byla rozdělena na 2 misky s narostlými buňkami, z nichž bylo předem odsáto původní médium. Buňky byly následně umístěny na 2 hodiny do  $\text{CO}_2$  inkubátoru. Poté byly k buňkám přidány 3 ml čerstvého média RPMI-1640 se 4% FBS a buňky byly inkubovány dalších 20 hodin. Pak byly misky 3  $\times$  zmrazeny a rozmrazeny, médium s buněčnými zbytky bylo centrifugováno při 780 g po dobu 20 min. při 4°C. Supernatant, obsahující směs rekombinantních virů, byl odebrán do čisté zkumavky a uložena na -70°C.

### 4.10.2.2. Selekcce rekombinantních virů

Selekcce rekombinantních virů byla prováděna plakovou purifikací v přítomnosti selekčního činidla, tymidinového analogu 5-bromo-2'-deoxyuridinu, při jehož přítomnosti netvoří standardní kmen plaky.

Vytvořené plaky byly pomocí Pasteurových pipet vypíchány a resuspendovány v 1 ml média RPMI-1640 se 3% FBS. Následně byly 100  $\mu$ l tohoto média infikovány buňky RAT-2, které byly den předem nasazeny v množství 150000 buněk na 24-jamkový panýlek. Po hodině infekce bylo k buňkám přidáno 400  $\mu$ l média s 5  $\mu$ l BUdR a panýlek byl umístěn do  $\text{CO}_2$  inkubátoru. Podle rozvoje cytopatického efektu byly kultury druhý až čtvrtý den 3  $\times$  zmrazeny/rozmrazeny a použity pro analýzu testem ELISA, nebo se zpracovány pro analýzu pomocí PCR.

### 4.10.3. Frakcionace virionů VACV

V suspenzích IMV, přečištěných přes sacharózový gradient, bylo stanoveno množství proteinu pomocí Bio-RAD protein assay (Bio-RAD, Hercules, Kalifornie, USA). Následně byla suspenze naředěna tak, aby obsahovala stejné množství proteinu. Připravené suspenze byly centrifugovány 20 min. při 4°C a 13 000 g. Vzniklý pelet byl resuspendován v Tris pufru (50 mM Tris-HCl pH = 8,5, 10mM MgCl<sub>2</sub>) s přídatkem 1% NP-40 a směs byla inkubována 30 min. při 37°C. Následně bylo vše centrifugováno 10 min. při 13000 g, 4°C. Výsledkem centrifugace byla solubilní membránová frakce (M) a pelet, který byl znovu inkubován 30 min. při 37°C v Tris pufru s 1% NP-40, 50 mM dithiothreitem. Opakováním centrifugace, byla získána matrixová frakce (Mx). Získaný pelet byl finálně inkubován za stejných podmínek s Tris puferem s 0,5% deoxycholátem a 0,1% SDS. Touto poslední inkubací byla získána solubilní frakce jaderných proteinů (C1) a nesolubilní frakce (C2) (Gomez a Esteban, 2001; Zurkova *et al.*, 2010).

### 4.10.4. Neutralizační test rekombinantních VACV

Buňky CV-1 kultivované 24 hodin v Petriho miskách byly infikovány 200 µl virové suspenze, obsahující takové množství viru, aby na misce vzniklo 150 plaků. Po 1,5 hodině adsorpce při 37°C bylo k buňkám přidáno buď neutralizující nebo kontrolní králičí sérum naředěné 1:5 v médiu E-MEM s 5% FBS, nebo médium samotné. Misky byly na 1 hodinu umístěny na 37°C, po kterých bylo z buněk odstraněno inokulum, a buňky byly přelity 1% agarem doplněným médiem E-MEM s 5% FBS. Po 3 dnech v CO<sub>2</sub> inkubátoru při 37°C, byly přelity 1% agarem s médiem a neutrální červení pro obarvení plaků a jejich následné spočítání.

### 4.10.5. Test virové adsorpce

Buňky CV-1 byly infikovány jako při neutralizačním testu. V indikovaných intervalech bylo inokulum odsáto a zamraženo na -70°C. Množství neadsorbovaného viru bylo stanoveno plakovou titrací.

### 4.10.6. Analýza virové replikace *in vivo* pomocí qPCR

Samicím myšího kmene C57BL/6 byly injikovány rekombinantní viry v dávce  $1 \times 10^6$  PFU. V indikovaných časových intervalech byly myši usmrceny a byla jim vyjmuta ovaria. Tato byla následně opláchnuta PBS a homogenizována v 0,4 ml pomocí homogenizátoru Omni tissue homogenizer TH-220 (Omni International, Kennesaw, Georgia, USA). Z homogenizovaného materiálu bylo použito 50 µl pro izolaci DNA pomocí Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit, podle protokolu Purification of Total DNA from Animal Tissue. Pro odstranění RNA byly

vzorky inkubovány 2 min. se 2  $\mu$ l RNázy (100 mg/ml) a následně byl přidán AL pufr. Z izolované DNA byly použity 2  $\mu$ l pro namíchání reakční směsi qPCR obsahující 0,2 mM dNTP, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 300 nM forward primer 5'-TTG GCA ATA GTC CGT GTA ATC-3', 300 nM reverse primer 5'-ATA CTT AAT CAT GTC GCC GAC -3' a 250 nM Taqmanovské sondy BHQ1-FAM 5'- CCA GTA ACA CGA GCT GGT GCT TGC TAG- 3'. Reakce PCR byla v reálném čase měřena na přístroji Rotorgene 3000 (Corbette Life Science, Cambridge, Velká Británie). Pomocí souběžné PCR plazmidu obsahujícího amplifikovaný úsek DNA byla sestrojena standardní křivka a kvantifikováno množství virové DNA ve vzorcích. Množství virové DNA bylo následně normalizováno na celkové množství DNA ve vzorku.

## 4.11. Detekce IGFBP-3 testem ELISA

Pro kvantifikaci produkce IGFBP-3 byla použita souprava Human IGFBP-3 DuoSet ELISA Development System (R&D System, Minnesota, USA). Na mikrotitrační 96-jamkovou destičku Maxisorp (Nunc, Dánsko) bylo nanášeno 100  $\mu$ l vazebné protilátky o koncentraci 4  $\mu$ g/ml v PBS. Po 20 hodinách při pokojové teplotě byly jamky třikrát promyty 400  $\mu$ l promývacího pufru (PBS s 0,05% Tween 20). Následně byly 1 hodinu blokovány 300  $\mu$ l blokovacího pufru (PBS s 5% Tween 20, 0,05% NaN<sub>3</sub>). Po 1 hod. byl blokovací pufr odsát a jamičky byly 3 $\times$  propláchnuty promývacím pufrům. Vzorky a standard byly smíchány s ředícím roztokem (PBS s 5% Tween 20, 2% BSA) na celkový objem 100  $\mu$ l. Standard byl ředěn dvojkovou řadou v koncentracích 8500 - 266 pg/ml. Připravené vzorky byly nanášeny do jameček, kde byly ponechány 2 hodiny. Následně byly jamičky pětkrát opláchnuty promývacím pufrům. Po té bylo přidáno 100  $\mu$ l detekční protilátky o koncentraci 200 ng/ml v ředícím pufru. Po 2 hodinách inkubace byly jamičky opět pětkrát opláchnuty. Bylo přidáno 100  $\mu$ l konjugátu streptavidin-křenová peroxidáza naředěného v ředícím pufru v poměru 1:200 a inkubováno 20 min. Opláchnutí bylo opakováno. Nakonec bylo přidáno 100  $\mu$ l substrátového roztoku a necháno 20 min. inkubovat ve tmě. Probíhající barevná reakce byla zastavena přidáním 50  $\mu$ l stop roztoku (2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Následně byla změřena absorbance roztoku při 450 nm pomocí Ultra Microplate Reader ELX808 (BioTEK Instruments Inc., Vermont, USA).

## 4.12. Proteinová elektroforéza (SDS-PAGE) a

### western-blot

Vzorky pro SDS-PAGE byly smíchány s denaturujícím pufrům dle Laemmliho a nanášeny na 10% polyakrylamidový gel. Separované proteiny byly přeneseny na nitrocelulózu (Hybond-C extra, Amersham plc, Amersham, Velká Británie) nebo PVDF membránu (GE, Dallas, Texas, USA) pomocí Trans-Blot SD semi-dry electrophoretic transfer cell (Bio-Rad, Hercules, Kalifornie, USA). Následně byla membrána zablokována roztokem

10% odtučněného mléka v PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH = 7,2 – 7,4). Zablokovaná membrána byla opláchnuta 3× 5 min. v PBS s 0,05% Tween 20. Po té byla 1 hod. inkubována s neznačenými primárními protilátkami nebo protilátkami značenými biotinem. Membrána byla opět opláchnuta a inkubována sekundární protilátkou konjugovanou s peroxidázou nebo konjugátem avidinu s křenovou peroxidázou (BD Pharmingen). Po opláchnutí byl pro vizualizaci použit ECL Detection Reagent Kit (Amersham, Amersham, Velká Británie).

## **4.13. Průtoková cytometrie**

### **4.13.1. Detekce fosfatidylserinu ve virionech rekombinantních**

#### **VACV**

Ke zhruba 100 000 mikrokuličkám s navázaným proteinem G (Flow Cytometry Protein G Antibody Binding Beads, Bangs Laboratories, Fishers, Indiana, USA) bylo přidáno 200 µl myšního anti-VACV séra nebo séra z naivních myší, naředěného 1:1 v PBS. Po 30 min. bylo ke kuličkám přidáno 100 µl blokovačního pufru (PBS s 1% BSA, 10% FBS, 0,1% NaN<sub>3</sub>) a směs byla za občasného kývání inkubována dalších 30 min. Kuličky byly následně centrifugovány 2 min. při 300 g a 2× opláchnuty PBS. Přítomnost navázaného myšního IgG byla v části vzorků stanovena obarvením anti-myším Fab IgG fragmentem značeným Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA).

Ke zbylým kuličkám bylo přidáno 20 µl suspenze virionů přečištěných přes sacharózový gradient a směs byla inkubována 3 hod. Následně byly kuličky 2× propláchnuty PBS a po poslední centrifugaci byl pelet rozpuštěn ve 20 µl blokovačního pufru. Pro ověření zda se na kuličky navázal VACV, byla část kuliček inkubována s králičím anti-VACV sérem a následně vizualizovaná pomocí oslí anti-králičí protilátky značené DyLight 649 (Biolegend, San Diego, Kalifornie, USA).

Zbylé kuličky s navázanými viry byly smíchány s 200 µl blokovačního pufru a inkubovány 5 min., poté centrifugovány a 2× opláchnuty v PBS. Nakonec byly převedeny do 50 µl Annexin vazebného pufru a obarveny 15 min. inkubací s Annexinem V konjugovaným s PE (BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA). Následně byly kuličky centrifugovány a resuspendovány v čerstvém annexin vazebném pufru. Všechny vzorky byly měřeny na průtokovém cytometru LSR Fortessa (BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA) a data byla analyzována pomocí Flowjo 7.6.5 (TreeStar, Ashland, Oregon, USA) nebo FACSDiva 6 (BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA)

### **4.13.2. Identifikace makrofágů asociovaných s nádory**

Pro identifikaci makrofágů byly nádory vyvolané buňkami MK16/ABC vyjmuty z usmrcených myší a následně rozřezány na malé kousky. Pro přípravu jednobuněčné suspenze byla ke kouskům nádorové tkáně přidána Akutáza (PAA Laboratories, Pasching, Rakousko). Jejich další zpracování probíhalo pomocí disociátoru gentleMACS Octo (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, SRN) a řídilo se protokolem pro disociaci středně pevných lidských nádorů Tumor Dissociation Kit, human (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, SRN). Získaná buněčná suspenze byla centrifugována 10 min. při 300 g a 4 °C. Buněčný pelet byl opláchnut médiem RPMI-1640 s 10% FBS a znovu centrifugován. Vzniklý buněčný pelet byl pro odstranění červených krvinek resuspendován v ACK pufru (0,15 M NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 0,1 mM EDTA) a umístěn na 3 min. na led. Následně byla suspenze opět centrifugována 10 min při 300 g a 4°C. Výsledný pelet by resuspendován ve FACS pufru (1% BSA, 0.1% NaN<sub>3</sub> v PBS). Buňky byly spočítány pomocí ViCell XR (Beckman Coulter, Brea, Kalifornie, USA) a následně barveny monoklonálními protilátkami anti-CD11b protilátkou značenou FITC (BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA), anti-F4/80 konjugovanou s APC-eFluor 780 (eBioscience, San Diego, Kalifornie, USA). Pro barvení legumainu byla použita králičí polyklonální protilátka, popř. kontrolní izotypová kontrola, následována sekundární monoklonální protilátkou anti-králičí Ig značenou Alexa Fluor 546 (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornie, USA).

## **4.14. Pokusy *in vivo***

### **4.14.1. Histologická analýza nádorů**

Myši nesoucí nádory MK16/ABC o velikosti 1 cm v nejdelším měřeném rozměru, byly usmrceny a byly jim vyříznuty nádory. Pro histochemickou analýzu byly vyříznuté nádory fixovány v 10% formalinu a následně zality do parafinu. Histologické řezy byly následně barveny krysí monoklonální protilátkou proti povrchovému antigenu makrofágů F4/80 (eBioscience, San Diego, Kalifornie, USA) nebo pomocí králičí polyklonální protilátky proti legumainu (Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, Texas, USA). K vizualizaci bylo následně použito N-Histofine® Simple Stain™ Mouse MAX PO (Rat) nebo N-Histofine® Simple Stain™ Mouse MAX PO (R) (Nichirei Biosciences INC., Tokio, Japonsko).

### **4.14.2. Imunizační pokusy**

#### **4.14.2.1. Imunizace rekombinantními viry vakcinie**

Pro imunizace v profylaktickém uspořádání, byly samice myšího kmene C57BL/6 IP imunizovány 1 dávkou rekombinantního viru obsahující 1×10<sup>6</sup> PFU v 0,5 ml PBS.

Po 14 dnech jim bylo SC injikováno  $3 \times 10^5$  buněk MK16/ABC v 0,1 ml PBS. Při terapeutickém uspořádání imunizace bylo myším nejprve SC injikováno  $6 \times 10^4$  buněk TC-1. Po 10 dnech, kdy se vytvořily hmatatelné nádory, byly myši IP imunizovány  $1 \times 10^6$  PFU v 0,5 ml PBS. Růst nádorů byl monitorován 1 × týdně.

#### **4.14.2.2. Imunizace biolistickou metodou**

Pro imunizaci biolistickou metodou byla plazmidová DNA navázána na 1  $\mu$ m zlaté partikule (Bio-Rad, Hercules, Kalifornie, USA), které byly použity jako náplň pro náboje do genové pistole (Bio-Rad). Myši byly imunizovány celkem 3 × v týdenních odstupu. Při imunizaci byly zlaté partikule s DNA vstřeleny do vyholeného břicha pod tlakem 400 psi, přičemž každá myš obdržela 2 dávky s celkovým obsahem 2  $\mu$ g DNA. Jako negativní kontrola byl při pokusu použit prázdný expresní plazmid pBSC.

Části myší bylo v den imunizace IP podáno 50  $\mu$ g CpG ODN (Generi Biotech, Hradec Králové, ČR) rozpuštěného v 200  $\mu$ l PBS. Jiné části myší bylo 4 dny před imunizací IP injikováno 200  $\mu$ g protilátky proti CD25 (klon PC61, Bio X Cell, West Lebanon, New Hampshire, USA), pro depleci více než 70% CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-lymfocytů. Týden po poslední imunizaci byly myším odebrány sleziny, pro stanovení buněčné imunity, nebo jim bylo SC injikováno  $5 \times 10^5$  buněk MK16/ABC ve 150  $\mu$ l PBS. Růst nádorů byl monitorován 2 × týdně. Velikost nádorů byla počítána z 3 měření dle vzorce:  $(\pi/6)(a \times b \times c)$ .

#### **4.14.3. Testování buněčné imunity metodou ELISPOT**

Vypreparované sleziny z usmrcených imunizovaných myší byly homogenizovány buď pomocí autoklávovatelné sítky pomocí pístu z injekční stříkačky nebo později pomocí disociátoru gentleMACS Octo (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, SRN), za použití programu m\_spleen\_4. Mononukleární buňky byly izolovány gradientovou centrifugací ve Ficoll-Paque (GE Healthcare). Získané buňky byly přemístěny do média s RPMI s 10% FBS, spočítány a v koncentraci  $5 \times 10^5$  nasazeny na 96-jamkový panýlek s nitrocelulózovou membránou, na kterou byla předem navázána protilátka proti IFN- $\gamma$ . Takto nasazené buňky byly 20 hod. stimulovány peptidy. Další den byla produkce cytokinů vizualizovaná za použití sekundární protilátky konjugované s peroxidázou. Vzniklé spoty byly spočítány za použití CTL-ImmunoSpot® S6 (CTL, Shaker Heights, Ohio, USA).

### **4.15. Statistická analýza**

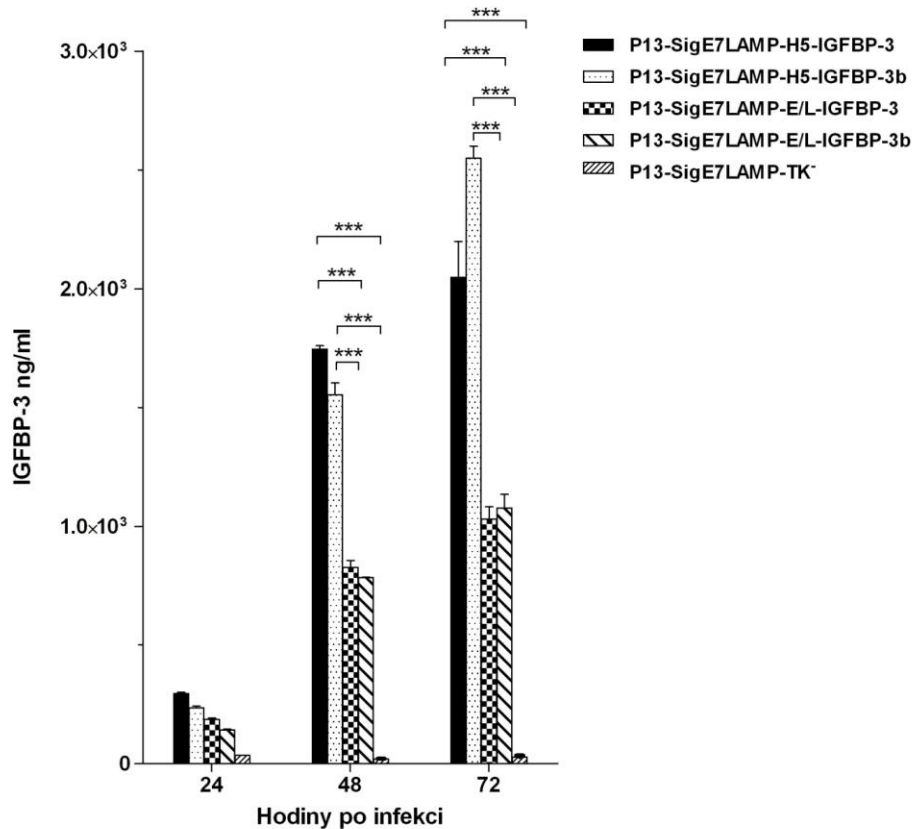
Pro statistickou analýzu byl použit software Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, Kalifornie, USA)

## 5. Výsledky

### 5.1. Modulace nádorového mikroprostředí pomocí IGFBP-3

#### 5.1.1. Vysoká hladina exprese IGFBP-3 je řízena H5 promotorem

Abychom zjistili, zda se jednotlivé rekombinantní viry liší v množství produkovaného IGFBP-3, infikovali jsme buňky CV-1 viry P13-SigE7LAMP-TK<sup>-</sup>, P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 nebo P13-SigE7LAMP-E/L-IGFBP-3 při multiplicitě 0,1 PFU. V jednotlivých intervalech jsme buněčné kultury zmrazili na -70°C a opět rozmrazili. Následně jsme buňky v médiu 3 krát sonikovali na ledu po dobu 1 min. a buněčné zbytky odstranili 20 min. centrifugací při 830 g a 4°C. Množství lidského IGFBP-3 v takto připravených materiálech jsme stanovovali pomocí testu ELISA. Ve třech na sobě nezávislých experimentech jsme zjistili, že exprese IGFBP-3 řízená H5 promotorem je v intervalech 48 a 72 hodin statisticky signifikantně vyšší (\*\*p < 0,001) než exprese řízená syntetickým E/L promotorem (Obr. 7). Jelikož exprese proteinů vložených do rekombinantních virů může být ovlivněna náhodnými mutacemi v jiných částech virového genomu, zahrnuli jsme do testování také nezávisle připravené sesterské rekombinantní viry označené jako P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3(b) a P13-SigE7LAMP-E/L-IGFBP-3(b), které pozorování potvrdily.



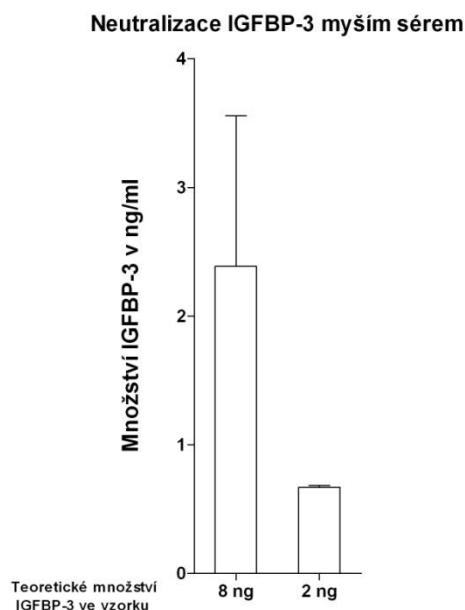
**Obr. 7: Analýza exprese IGFBP-3 rekombinantními VACV**

Buňky CV-1 byly infikovány viry P13-SigE7LAMP-TK, P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3, P13-SigE7LAMP-E/L-IGFBP-3 nebo sesterskými viry P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3(b) a P13-SigE7LAMP-E/L-IGFBP-3(b) při multiplicitě 0,1 PFU. Celkové množství IGFBP-3 bylo stanoveno v duplikátech pomocí testu ELISA. Na grafu je znázorněn aritmetický průměr  $\pm$  směrodatná odchylka (SD). Pro statistickou analýzu bylo použito dvoucestné analýzy variance (ANOVA). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$

Následně nás zajímalo, zda lze detekované rozdíly v produkci IGFBP-3 pozorovat také *in vivo*. Myším kmene C57Bl/6 jsme injikovali  $1 \times 10^6$  PFU rekombinantních virů P13-SigE7LAMP-TK, P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 nebo P13-SigE7LAMP-E/L-IGFBP-3 a poté jsme v den injekce, 3., 4. a 6. den po injekci myším odebrali krev pro stanovení hladiny IGFBP-3 v séru. Krev jsme následně stočili pro odstranění červených krvinek a získané sérum jsme zamrazili do doby analýzy na  $-70^\circ\text{C}$ .

Pro stanovení množství IGFBP-3 jsme myší sérum naředili  $5\times$ ,  $10\times$  a  $50\times$  a následně provedli test ELISA. Žádný ze vzorků neobsahoval detekovatelná množství IGFBP-3. Pro objasnění jsme provedli pokus, ve kterém jsme smíchali standart, dodávaný k našemu ELISA kitu a obsahující lidský rekombinantní IGFBP-3 o koncentraci 310 ng/ml, s negativním myším sérum v poměru 1:1 a směs umístili na 1 hodinu na  $37^\circ\text{C}$ . Poté jsme směs dále naředili tak, abychom získali roztoky o teoretické koncentraci 8 ng/ml a 2 ng/ml. Takto naředěné

roztoky jsme použili pro stanovení množství IGFBP-3 pomocí testu ELISA. Zjistili jsme, že inkubace rekombinantního IGFBP-3 s myším sérem vede k jeho inaktivaci. Místo teoretických 8 ng/ml, obsahovala směs IGFBP-3 o koncentraci 2,3 ng/ml (Obr. 8).



**Obr. 8: Myší sérum inaktivuje rekombinantní lidský IGFBP-3**

Myší sérum získané z myši infikovaných virem P13-SigE7LAMP-TK<sup>-</sup> bylo smícháno standardem IGFBP-3. Po hodině inkubace byla směs naředěna a bylo stanoveno množství IGFBP-3 testem ELISA. V grafu je znázorněn aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (SD).

## 5.1.2. Inhibice růstu nádorů vysokou expresí IGFBP-3 a imunizací proti E7 onkoproteinu

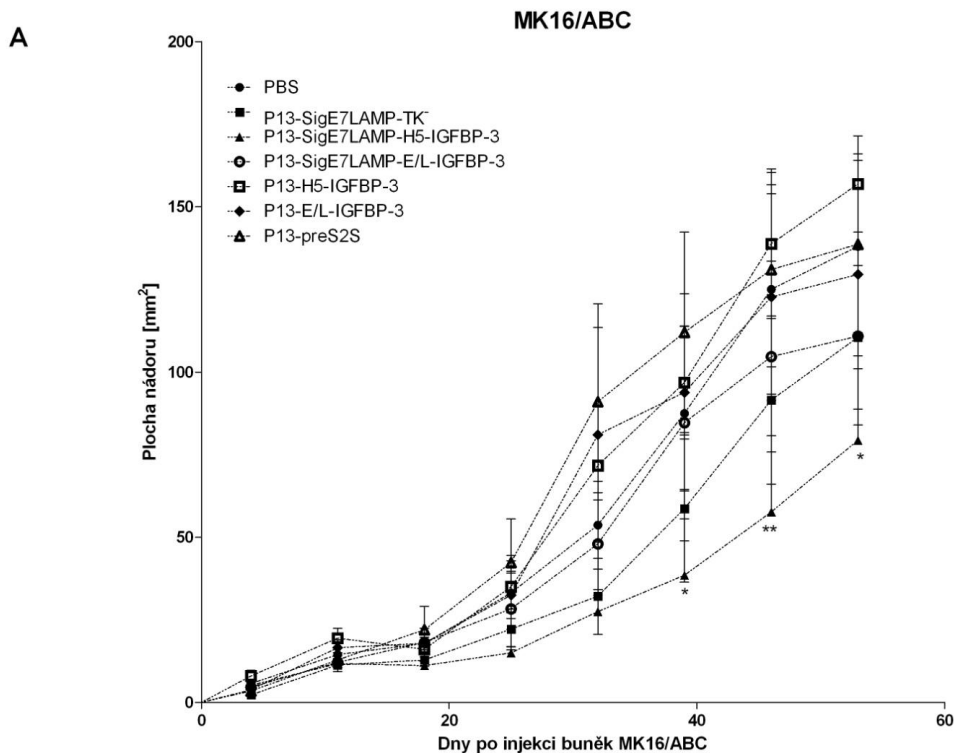
Rekombinantní viry charakterizované z hlediska exprese IGFBP-3 jsme následně použili pro preventivní a terapeutickou imunizaci proti nádorům exprimujícím E7 onkogen. Samičím myšího kmene C57BL/6(H-2b) bylo intraperitoneálně injikováno  $1 \times 10^6$  PFU rVACV a to buď 2 týdny před subkutánní injekcí  $3 \times 10^5$  MK16/ABC buněk nebo 10 dní po injekci  $6 \times 10^4$  TC-1 buněk.

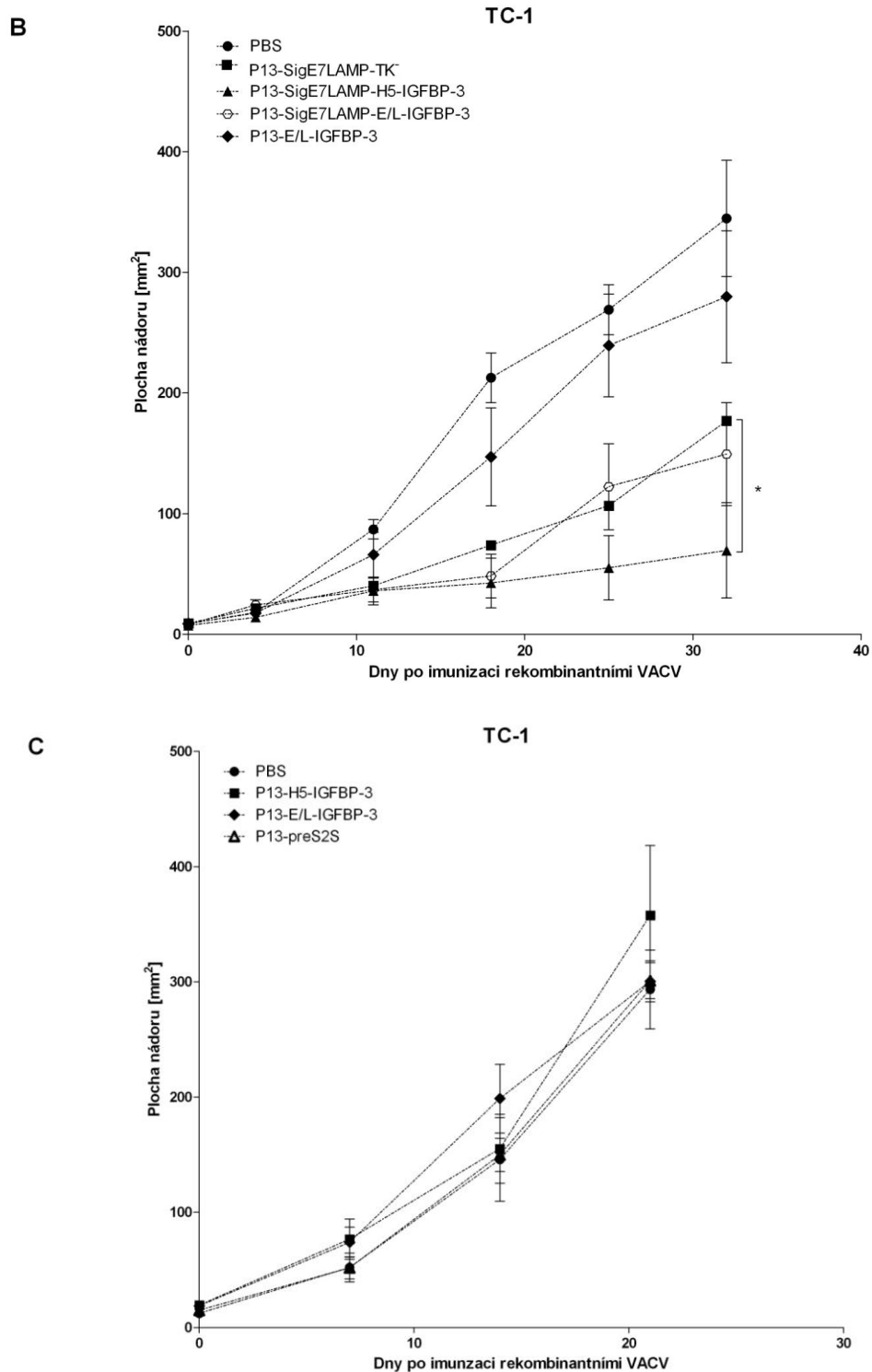
Preventivní vakcinace rekombinantním virem P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 významně snižovala růst nádorů vyvolaných MK16/ABC buňkami. Průměrná velikost nádorů v této skupině byla 39., 46. a 53. den významně menší než u skupin imunizovaných virem P13-H5-IGFBP-3 a P13-preS2S (Obr. 9a).

Při terapeutické vakcinaci, kdy v době podání rVACV myši již nesly hmatatelné nádory, vykazovala skupina léčená virem P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 významně pomalejší růst nádorů. U této skupiny byly nádory významně menší ( $*p < 0,05$ ) již 11. den po injikování viru

v porovnání s neléčenou skupinou (Obr. 9b), která obdržela pouze PBS. U skupin, které byly léčeny rVACV P13-SigE7LAMP-TK<sup>-</sup> a P13-SigE7LAMP-E/L-IGFBP-3 došlo také k signifikantnímu zpomalení růstu nádorů (\*\*p<0,001), které se projevilo 18. den po injekci virů. V pozdějších intervalech byly rozdíly ještě markantnější, když 32. den po injekci viru P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 byly nádory u této skupiny myši signifikantně menší (\*p<0,05) než u viru P13-SigE7LAMP-TK<sup>-</sup>, který slouží jako pozitivní kontrola při imunizacích. Tato pozorování byla opakovaně potvrzena.

Jelikož se objevil náznak, že by podání rekombinantního viru P13-E/L-IGFBP-3 mohlo mít efekt na růst nádorů, rozhodli jsme se pokus opakovat pouze s jednoduchými rekombinanty P13-H5-IGFBP-3 a P13-E/L-IGFBP-3, abychom odhalili potenciální terapeutický efekt samotného IGFBP-3. Jak je patrné z Obr. 9c, tak terapie založená na P13-H5-IGFBP-3 a P13-E/L-IGFBP-3 nebo kontrolním viru P13-preS2S nemá žádný signifikantní terapeutický efekt.



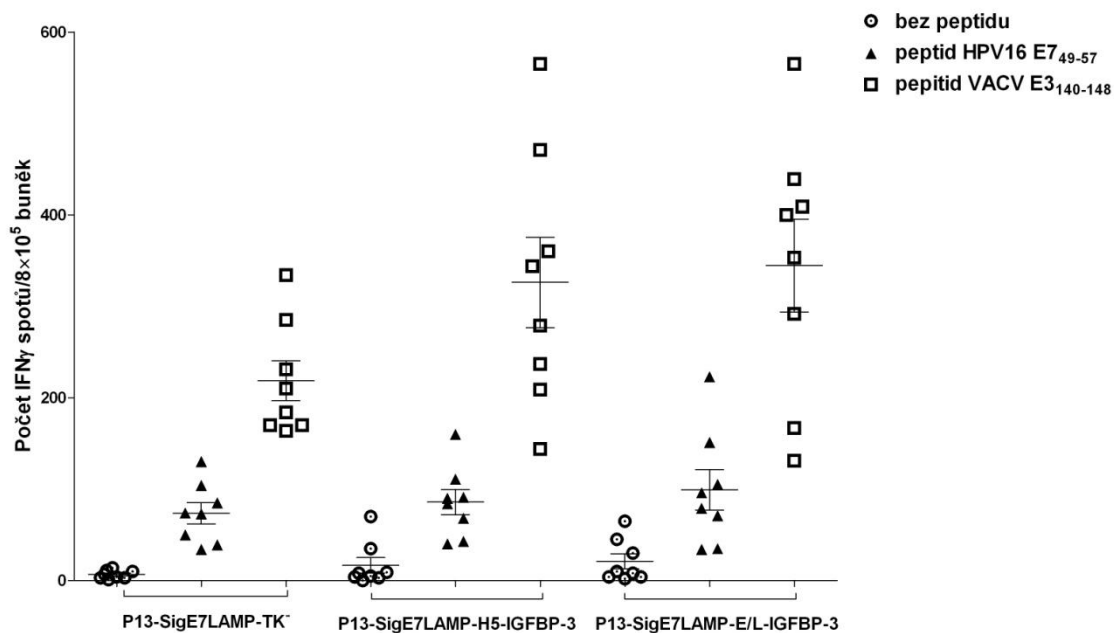


**Obr. 9: Růst nádorů je inhibován preventivní či terapeutickou imunizací virem P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3.**

Růst nádorů MK16/ABC u myši, které byly preventivně imunizovány rVACV (a). Růst nádorů TC-1 u myši léčených terapeutickou imunizací (b, c). Experimenty byly 2× opakovány. Na grafech je znázorněn aritmetický průměr velikostí nádorů v jednotlivých intervalech  $\pm$  směrodatná odchylka (SD). Pro statistickou analýzu bylo použito dvoucestné analýzy variance (ANOVA). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$

### 5.1.3. Exprese IGFBP-3 zvyšuje T-buněčnou odpověď proti VACV

Jelikož preventivní a terapeutická imunizace rekombinantním virem P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 potlačovala růst nádorů, tak nás zajímalo, zda exprese IGFBP-3 může ovlivňovat indukcii imunitní odpovědi zprostředkované T-lymfocyty. Přistoupili jsme tedy k imunizačnímu experimentu, při němž jsme imunizovali skupiny po 4 myších dávkou  $3 \times 10^6$  PFU rekombinantních virů P13-SigE7LAMP-TK<sup>-</sup>, P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 nebo P13-SigE7LAMP-E/L-IGFBP-3 v 0,5 ml PBS, kterou jsme podali intraperitoneálně. Po 12 dnech od imunizace jsme provedli stanovení imunitní odpovědi metodou ELISPOT, kdy jsme detekovali produkci IFN- $\gamma$  T-lymfocyty. Pro stanovení imunitní odpovědi proti onkogenu E7 lidského HPV16, jsme T-lymfocyty stimulovali nonapeptidem RAHYNIVTF. Jak je vidět na obrázku 10, tak koexprese IGFBP-3 zvyšuje imunitní odpověď proti E7 proteinu jen velmi nepatrně. Větší rozdíly jsme detekovali u imunitní odpovědi proti VACV, kdy jsme T-lymfocyty stimulovali peptidem odvozeným od časného proteinu VACV E3 (aa140-aa148) (VGPSNSPTF). V tomto případě byla imunitní odpověď indukovaná rekombinantními viry P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 a P13-SigE7LAMP-E/L-IGFBP-3 výrazně vyšší než u viru P13-SigE7LAMP-TK<sup>-</sup>, ačkoliv toto zvýšení není signifikantní v důsledku vysoké variability (Obr. 10).



**Obr. 10: Exprese IGFBP-3 zvyšuje imunitní odpověď proti VACV**

Skupiny myši ( $n=4$ ) byly intraperitoneálně imunizovány viry P13-SigE7LAMP-TK<sup>-</sup>, P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 nebo P13-SigE7LAMP-E/L-IGFBP-3. Počet IFN- $\gamma$  produkujících buněk byl stanoven metodou ELISPOT. Každý symbol na obrázku představuje 1 jamičku. Na grafu je vodorovnou čarou znázorněn aritmetický průměr  $\pm$  SD. Pro statistickou analýzu byl použit t-test.

## 5.1.4. Vysoká hladina exprese IGFBP-3 podporuje replikaci

### rVACV

Pro objasnění mechanismu, kterým vysoká hladina exprese IGFBP-3 zvyšuje imunogennost a terapeutický potenciál rekombinantního viru P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3, jsme se rozhodli stanovit, zda se viry exprimující IGFBP-3 nemnoží lépe než kontrolní virus P13-SigE7LAMP-TK<sup>-</sup>.

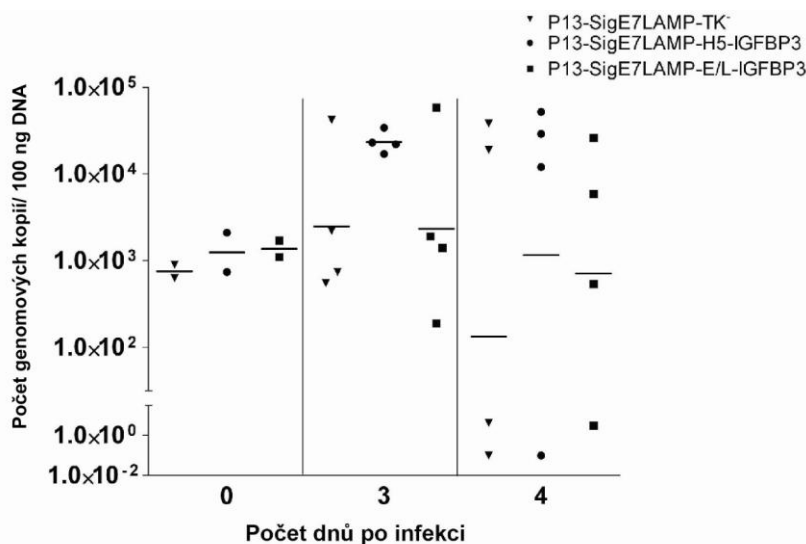
V prvním kroku jsme analyzovali replikaci virů *in vivo*. Za tímto účelem jsme myši kmene C57BL/6(H-2b) infikovali  $1 \times 10^6$  PFU rekombinantních VACV a v indikovaných intervalech detekovali množství DNA v ovariích pomocí kvantitativní PCR. Jak je patrné z obr. 11, tak virus P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 vykazuje 3. den po inokulaci vyšší míru replikace v porovnání s virem P13-SigE7LAMP-TK<sup>-</sup> a P13-SigE7LAMP-E/L-IGFBP-3. Také 4. den po infekci jsou patrné rozdíly, kdy v ovariích myší, které byly infikovány rekombinantními viry exprimujícími IGFBP-3, je detekovatelné větší množství virové DNA než u myší infikovaných P13-SigE7LAMP-TK<sup>-</sup>. Pozorované rozdíly ovšem nejsou statisticky signifikantní v důsledku vysoké variability *in vivo* pokusů. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli množení virů dále studovat *in vitro*.

Pro testování virové replikace *in vitro* jsme použili jednak buněčnou linii CV-1, představující buněčnou linii, na které provádíme titrace virů, a linii TC-1, která představuje myší model nádorů děložního čípku. Buňky jsme nechali vždy růst 24 h do plné konfluence a následně infikovali rekombinantními viry P13-SigE7LAMP-TK<sup>-</sup>, P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 nebo -SigE7LAMP-E/L-IGFBP-3 při multiplicitě 0,1. Po 48 hodinách od infekce jsme buňky uvolnili do média a sonikovali  $3 \times 1$  min. na ledu. Buněčné zbytky jsme následně odstranili centrifugací. Množství produkovaného IGFBP-3 jsme následně stanovili pomocí testu ELISA a množství obsaženého viru jsme stanovili titrací na CV-1 buňkách. Analýza replikace viru P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 na buňkách CV-1 i TC-1 ukázala, že se tento virus množí signifikantně lépe než virus P13-SigE7LAMP-TK<sup>-</sup> (Tab. 2). Virus P13-SigE7LAMP-E/L-IGFBP-3 a P13-SigE7LAMP-TK<sup>-</sup> se na TC-1 buňkách množí srovnatelně. Rozdíly mezi těmito viry jsou ovšem patrné na CV-1 buňkách, které jsou vůči infekci citlivější. Virus P13-SigE7LAMP-E/L-IGFBP-3 se na nich množí signifikantně lépe než virus P13-SigE7LAMP-TK<sup>-</sup>. Stejných výsledků jsme dosáhli při MOI 2 za 24 hodin.

Na základě těchto dat jsme navrhli hypotézu, že množství produkovaného IGFBP-3 hraje klíčovou roli v replikaci viru. Pro její otestování jsme tedy experiment zopakovali v přítomnosti neutralizující polyklonální protilátky AF675 proti IGFBP-3. Po 2 hodinách adsorpce viru na buňky jsme buňky opláchli čerstvým médiem a následně přidali médium

obsahující 4 µg/ml anti-IGFBP-3 protilátky nebo PBS. Po 24 hodinách kultivace při 37°C jsme přidali ještě další dávku protilátky a nakonec po 48 hod. po infekci jsme buňky zpracovali pro stanovení množství IGFBP-3 a množství vyprodukovaného viru. Zjistili jsme, že přítomnost neutralizující anti-IGFBP-3 protilátky signifikantně snižuje (\*\*p<0,01) množství produkovaného virového potomstva (Obr. 12A) a také množství detekovatelného IGFBP-3 (Obr. 12B).

Ačkoliv jsme přidali 4 µg/ml neutralizující protilátky, nebylo toto dostačující pro plnou neutralizaci IGFBP-3, které bylo dosaženo pouze v médiu viru P13-SigE7LAMP-TK. Neutralizace IGFBP-3 v médiu buněk infikovaných virem P13-SigE7LAMP-TK byla spojena se signifikantním (\*p<0,05) zvýšením množství produkovaného virového potomstva. Tento jev byl pozorován i při opakování daného experimentu, domníváme se tedy, že je toto dáno právě neutralizací IGFBP-3 v médiu. Při pokusech jsme se setkali s akumulací IGFBP-3 ve stárnoucích kulturách CV-1 buněk. Je tedy možné, že akumulace IGFBP-3 vede ke snížení metabolické aktivity CV-1 buněk a jeho neutralizace tomuto jevu brání. Virus vakcinie se pak na metabolicky aktivních buňkách množí lépe.



**Obr. 11: Expres IGFBP-3 zvyšuje replikaci rekombinantních virů *in vivo***

Samice myšního kmene C57BL/6 byly intraperitoneálně infikovány rVACV. V daných časových intervalech byla stanovena replikace virů pomocí qPCR. Na obrázku jsou zachyceny geometrické průměry dat. Pro statistickou analýzu byla použita dvoucestná ANOVA. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001

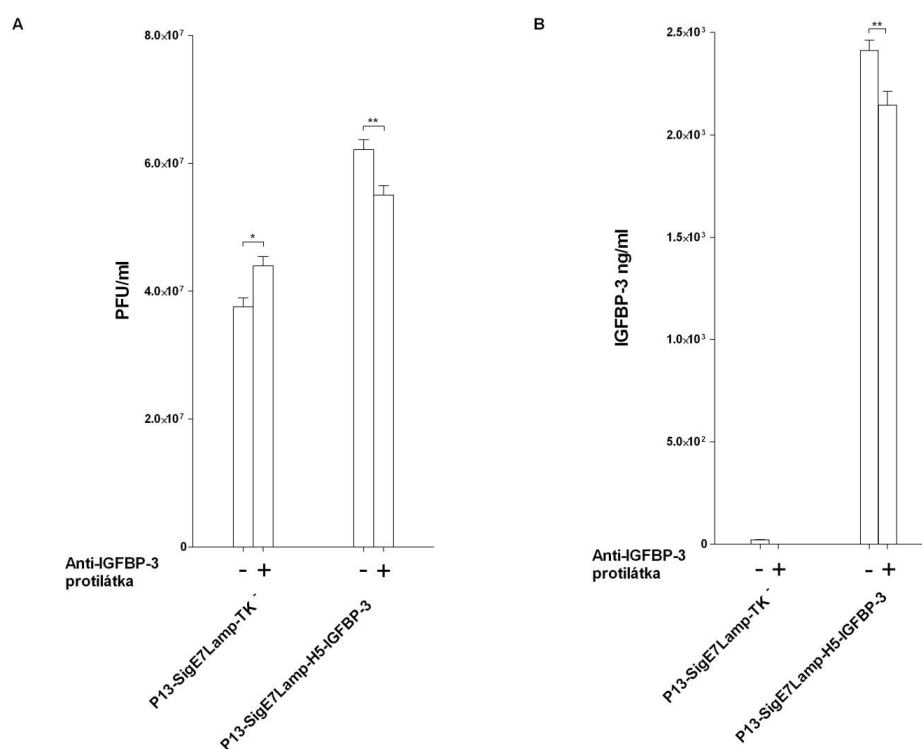
**Tabulka 2: Vysoká hladina exprese IGFBP-3 podporuje replikaci rVACV *in vitro***

Buněčná linie <sup>a)</sup>	Virus	Výtěžek (PFU×10 <sup>7</sup> ) <sup>b)</sup>	IGFBP3 (10 <sup>3</sup> ng/ml) <sup>c)</sup>
CV1	P13-SigE7LAMP-TK <sup>-</sup>	2.73 ± 0.55	
CV1	P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3	5.40 ± 0.67	3.74 ± 0.11
CV1	P13-SigE7LAMP-E/L-IGFBP-3	4.45 ± 0.63	1.58 ± 0.18
TC-1	P13-SigE7LAMP-TK <sup>-</sup>	1.26 ± 0.11	
TC-1	P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3	1.72 ± 0.20	0.73 ± 0.03
TC-1	P13-SigE7LAMP-E/L-IGFBP-3	1.08 ± 0.18	0.26 ± 0.01

<sup>a)</sup> Replikace virů exprimujících IGFBP-3 jsme stanovovali 48 hodin po infekci na buňkách CV-1 nebo TC-1.

<sup>b)</sup> Hodnota představuje aritmetický průměr 4 paralel ± SD.

<sup>c)</sup> Koncentrace IGFBP-3 byla měřena pomocí testu ELISA ve 2 paralelách.



**Obr.12: Neutralizace IGFBP-3 snižuje množství produkovaného viru**

### P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3

Buňky CV-1 byly infikovány virem P13-SigE7LAMP-TK<sup>-</sup> nebo P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 o MOI 0,1 a kultivovány za přítomnosti neutralizující protilátky proti lidskému IGFBP-3. Množství viru v supernatantech bylo stanoveno titrací v kvadruplicatech (A). Koncentrace IGFBP-3 v médiu byla stanovena pomocí testu ELISA (B). Na grafech je znázorněn aritmetický průměr ± SD. Pro statistickou analýzu byla použita jednocestná ANOVA. \**p* < 0,05; \*\**p* < 0,01

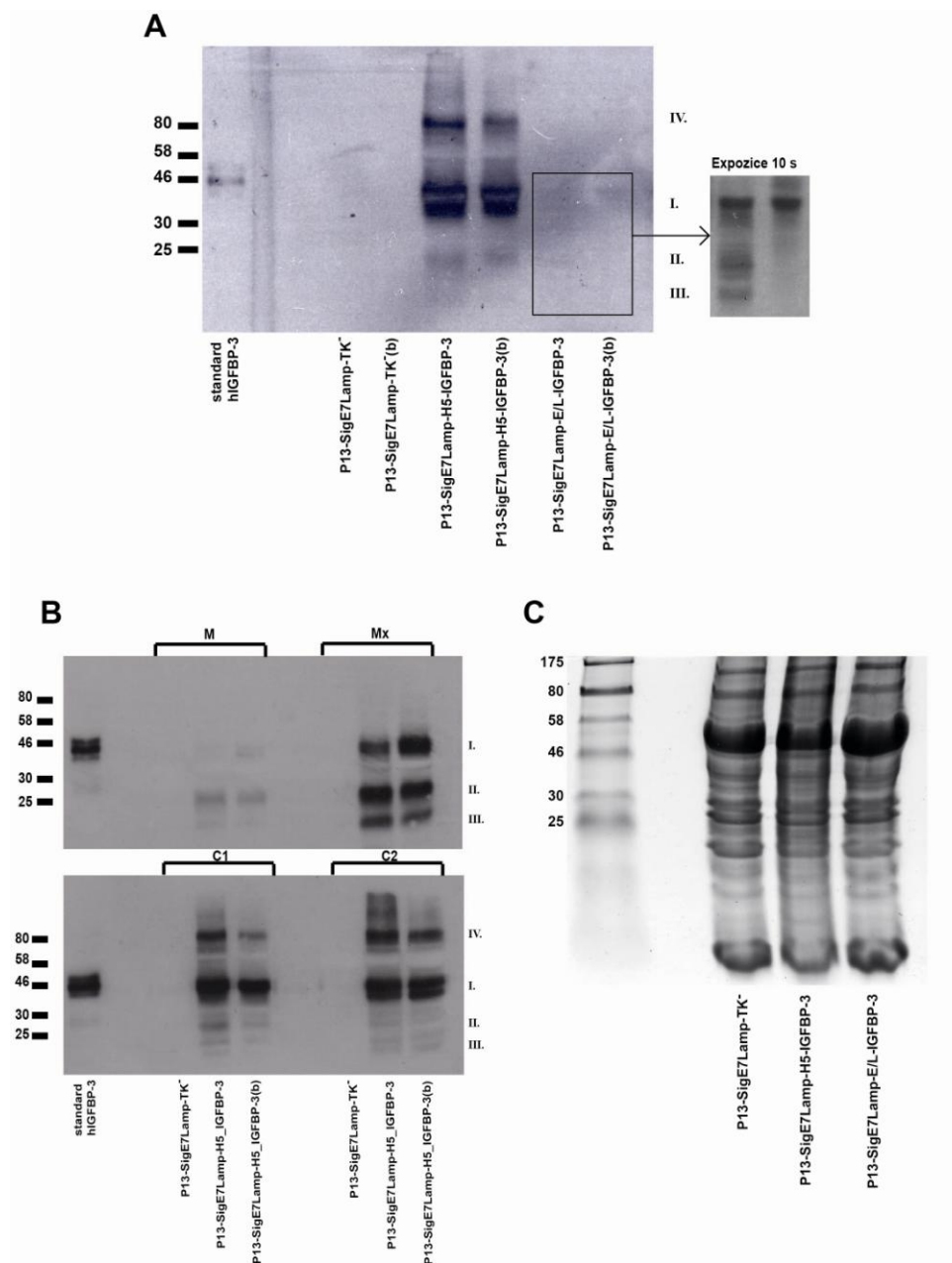
### **5.1.5. IGFBP-3 exprimovaný rekombinantními viry vakcínie je inkorporovaný do intracelulárních maturovaných virionů**

Na základě pozorování, že neutralizující protilátka proti IGFBP-3 snižuje titr viru P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3, jsme se rozhodli otestovat, zda nedochází k inkorporaci IGFBP-3 do IMV. Pro detekci IGFBP-3 ve virionech jsme použili metodu western-blot.

Nejprve jsme připravili vzorky obsahující viriony rVACV purifikované přes sacharózový gradient obsahující stejné množství proteinu. Množství proteinu ve směsích purifikovaných virů jsme stanovovali pomocí Bradfordovy metody. Abychom zajistili, že pozorované chování rVACV není dáno náhodnými mutacemi, zahrnuli jsme do pokusů i nezávisle připravené sesterské viry P13-SigE7LAMP-TK<sup>-</sup>(b), P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3(b), P13-SigE7LAMP-E/L-IGFBP-3(b). Připravené vzorky jsme separovali na 10% denaturujícím polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE) a separované proteiny následně přenesli na nitrocelulózovou membránu. Pro zobrazení IGFBP-3 jsme použili kozí polyklonální protilátku BAF675 konjugovanou s biotinem a komplex avidin-křenuvátka peroxidáza. Na obr.13A je zachycen výsledný western-blot, na kterém jsou patrné 4 proužky (I-IV) ve virových suspenzích P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 a P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3(b). Proteiny obsažené v proužku I svou molekulární hmotností odpovídají standardu glykosylovaného hIGFBP-3. Proteiny lokalizované v proužcích II a III mají menší molekulární hmotnost pod 25 kDa. Detekovaný proužek IV obsahuje proteiny, jejichž molekulová hmotnost se pohybuje okolo 80 kDa. Proužky I-III jsme detekovali také v suspenzích virů P13-SigE7LAMP-E/L-IGFBP-3 a P13-SigE7LAMP-E/L-IGFBP-3(b) (Obr. 13A), ale pro jejich vizualizaci byla nutná delší expozice, což znamená menší množství integrovaného proteinu.

V další fázi nás zajímalo, v jaké části IMV se nachází integrovaný IGFBP-3. Opět jsme použili suspenze virionů P13-SigE7LAMP-TK<sup>-</sup>, P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 a P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3(b) přečištěné přes sacharózový gradient, které obsahovaly stejné množství proteinů. Viriony v těchto suspenzích jsme frakcionovali a jednotlivé frakce analyzovali pomocí western-blotu za použití biotinylované protilátky proti IGFBP-3. Stejně jako v předcházejícím pokusu jsme nedetekovali žádné proužky ve frakcích viru P13-SigE7LAMP-TK<sup>-</sup> (Obr. 13B). V membránové frakci (M) virů P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 a P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3(b) jsme detekovali pouze velmi slabé proužky. V matrixové frakci (Mx) jsme detekovali IGFBP-3 (proužek I) a dva menší proužky II a III. V solubilní core frakci (C1) a nesolubilní frakci (C2) jsme detekovali především proužek IGFBP-3 (I) a větší proužek IV.

Zajímalo nás také, zda inkorporace IGFBP-3 do IMV ovlivňuje celkové proteinové složení virionů P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 a P13-SigE7LAMP-E/L-IGFBP-3 ve srovnání s kontrolním virem P13-SigE7LAMP-TK<sup>-</sup>. Opakovali jsme tedy separaci virionů rVACV na 10% SDS-PAGE a gel jsme následně obarvili pomocí Coomassie brilliant blue. Jak je patrné z obrázku 13C, tak získané vzory barvení jsou u všech virů stejné a je tedy pravděpodobné, že přítomnost IGFBP-3 neovlivňuje sestavování virové partikule.



**Obr. 13: IGFBP-3 je inkorporován do virionů rVACV, ale neovlivňuje strukturu virionu.**

Suspenze virů P13-SigE7LAMP-TK<sup>-</sup>, P13-SigE7LAMP-TK<sup>(b)</sup>, P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3, P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3(b), P13-SigE7LAMP-E/L-IGFBP-3 a P13-SigE7LAMP-E/L-IGFBP-3(b) byly analyzovány metodou western-blot. Přítomnost IGFBP-3 byla detekována pomocí biotinylované polyklonální protilátky proti IGFBP-3. Expoziční doba při vyvolání byla 2 s (A). Membránová, matrixová a 2 core frakce virionů virů P13-SigE7LAMP-TK<sup>-</sup>, P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3, P13-SigE7LAMP-

H5-IGFBP-3(b) byly analyzovány pomocí western-blotu (B). Složení virionů virů P13-SigE7LAMP-TK<sup>-</sup>, P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 a P13-SigE7LAMP-E/L-IGFBP-3 bylo stanoveno pomocí SDS-PAGE s následním barvením Coomassie brilliant blue (C).

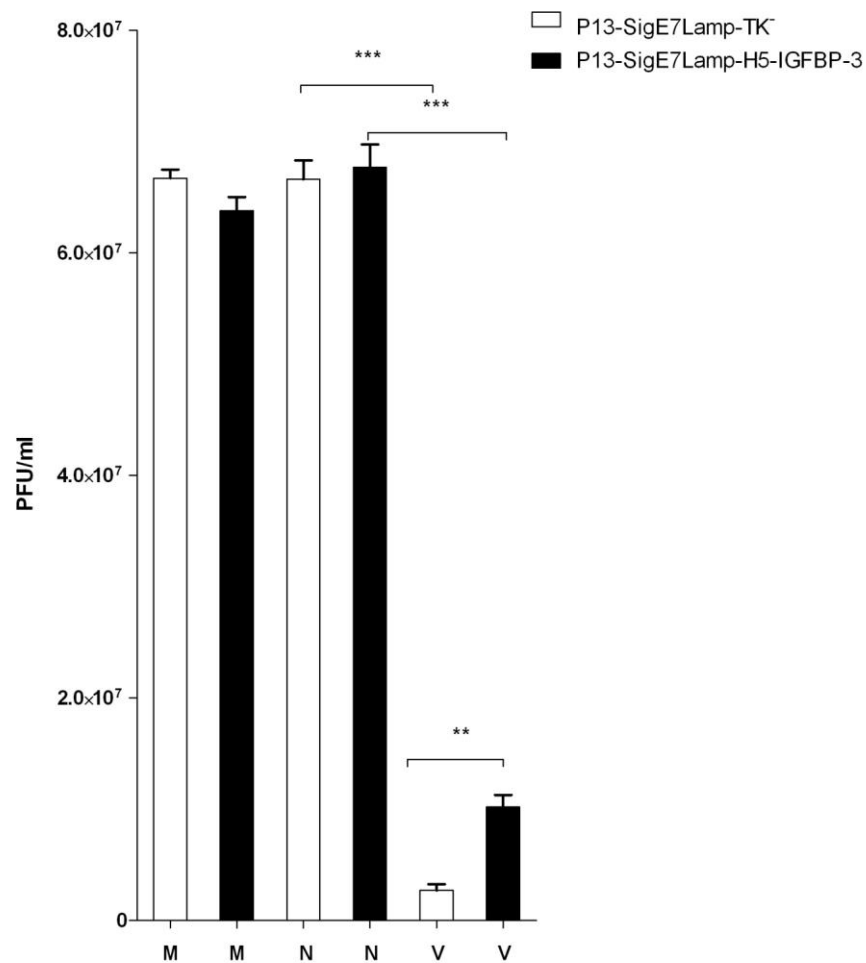
## 5.1.6. Adsorpce rVACV na buňky je ovlivněna inkorporací

### IGFBP-3

V dalším kroku jsme se rozhodli zjistit, která fáze replikačního cyklu viru je ovlivněna koexpresí IGFBP-3 a zda je možné, že přítomnost IGFBP-3 v partikuli viru P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 nějakým způsobem ovlivňuje vstup viru do buňky. Proto jsme infikovali CV-1 buňky po dobu 1,5 hod. při 37°C viry P13-SigE7LAMP-TK<sup>-</sup> nebo P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3. K infekci bylo použito takové množství infekčních virových částic, aby daly vzniknout zhruba 150 plakům na 1 Petriho misce. Po ukončení infekce jsme na 1 hod. přidali králičí sérum schopné neutralizovat VACV nebo kontrolní sérum z neimunizovaných králíků. Na konec jsme misky přelili agarem s médiem a po třech dnech inkubace při 37°C jsme spočítali vzniklé plaky. Jak je vidět na obrázku 14, tak nejsou patrné žádné rozdíly mezi infikovanými buňkami, které byly kultivovány v samotném médiu nebo v médiu obsahujícím neimunní sérum. Rozdíly jsou ovšem patrné u infikovaných buněk kultivovaných v médiu s neutralizujícím králičím sérem. V přítomnosti neutralizujícího séra dal virus P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 vzniknout statisticky signifikantně (\*\*p<0,01) více plakům než virus P13-SigE7LAMP-TK<sup>-</sup>. Tyto výsledky naznačují, že virus P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 v porovnání s virem P13-SigE7LAMP-TK<sup>-</sup> snadněji penetruje do buněk CV-1.

Jelikož tento experiment nemohl vyloučit možnost ovlivnění ještě časnějšího kroku v replikačním cyklu, tedy fázi adsorpce, rozhodli jsme se pokus zopakovat. Tentokrát jsme ovšem v různých časových intervalech stanovovali množství neadsorbovaného viru. Experiment jsme prováděli vždy ve čtyřech paralelách, kdy jsme v daném intervalu odsáli inokulum, které jsme zmrazili do doby, kdy bylo použito k titraci (Obr. 15). Zjistili jsme, že v časových intervalech do 1 hod. je adsorpce viru P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 a P13-SigE7LAMP-TK<sup>-</sup> stejná. V pozdějším intervalu 1,5 hod jsme ovšem pozorovali signifikantně vyšší depleci (\*p= 0,0205) viru P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 z inokula než u viru P13-SigE7LAMP-TK<sup>-</sup>. Tento rozdíl jsme pozorovali i v čase 2 hod., ačkoliv zde nebyl statisticky signifikantní.

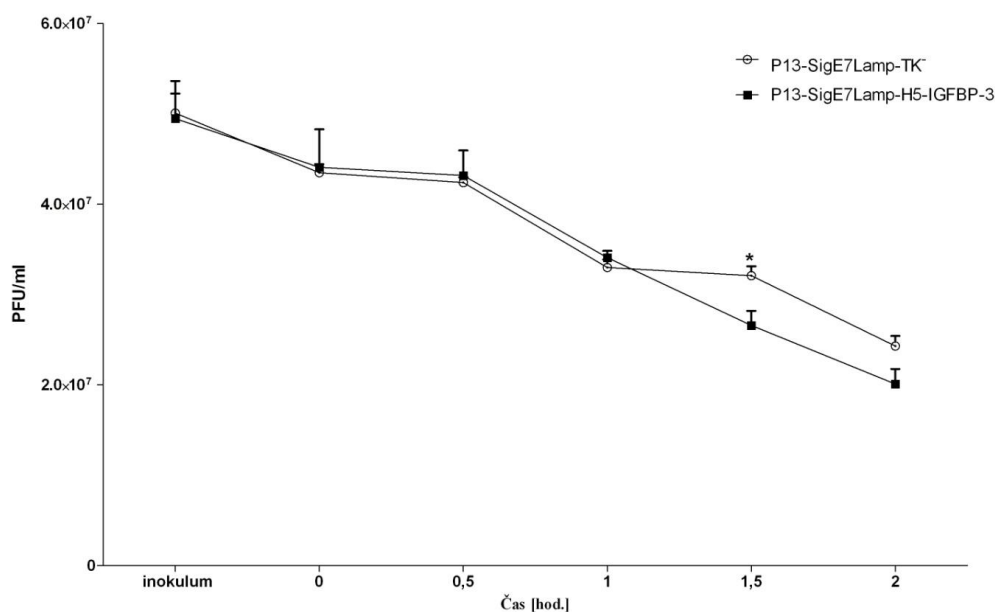
Pokud bychom měli tedy výsledky shrnout, tak virus P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 má větší schopnost adsorbovat na buňky, což přispívá k lepšímu vstupu tohoto viru do buněk a celkově lepší replikaci v porovnání s virem P13-SigE7LAMP-TK<sup>-</sup>.



**Obr. 14: IGFBP-3 zvyšuje schopnost rekombinantních virů vakcinie penetrovat do buněk CV-1**

Buňky CV-1 byly infikovány viry P13-SigE7LAMP-TK<sup>-</sup> nebo P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3.

Po adsorpci bylo k infikovaným buňkám přidáno médium (M), neimunní sérum (N) nebo neutralizující králičí anti-VACV sérum. Buňky byly následně zpracovány metodou plakové titrace. Zobrazené hodnoty představují aritmetický průměr pěti paralel ± SD. Pro statistické vyhodnocení byla použita jednocestná ANOVA. \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001



**Obr. 15: IGFBP-3 zvyšuje schopnost adsorpce rVACV na buňky CV-1**

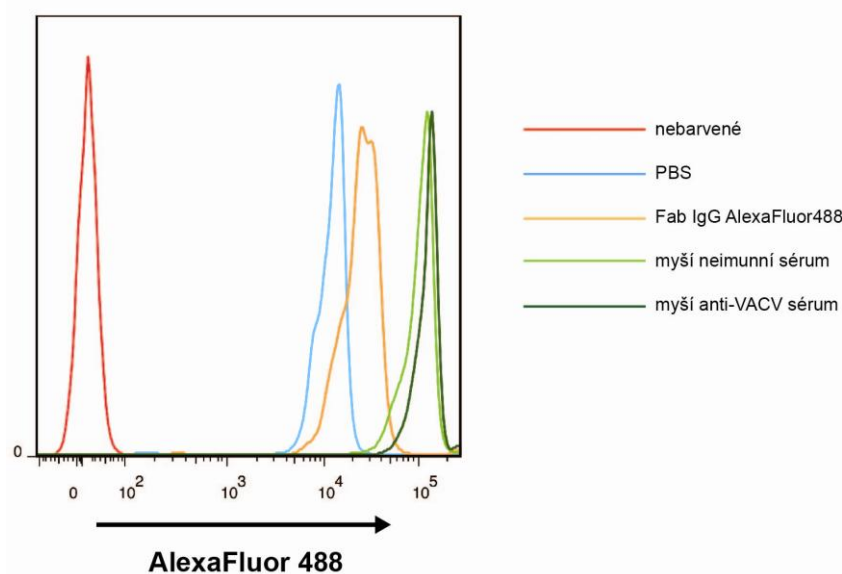
Adsorpci viru jsme stanovovali jako množství neadsorbovaných infekčních částic viru (PFU). Stejně jako v předešlém pokusu jsme infikovali buňky CV-1 viry P13-SigE7LAMP-TK a P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3. V daných intervalech jsme inokulum odsáli a následně titrací stanovili počet PFU. Každá zobrazená hodnota představuje aritmetický průměr pěti paralel  $\pm$  SD. Pro statistické vyhodnocení byl použit t-test. \* $p < 0,05$

### 5.1.7. Povrch virionů P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 obsahuje více fosfatidylserinu než povrch virionů P13-SigE7LAMP-TK

Pro bližší charakterizaci mechanismu, který by mohl být zodpovědný za lepší adsorpci viru P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 na buňky, jsme se rozhodli analyzovat strukturu virionu z hlediska obsahu PS. Jedním z mechanismů, které virus vakcinie využívá pro vstup do buňky je proces makropinocytózy, kdy virion vypadá jako apoptotické tělíčko – tzv. apoptotické mimikry.

Za tímto účelem jsme upravili metodu popsanou původně pro fluorescenční kvantitativní detekci virů HIV imobilizovaných na mikrokuličkách pokrytých protilátkami. V našem případě jsme použili její modifikovanou variantu pro detekci obsahu fosfatidylserinu ve virionech VACV. Při zavádění této metody jsme nejprve museli prokázat, že se na povrch mikrokuliček pokrytých proteinem G váže myší sérum. K mikrokuličkám jsme přidali buď neimunní myší sérum z neimunizovaných myší, nebo myší sérum neutralizující VACV. Pro vizualizaci

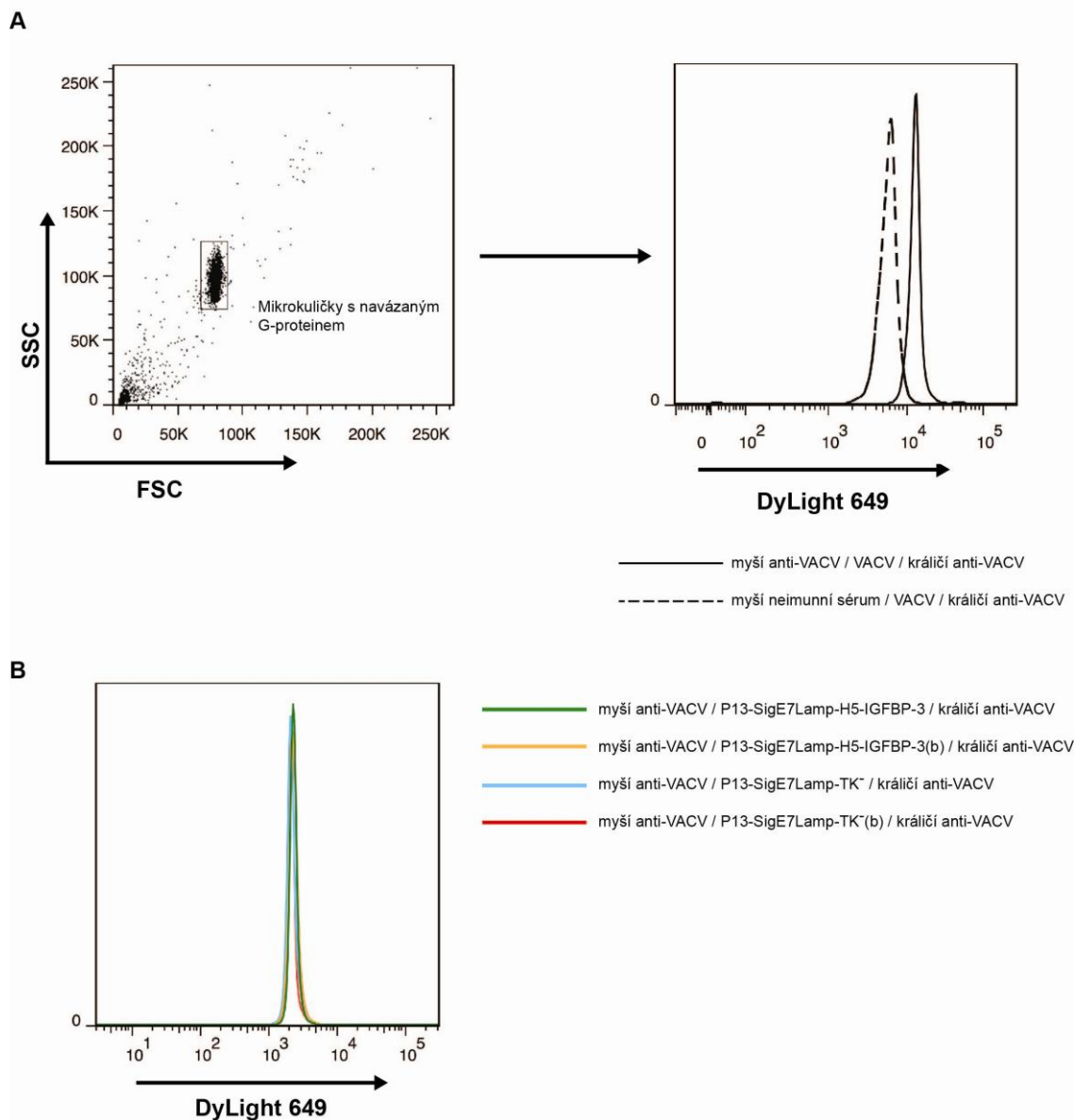
navázaného myšního séra jsme následně použili Fab fragment protilátky rozpoznávající myší imunoglobuliny (Ig) třídy IgG konjugovaný s flourochromem Alexa Fluor 488. Jak je patrné z obrázku 16, tak obě myší séra se stejnou měrou váží na mikrokuličky pokryté proteinem G.



**Obr. 16: Mikrokuličky pokryté G-proteinem váží myší sérum**

K mikrokuličkám pokrytým G-proteinem bylo přidáno neimunní myší sérum, anti-VACV mší sérum nebo PBS. Vazba myšního séra byla vizualizována pomocí IgG Fab fragmentu rozpoznávajícího myší IgG, který byl značen Alexa Fluor 488. Fluorescence byla měřena na průtokovém cytometru BD LSRFortessa

V další fázi jsme museli ověřit, zda se na imobilizované sérum na mikrokuličkách specificky váže virus vakcinie. Přidali jsme tedy ke kuličkám s navázaným neimunním či anti-VACV sérum viriony purifikované přes sacharózový gradient. Po jejich navázání jsme pak k jejich vizualizaci použili kombinaci králičího anti-VACV séra a sekundární protilátky rozpoznávající králičí Ig značené DyLight 649. Na základě tohoto experimentu se nám podařilo dokázat, že průměrná intenzita fluorescence je vyšší u mikrokuliček rozpoznávajících VACV než u kuliček pokrytých neimunním sérum (Obr. 17a). Abychom vyloučili, že případné pozorované rozdíly v obsahu PS jsou dány rozdílnou vazbou různých rekombinantních virů, pokus jsme zopakovali s různými rekombinantami. Ke kuličkám s imobilizovaným anti-VACV sérum jsme přidali suspenzi virionů virů P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3, P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3(b), P13-SigE7LAMP-TK<sup>-</sup> nebo P13-SigE7LAMP-TK<sup>-</sup>(b) přečištěných přes sacharózový gradient, které obsahovaly 50µg proteinů. Výsledek experimentu je zachycen na obrázku 17b a je z něj patrné, že se všechny viry váží na mikrokuličky se stejnou intenzitou.

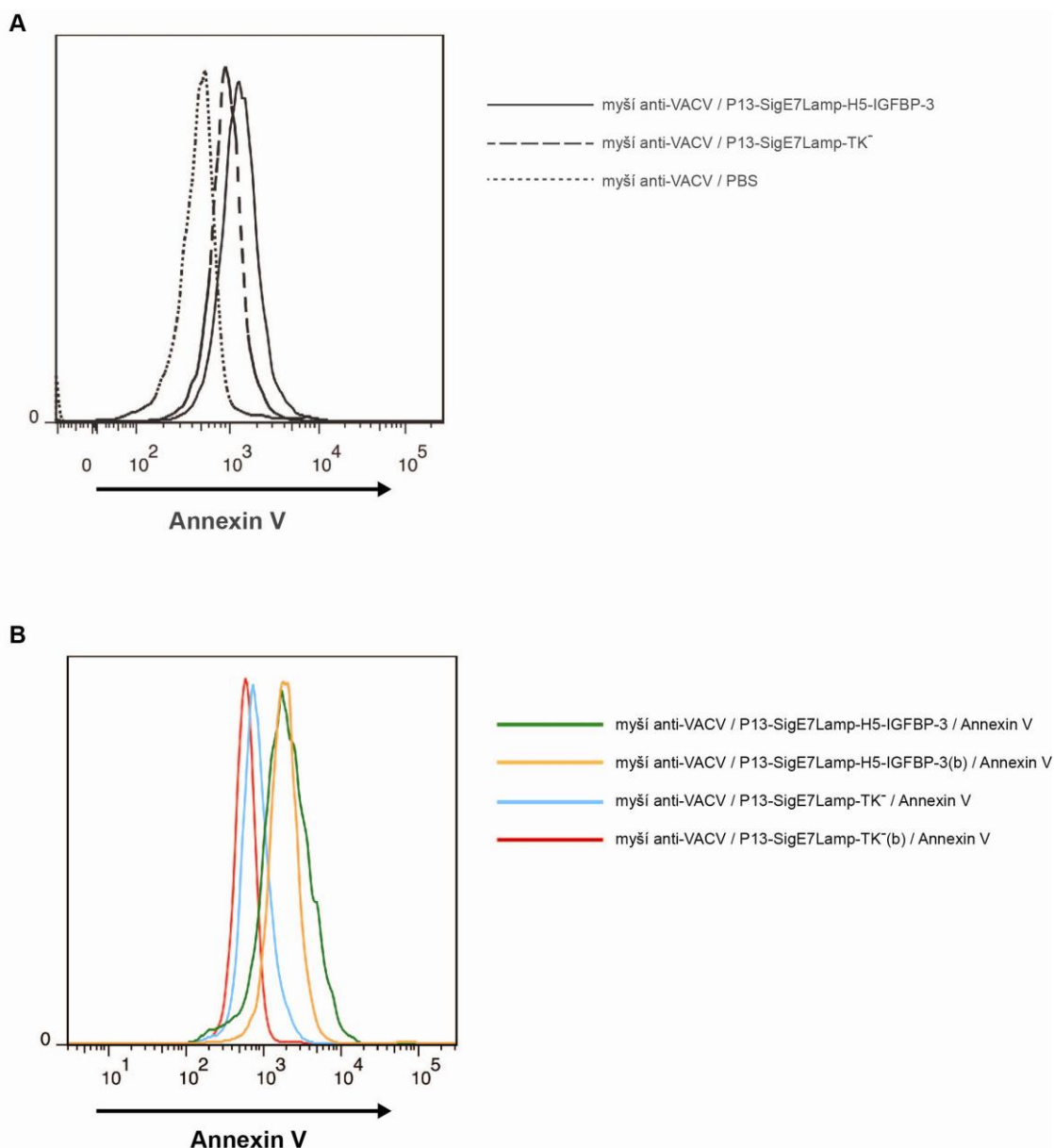


**Obr. 17: G-proteinové mikrokuličky s navázaným anti-VACV sérem váží virus vakcinie**

K mikrokuličkám s navázaným myším neimunním sérem nebo anti-VACV sérem byla přidána virová suspenze. Pro vizualizaci bylo použito králíčí anti-VACV sérum a oslí anti-králíčí protilátka značená DyLight 649 (A). K mikrokuličkám byla přidána suspenze virů P13-SigE7LAMP-TK<sup>-</sup>, P13-SigE7LAMP-TK<sup>(b)</sup>, P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 a P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3(b) a vizualizována pomocí králíčího anti-VACV séra a oslí anti-králíčí protilátky značené DyLigth 649 (B).

Nakonec jsme mohli přistoupit k analýze obsahu PS ve virionech rekombinantních virů. Za tímto účelem jsme navázali na mikrokuličky viriony viru P13-SigE7LAMP-TK<sup>-</sup>, P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 nebo PBS, následně je barvili Annexinem V konjugovaným s PE a poté změřili intenzitu fluorescence na průtokovém cytometru. Nejvyšší hodnotu fluorescence vykazovaly kuličky pokryté viriony P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3, která byla vyšší než fluorescence detekovaná na kuličkách s navázaným P13-SigE7LAMP-TK<sup>-</sup>

(Obr. 18A). Nejnižší intenzitu fluorescence jsme naměřili na kuličkách bez viru. Abychom pozorované rozdíly v obsahu PS potvrdili, experiment jsme zopakovali. Tentokrát jsme použili suspenze s nižším obsahem proteinů, 20  $\mu\text{g}$ , a zahrnuli jsme také nezávisle připravené sesterské P13-SigE7LAMP-TK<sup>(b)</sup> a P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3(b). Podařilo se nám potvrdit, že pozorované chování platí i pro nezávisle připravené sesterské viry a že obsah PS u virů P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 a P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3(b) je shodný (Obr. 18B).



**Obr. 18: Viriony viru P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 mají zvýšený obsah fosfatidylserinu**

Na mikrokuličky pokryté myšičím anti-VACV sérem byly navázány viry P13-SigE7LAMP-TK<sup>(b)</sup>, P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 nebo PBS a obarveny Annexinem V značeným PE (A). Pokus byl zopakován s nezávisle připravenými sesterskými viry P13-SigE7LAMP-TK<sup>(b)</sup> a P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3(b) (B). Intenzita fluorescence byla změřena pomocí průtokového cytometru LSRFortessa.

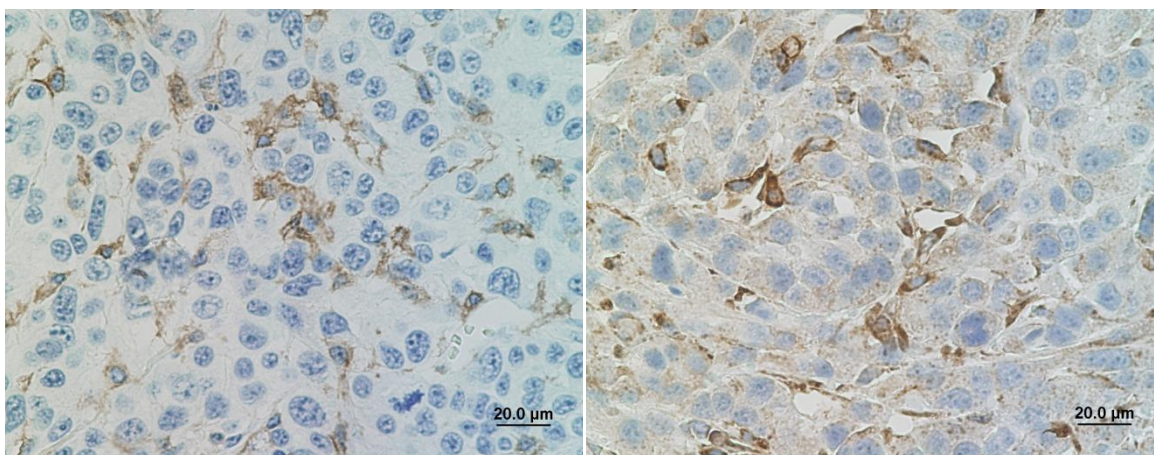
## 5.2. Ovlivnění nádorového mikroprostředí imunizací proti M2-polarizovaným makrofágům asociovaným s nádory

### 5.2.1. Nádory vyvolané buňkami MK16/ABC obsahují makrofágy

V první řadě bylo nutné zjistit, zda jsou nádory indukované buňkami MK16/ABC infiltrovány M2 polarizovanými makrofágy, které exprimují endopeptidázu legumain. Za tímto účelem jsme myšim subkutánně injikovali  $5 \times 10^5$  buněk MK16/ABC. Po té co nádory dorostly v nejdelším rozměru do velikosti 1 cm, jsme myši usmrtili a odebrali nádory. Ty jsme zafixovali v 10 % formalínovém pufru, zalili do parafínu a připravili histologické řezy. Připravené histologické řezy jsme obarvili krysí monoklonální protilátkou proti F4/80, abychom zobrazili makrofágy. Část vzorků jsme také barvili pomocí králičí polyklonální protilátky proti legumainu. Jak je vidět na obr. 19, tak se nám podařilo detekovat významnou infiltraci makrofágy. Část infiltrujících buněk produkuje také legumain. Histologie ovšem nemohla potvrdit, že se v případě buněk produkujících legumain jedná o makrofágy. Pro definitivní potvrzení jsme se rozhodli použít průtokovou cytometrii.

**F4/80**

**Legumain**

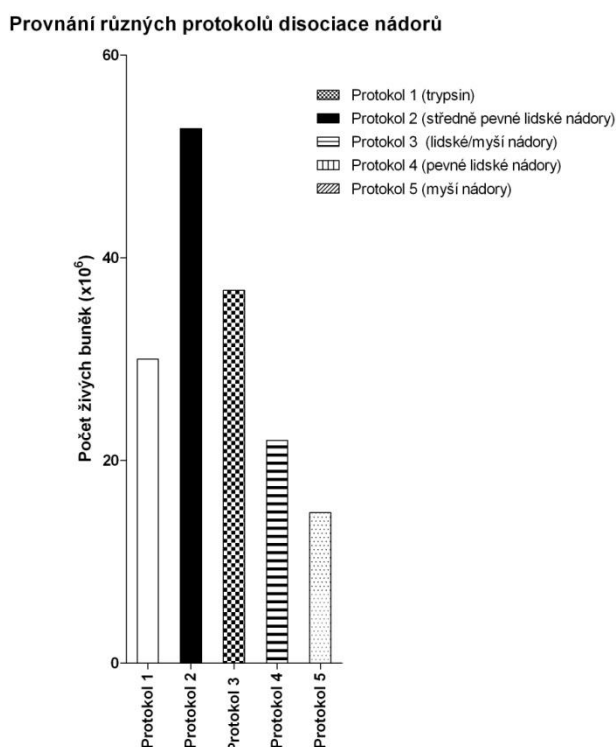


**Obr. 19: Nádory indukované MK16/ABC jsou infiltrovány makrofágy a buňkami produkujícími legumain**

Zobrazen je histologický řez z nádoru vyvolaného buňkami MK16/ABC, který byl obarven protilátkami proti F4/80 či legumainu.

## 5.2.2. Optimalizace postupu pro izolaci makrofágů pro průtokovou cytometrii

Pro přípravu jednobuněčné suspenze z nádorů jsme se rozhodli použít disociátor gentleMACS Octo, který umožňuje zpracovat více vzorků najednou. Bylo ovšem nutné vybrat správný protokol, který by dal nejvyšší výtěžek v podobě živých buněk. Rozhodli jsme se otestovat 5 protokolů, zahrnujících standardní protokoly od výrobce (<http://www.miltenyibiotec.com/en/support/resources/data-sheets-and-manuals/protocols.aspx>), protokol za použití trypsinu a hybridní protokol využívající postup pro izolaci lidských nádorů za použití programu pro disociaci myších nádorů (Tab.3). Z usmrcených myší jsme vyjmuli nádory, které jsme následně uchovávali na ledu v PBS. Nádory jsme následně rozřezali na kousky menší než 5 mm a k rozvolnění vložili do disociátoru pro použití jednoho z 5 protokolů. Po dokončení disociace jsme buňky stočili 10 min. při 300 g a 4°C. Buněčný pelet jsme resuspendovali v ACK pufru pro odstranění červených krvinek. Na konec jsme buňky ještě jednou stočili, ACK pufr odsáli a buňky resuspendovali ve vychlazeném PBS. Pro spočítání buněk a stanovení životnosti jsme použili ViCell XR. Zjistili jsme, že z hlediska počtu izolovaných buněk je nejlepší protokol na izolaci středně pevných lidských nádorů, pomocí kterého jsme získali  $52,7 \times 10^6$  buněk (Obr. 20).



**Obr. 20.: Porovnání různých protokolů pro disociaci nádorů MK16/ABC**

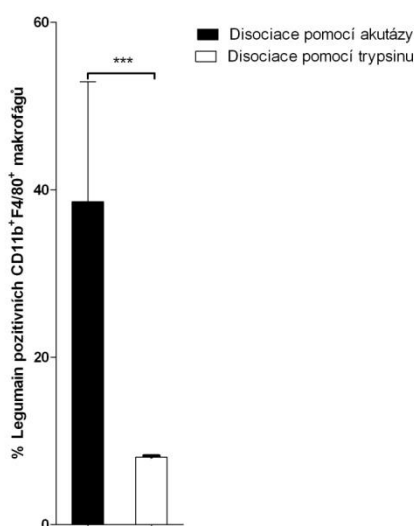
Pro podrobnosti k jednotlivým protokolům viz. Tab.3. Na grafu je znázorněn počet živých buněk.

Tabulka 3: Protokoly pro disociaci nádorů MK16

1. Disociace pomocí trypsinu	<p>a) Ke kouskům nádorové tkáně bylo přidáno 5 ml Trypsinu.            b) Následně byl 2x spuštěn program m_impTumor_03.            c) Poté byly buňky rozvolněné trypsinem přemístěny do 50 ml zkumavky s 25 ml D-MEM s 10% FBS.            Ke zbylé nádorové tkáni bylo přidáno 5 ml čerstvého trypsinu a následovalo opakování bodu b) – c). Procedura byla opakována celkem 4x</p>
2. Disociace středně pevných lidských nádorů	<p>a) Ke kouskům nádorové tkáně bylo přidáno 5 ml Akutázy.            b) Byl spuštěn program h_tumor_01.            c) Po doběhnutí programu byl nádor umístěn na 30 min. na 37°C            d) Následoval program h_tumor_02            e) 37°C po dobu 30 min.            f) Následoval 2x program h_tumor_02            g) Buňky byly přefiltrovány přes autoklávovatelnou kovovou mřížku do 50 ml zkumavky. Zbytky nádoru na mřížce byly propláchnuty 2 ml PBS            h) K buňkám ve zkumavce bylo přidáno 5 ml média D-MEM s 10% FBS.</p>
3. Disociace lidských nádorů s využitím myšího programu	<p>a) Ke kouskům nádorové tkáně bylo přidáno 5 ml Akutázy.            b) Byl spuštěn program m_impTumor_01.            c) Po doběhnutí programu byl nádor umístěn na 30 min. na 37°C            d) Následoval program m_impTumor_02            e) 37°C po dobu 30 min.            f) Následoval 2x program m_impTumor_02            g) Buňky byly přefiltrovány přes autoklávovatelnou kovovou mřížku do 50 ml zkumavky. Zbytky nádoru na mřížce byly propláchnuty 2 ml PBS            h) K buňkám ve zkumavce bylo přidáno 5 ml média D-MEM s 10% FBS.</p>
4. Disociace pevných lidských nádorů	<p>a) Ke kouskům nádorové tkáně přidáno 5 ml Akutázy.            b) Byl spuštěn program h_tumor_01.            c) Po doběhnutí programu byl nádor umístěn na 30 min. na 37°C            d) Následoval program h_tumor_01            e) 37°C po dobu 30 min.            f) Následoval 2x program h_tumor_01            g) Buňky byly přefiltrovány přes autoklávovatelnou kovovou mřížku do 50 ml zkumavky. Zbytky nádoru na mřížce byly propláchnuty 2 ml PBS            h) K buňkám ve zkumavce bylo přidáno 5 ml média D-MEM s 10% FBS</p>
5. Disociace myších nádorů	<p>a) Ke kouskům nádorové tkáně bylo přidáno 5 ml Akutázy.            b) Byl spuštěn program m_impTumor_02.            c) Po doběhnutí programu byl nádor umístěn na 30 min. na 37°C            d) Následoval program m_impTumor_03            e) 37°C po dobu 30 min.            f) Následoval 2x program m_impTumor_03            g) Buňky byly přefiltrovány přes autoklávovatelnou kovovou mřížku do 50 ml zkumavky. Zbytky nádoru na mřížce byly propláchnuty 2 ml PBS            h) K buňkám ve zkumavce bylo přidáno 5 ml média D-MEM s 10% FBS.</p>

Následně nás zajímalo, zda je možné v protokolu pro rozvolňování středně pevných lidských nádorů nahradit akutázu za dostupnější trypsin a jak toto ovlivní množství izolovaných makrofágů produkujících legumain. Je totiž známo, že trypsin může být vysoce agresivní a při delším působení zlyžovat buňky, popřípadě degradovat jejich povrchové antigeny. Vyjmuli jsme z myší (n=3) nádory, které jsme rozpůlili a připravili z nich jednobuněčné suspenze protokolem 2 za použití akutázy nebo trypsinu. Získané buněčné suspenze jsme následně barvili monoklonálními protilátkami proti povrchovým molekulám makrofágů, konkrétně CD11b a F4/80. Expresi legumainu jsme následně stanovovali pomocí polyklonální protilátky proti legumainu. Výsledné měření pomocí průtokového cytometru ukázalo, že při použití akutázy jsme schopni izolovat signifikantně více (\*\*p=0,0004) makrofágů exprimujících legumain než v případě použití trypsinu (Obr. 21).

Provnání použití aktuázy a trypsinu při izolaci makrofágů z nádorů



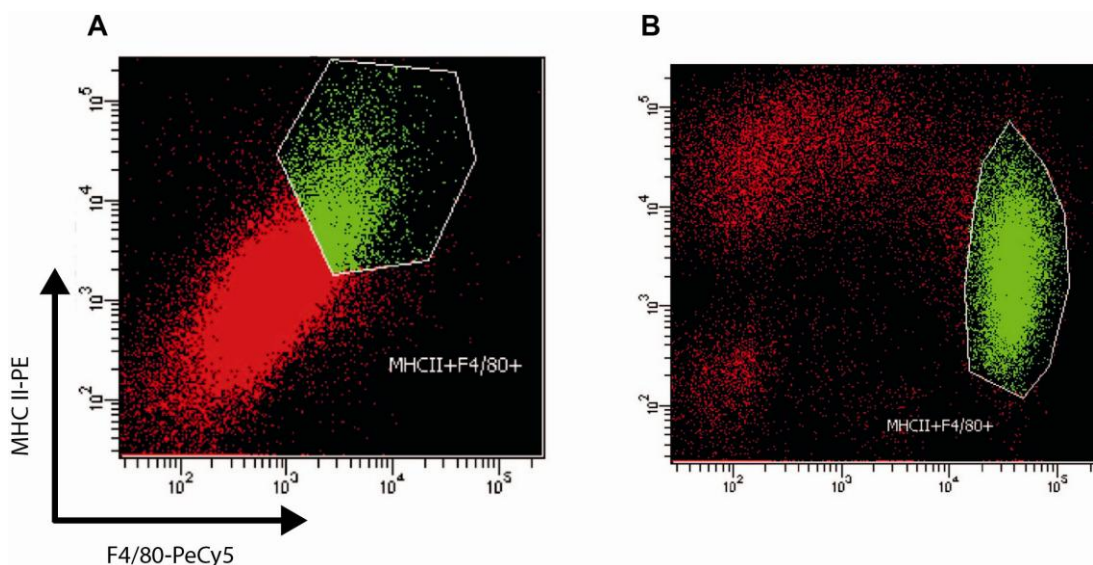
**Obr. 21: Použití akutázy při disociaci nádorů umožňuje izolaci většího množství makrofágů exprimujících legumain.**

Pomocí akutázy nebo trypsinu byla z nádorů připravena jednobuněčná suspenze. Množství legumain exprimujících makrofágů bylo stanoveno pomocí průtokového cytometru. Na grafu jsou znázorněny aritmetické průměry  $\pm$ SD. Pro hodnocení statistické signifikance byl použit t-test. \*\*\*p < 0,001

### 5.2.3. Výběr panelu protilátek pro detekci makrofágů

Abychom mohli použít průtokovou cytometrii pro identifikaci M2 polarizovaných makrofágů asociovaných s nádory, bylo třeba navrhnout sadu protilátek pro jejich identifikaci. Celkem jsme se rozhodovali mezi dvěma variantami. První z nich byla založena na definici makrofágů na základě znaků F4/80 a MHC II. třídy, kdy jsme použili krysí monoklonální protilátku proti F4/80 značenou PeCy5 a protilátku proti MHC II. třídy značenou PE. Optimalizovaným postupem jsme z nádorů připravili jednobuněčnou suspenzi, kterou jsme

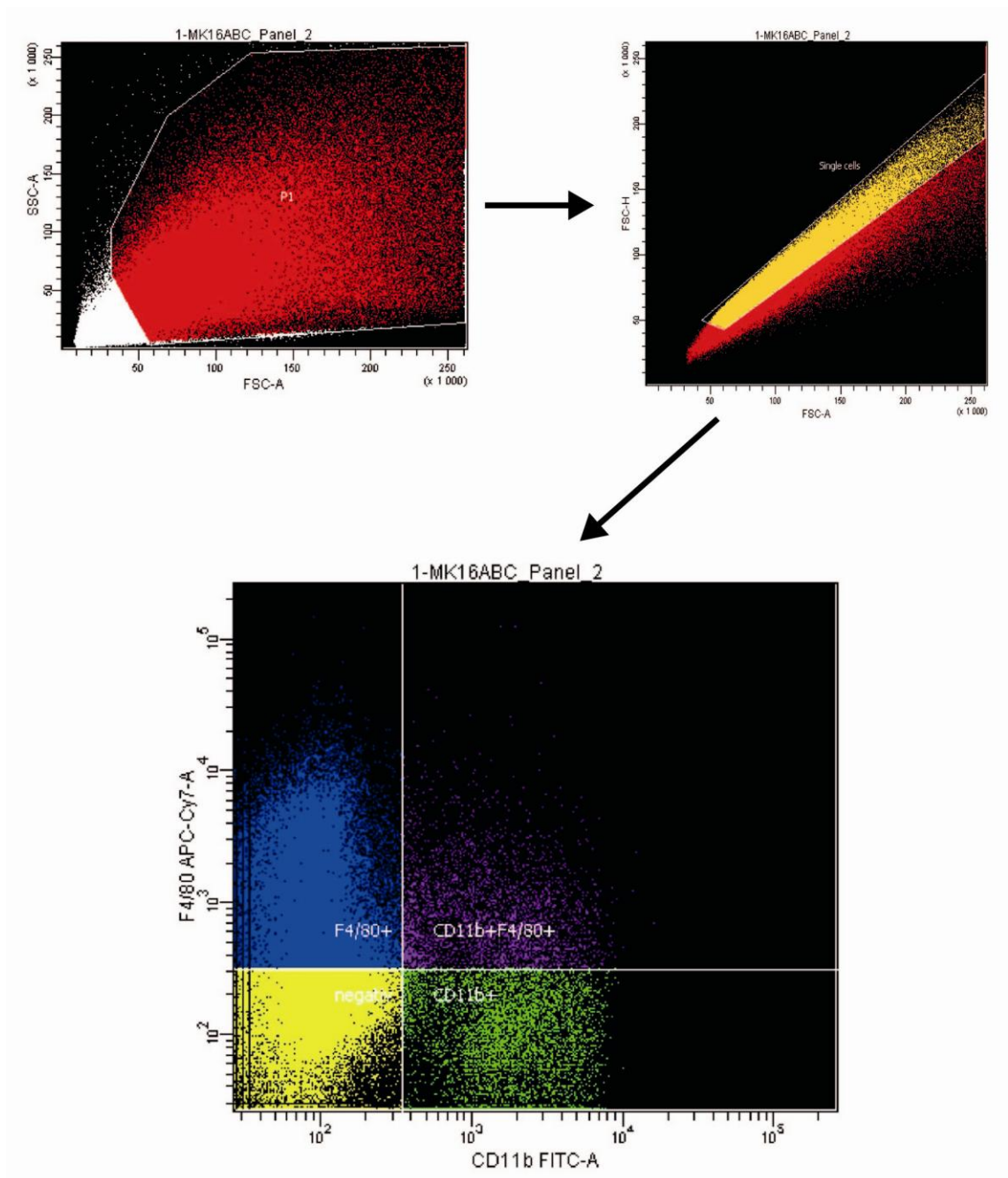
obarvili výše zmíněným panelem. Pro analýzu přítomnosti makrofágů, jsme použili průtokový cytometr LSRFortessa a software FACSDiva 6.0 (BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA). Zjistili jsme, že kombinace F4/80 a MHC II. třídy nevyděljuje populaci makrofágů, ale vytváří kontinuum od F4/80 a MHCII negativních buněk k buňkám pozitivním (Obr. 22A). Abychom vyloučili, že pozorování není dáno chybou v postupu barvení nebo špatnou protilátkou, barvení jsme zopakovali. Při opakování jsme u myši nesoucí nádor provedli po usmrcení výplach peritonea 5 ml PBS se 3% FBS a získali peritoneální makrofágy. Jak je vidět na obrázku 22B, tak barvení peritoneálních makrofágů vyčlenilo populaci, kterou můžeme považovat za makrofágy. Oproti tomu barvení makrofágů izolovaných z nádorů opět přineslo stejný výsledek, jako je na obrázku 22A. Toto by mohlo souviset se značnou variabilitou exprese MHC II. třídy na makrofázích, kterou naznačuje i výsledek získaný z peritoneálních makrofágů, u nichž můžeme pozorovat fenotyp přecházející do MHC II<sup>low</sup> až po MHC II<sup>hi</sup>. Navíc může být exprese MHC II u M2 polarizovaných makrofágů snížena. Rozhodli jsme proto makrofágy identifikovat jiným způsobem.



**Obr. 22: Použití detekčního panelu 1 neumožňuje jasně odlišit populaci makrofágů**

Makrofágy byly izolovány z nádorů vyvolaných MK16/ABC (A) nebo z peritonea (B) a obarveny protilátkami proti F4/80 a MHCII.

Přistoupili jsme k testování druhého panelu, který definuje makrofágy jako buňky pozitivní na CD11b a F4/80. Pro barvení 10<sup>6</sup> buněk jsme použili 100 ng protilátky proti CD11b značené FITC a 200 ng protilátky proti F4/80 značené eFluor780. Pro barvení legumainu jsme použili kombinaci 200 ng králičí polyklonální protilátky proti legumainu nebo izotypové kontroly a 200 ng sekundární protilátky značené Alexa fluor 546. Na rozdíl od prvního panelu jsme v tomto případě získali populaci CD11b<sup>+</sup> buněk, jejíž část exprimuje F4/80 a představuje makrofágy. (Obr. 23).

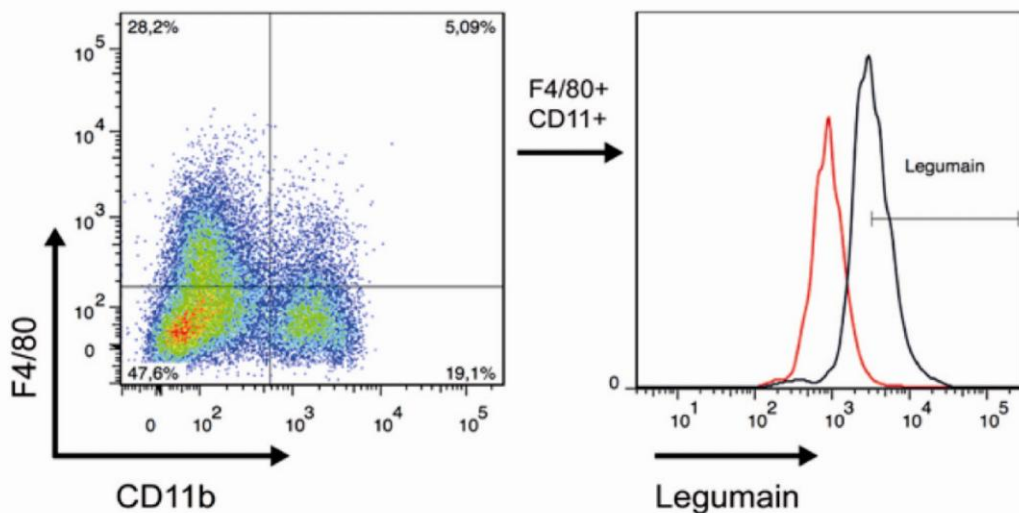


**Obr. 23: Panel 2 umožňuje odlišit makrofágy asociované s nádory**

Makrofágy izolované z nádorů vyvolaných buňkami MK16/ABC byly obarveny pomocí F4/80 a CD11b. Na obrázku je zachycena strategie výběru populace, kdy je nejprve pomocí FSC a SSC vybrána populace buněk, pomocí FSC-H a FSC-A jsou vybrány jednotlivé buňky a následně je vynesena exprese F4/80 proti CD11b. Makrofágy jsou pak určeny jako CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>

## 5.2.4. Nádory MK16/ABC obsahují makrofágy exprimující legumain

Poté, co jsme vybrali optimální panel detekčních protilátek, nás zajímalo jaké procento makrofágů izolovaných z nádorů exprimuje legumain. Skupině myši (n=6) jsme injikovali  $5 \times 10^5$  buněk MK16/ABC stejně jako při přípravě histologických preparátů. Jakmile vzniklé nádory dosáhly v nejdelším rozměru 1 cm, myši jsme usmrtili a vyjmuli nádory. Tyto jsme následně rozvolnili na gentleMACS Octo a obarvili na CD11b, F4/80 a legumain. Zjistili jsme, že zhruba 48% všech makrofágů v nádorech exprimuje legumain (Obr. 24).



Obr. 24: Nádory MK16/ABC obsahují infiltrující makrofágy exprimující Legumain

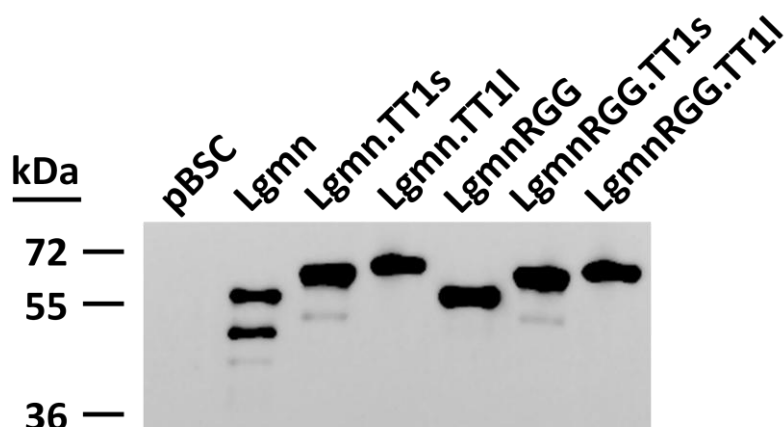
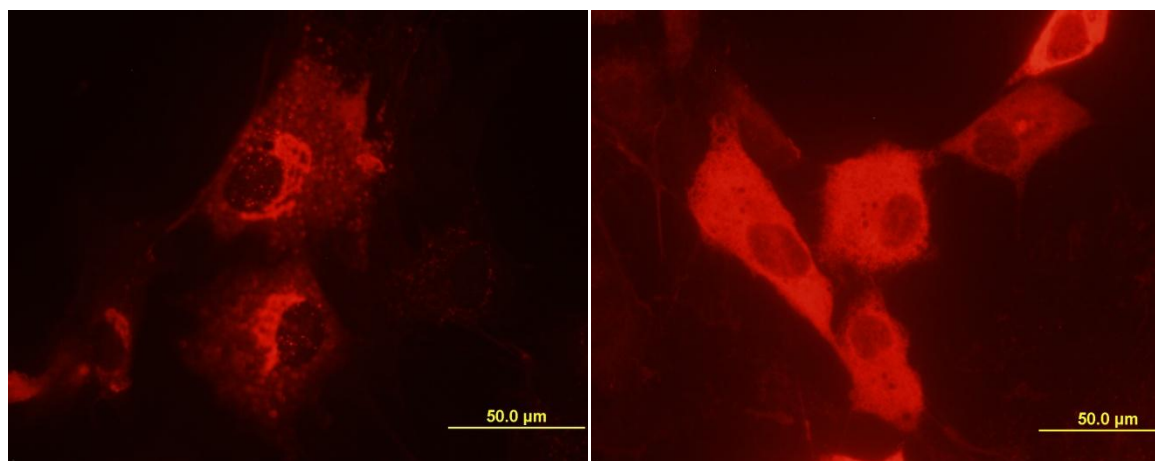
Z nádorů byla pomocí disociátoru a enzymu akutázy připravena jednobuněčná suspenze a analyzována průtokovou cytometrií. Makrofágy byly detekovány pomocí průtokového cytometru jako CD11+F4/80+ buňky, jako kontrola barvení legumainu byla použita izotypová kontrola představující červenou linii na histogramu.

## 5.2.5. Modifikace aminokyselinové sekvence legumainu

### snížují jeho stabilitu a mění buněčnou lokalizaci

Imunizace proti tělu vlastním proteinům je spojena s celou řadou problémů. Jedná se především o výskyt tolerogenních mechanismů, které brání vzniku autoimunitních onemocnění, a přispívají k nízké imunogenosti vlastních proteinů. Pro zvýšení imunogenosti jsme se rozhodli provést 3 druhy modifikací. Zaprvé, modifikace měnící stabilitu proteinu a zvyšující tím tvorbu peptidů v proteozomu, které mohou být prezentovány na molekulách MHC. Zadruhé, modifikace, které mění lokalizaci daného antigenu v buňce, čímž rovněž mohou přispívat k degradaci a k prezentaci peptidů na MHC. Posledním druhem modifikace je zvýšení schopnosti aktivovat pomocné  $CD4^+$  T-lymfocyty ( $T_H$ ) za využití tzv. pomocných epitopů.

Jako cíl pro modifikaci snižující stabilitu jsme vybrali RGD motiv, který se v genu pro legumain nachází. Bylo pozorováno, že mutace v tomto motivu mění lokalizaci a stabilitu PC-1 (Lusson *et al.*, 1997; Rovere *et al.*, 1999). Motiv RGD jsme pomocí cílené mutagenese změnili na motiv CGD (gen ozn. LgmnCGD) nebo RGG (gen ozn. LgmnRGG). Takto upravenými geny vloženými do expresního plazmidu pBSC jsme nejprve metodou kalcium-fosfátové precipitace transfekovali buňky 293T. Po 2 dnech kultivace při 37°C jsme buňky opláchli, zlyzovali smícháním s Laemmliho pufrem. Lyzáty jsme následně separovali na 10% SDS-PAGE gelu a nakonec metodou western-blot přenesli na PVDF membránu. Pro vizualizaci jsme použili kombinace králičí protilátky proti legumainu a sekundární anti-králičí protilátky konjugované s peroxidázou. Legumain je produkován jako pro-protein o molekulární hmotnosti 56 kDa. Autokatalytickým štěpením vzniká aktivní 46 kDa forma. Dalším proteolytickým štěpením může vzniknout ještě menší forma o molekulární hmotnosti 36 kDa, která se ovšem svou enzymatickou aktivitou neliší od 46 kDa (Chen *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2000). Jak je patrné z obrázku 25A, tak v buňkách transfekovaných konstruktem LgmnRGG, je detekovatelný pouze nematurovaný legumain o velikosti 56 kDa. Změna v RGD motivu tedy vede ke snížení maturace legumainu. Abychom ověřili, zda změna RGD motivu ovlivňuje také distribuci proteinu v buňce, transfekovali jsme pomocí Lipofektaminu buňky 3T3 genovými konstrukty. Po 2 dnech od transfekce jsme buňky zafixovali ve 4 % paraformaldehydu, permeabilizovali a následně barvili. Pro barvení jsme opět použili králičí protilátku proti legumainu, ale jako sekundární protilátku jsme tentokrát použili kozí protilátku proti králičímu IgG konjugovanou s Alexa Fluor 546. Takto připravené konstrukty jsme studovali pomocí fluorescenčního mikroskopu. Zjistili jsme, že změna RGD motivu na RGG je spojena se změnou v buněčné lokalizaci, kdy nematurovaný legumain na rozdíl od LgmnRGG lokalizuje především do endoplazmatického retikula (Obr. 25B.).

**A****B****Lgmn****LgmnRGG****Obr. 25: Modifikace genu pro legumain snižuje maturaci a mění buněčnou lokalizaci**

Buňky 293T byly transfekovány expresními plazmidy nesoucími modifikované geny pro legumain. Po 2 dnech byly buňky zlyzovány a byl proveden western-blot. Membrána byla obarvena králičí polyklonální protilátkou proti legumainu (A). Buňky 3T3 byly transfekovány expresním plazmidem, po 2 dnech zafixovány ve 4% paraformaldehydu a obarveny králičí protilátkou proti legumainu. K vizualizaci na fluorescenčním mikroskopu byla použita sekundární protilátka značená AlexaFluor 546 (B).

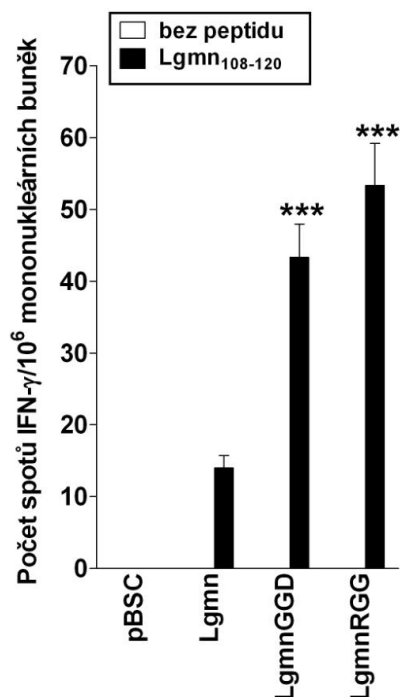
Druhou modifikací, kterou jsme provedli, bylo vložení pomocného epitopu p30 odvozeného od tetanového toxinu (aa947-967) do genu pro legumain. Epitop p30 představuje univerzální pomocný epitop jehož flexibilní segment umožňuje vazbu na molekuly MHC II. Cílem této modifikace bylo zlomit toleranci proti tělu vlastním proteinům aktivací CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub> lymfocytů. Gen pro legumain jsme modifikovali buď vložím samotného epitopu p30 (ozn. Lgmn.TT1s) nebo jeho delší varianty TT1l (aa936-975, ozn. Lgmn.TT1l). Obě formy epitopu jsme vkládali do restričního místa rozpoznávaného restriktázou HindIII a to jak do genu pro Lgmn, tak do modifikované varianty LgmnRGG. I v případě těchto konstruktů jsme testovali, zda dochází ke změně v procesu maturace stejně jako v případě modifikace RGG. I

zde jsme pozorovali, že přidání TT1s i TT1l, blokuje vznik maturovaného legumainu o velikosti 46 kDa (Obr. 25A).

## 5.2.6. Modifikace genu pro legumain zvyšují jeho imunogennost

Abychom stanovili, zda námi provedené modifikace genu pro legumain opravdu zvyšují jeho imunogennost, imunizovali jsme samice myšího kmene C57BL/6 pomocí genové pistole 2 dávkami připravené DNA vakcíny, o celkovém množství 2  $\mu$ g DNA, 3 krát v 1 týdenních intervalech. Týden po podání poslední dávky DNA jsme myším odebrali sleziny, izolovali splenocyty a následně jsme detekovali imunitní odpověď na základě produkce IFN- $\gamma$  metodou ELISPOT. Ke stimulaci splenocytů jsme použili 10  $\mu$ g/ml peptidu Lgmn<sub>108-120</sub> (EDVTPENFLAVLR), který jsme vybrali na základě *in silico* predikce jeho vazby na MHC I. třídy a to jak alely H-2<sup>b</sup> tak H-2<sup>d</sup>.

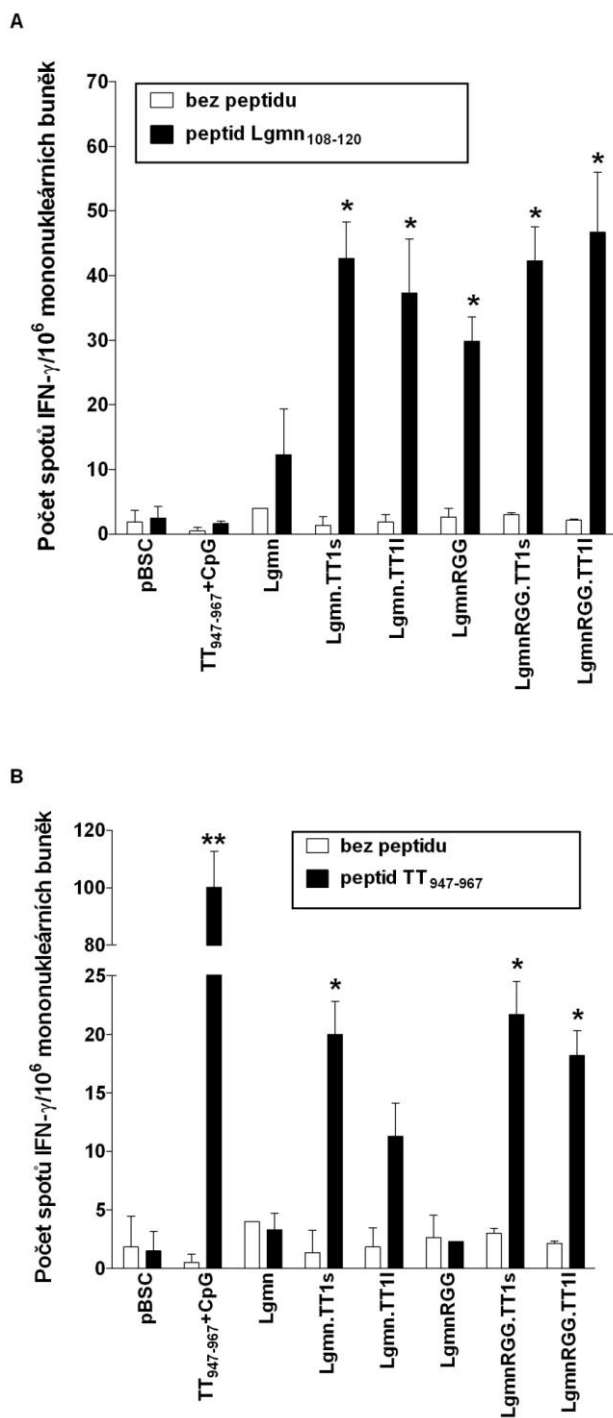
Zjistili jsme, že obě modifikace RGD motivu statisticky signifikantně zvyšují imunogennost legumainu, ovšem modifikace GGD a RGG se svou imunogenností příliš neliší (Obr. 26).



**Obr. 26: Modifikace RGD motivu v genu pro legumain zvyšuje imunitní odpověď proti predikovanému epitopu Lgmn<sub>108-120</sub>.**

Ze slezin myší imunizovaných DNA vakcínami byly vyizolovány splenocyty, které byly použity pro stanovení počtu IFN- $\gamma$  produkujících buněk metodou ELISPOT. Na grafu jsou znázorněny aritmetické průměry  $\pm$  SD. Pro statistické vyhodnocení byl použit t-test. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001

V dalším kroku nás zajímalo, zda vložení TT1s a TT1l také způsobí zvýšení imunogenosti. Zajímalo nás také, zda kombinace TT1s či TT1l s modifikací RGD bude působit synergicky na další zvýšení imunogenosti. Zopakovali jsme tedy imunizační experiment, ale tentokrát jsme myši imunizovali pBSC bez inzertu, peptidem TT<sub>947-967</sub> spolu s ODN CpG, Lgmn, Lgmn.TT1s, LgmnTT1l, LgmnRGG, LgmnRGG.TT1s, LgmnRGG.TT1l. Ukázalo se, že i v případě modifikace genu pro legumain inzercí TT1s nebo TT1l epitopu došlo k významnému zvýšení imunitní odpovědi v porovnání s nemodifikovaným genem (Obr. 27A). Kombinace modifikace RGD epitopu na RGG společně s inzercí pomocného epitopu TT1s nebo TT1l sice přinesla menší zvýšení imunogenosti, ale toto zvýšení nebylo statisticky významné. Dále se co do síly pozorované imunitní odpovědi od sebe nelišily konstrukty s kratším TT1s od konstruktů s delším TT1l. Žádný rozdíl nebyl pozorovatelný mezi konstrukty LgmnRGG.TT1s a LgmnRGGTT1l v porovnání s konstrukty Lgmn.TT1s resp. LgmnTT1l. Provedli jsme také testování imunitní odpovědi proti pomocnému epitopu TT, kdy jsme izolované splenocyty stimulovali peptidem odvozeným z epitopu p30 (TT<sub>947</sub>-TT<sub>967</sub>). Imunitní odpověď, kterou jsme v tomto případě detekovali pomocí metody ELISPOT, byla pro všechny konstrukty nesoucí epitop p30, ať už v kratší nebo delší formě, stejná (obr. 27B). Dále jsme vyzkoušeli, že imunitní odpověď proti epitopu TT je u všech 4 konstruktů o mnoho slabší, než odpověď detekovaná u myši imunizovaných peptidem TT<sub>947-967</sub> v kombinaci s imunostimulačním motivem CpG.

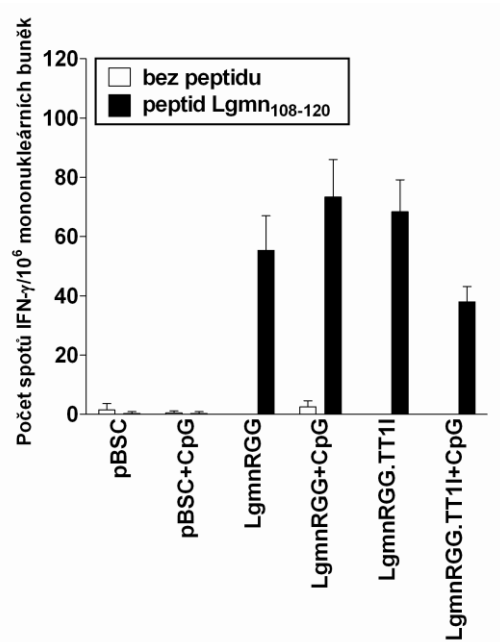


**Obr. 27:** Inzerce epitopu p30 do genu pro legumain zvyšuje jeho imunogenost, ale kombinace s mutací v RGD motivu již další zvýšení nepřináší. Imunitní odpověď proti epitopu p30 je u fúzních genů nižší než imunizace peptidem v kombinaci s ODN CpG.

Ze slezin imunizovaných myši byly vyizolovány splenocyty, které byly přes noc stimulovány peptidem Lgmn<sub>108-120</sub> (A) nebo peptidem TT<sub>947-967</sub> (B). Po stimulaci byl pomocí metody ELISPOT stanoven počet IFN- $\gamma$  produkujících buněk. Na grafu jsou znázorněny aritmetické průměry  $\pm$  SD. Pro statistické vyhodnocení byl použit t-test. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$

### 5.2.7. Vliv podání CpG na sílu indukované CTL odpovědi

Imunizace DNA vakcínami biolisticou metodou může aktivovat jak  $T_H1$ , tak  $T_H2$  typ adaptivní imunitní odpovědi. Zatímco  $T_H2$  odpověď podporuje spíše produkci protilátek a je asociována s agresivnějšími nádory,  $T_H1$  odpověď je asociována s regresí nádorů a podporuje indukci protinádorových  $CD8^+$  CTL, které navíc pomáhá chránit před funkčním vyčerpáním. Abychom zjistili jestli CpG povede k posílení  $CD8^+$  CTL, injikovali jsme části myši v den vakcinace intraperitoneálně CpG ODN. Zjistili jsme, že přidání CpG ODN neovlivnilo produkci  $IFN-\gamma$  legumain specifickými  $CD8^+$  lymfocyty (Obr. 28).



**Obr. 28:** IP podání CpG nevede k posílení  $T_H1$  odpovědi

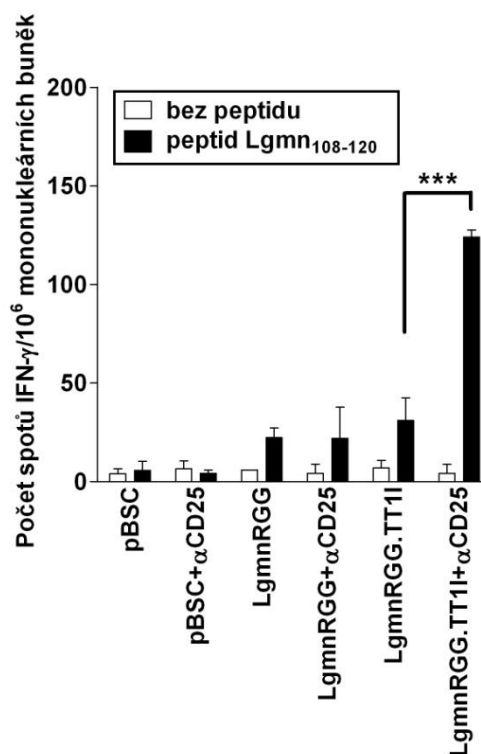
Zopakovali jsme imunizační experiment stejně jako v předchozích případech, ale tentokrát jsme části myši intraperitoneálně (IP) podali 50  $\mu$ g CpG ODN. Týden po poslední imunizaci jsme provedli ELISPOT, ve kterém jsme stanovili počet  $IFN-\gamma$  produkujících buněk. Na grafu jsou znázorněny aritmetické průměry  $\pm$  SD. Pro statistické vyhodnocení byl použit t-test.

### 5.2.8. Deplece Treg anti-CD25 protilátkou zvyšuje imunitní odpověď indukovanou konstrukty nesoucími epitop p30

Imunizace proti tělu vlastním autoantigenům je často ztěžována v důsledku udržování periferní tolerance Treg. Jejich deplece před vakcinací pomocí anti-CD25 protilátky PC61 může vést ke zlomení tolerance a také ke zvýšení imunitní odpovědi  $CD8^+$  T-lymfocytů, příp. zvýšení avidity odpovídajících  $CD8^+$  T-lymfocytů. Z tohoto důvodu jsme se pokusili posílit indukovanou imunitní odpověď deplecí Treg. Opakovali jsme tedy imunizační experiment, tentokrát jsme ovšem části myši podali 4 dny před imunizací 200  $\mu$ g PC61 anti-CD25

protilátky. V kontrolních myších byl třetí den po podání protilátky detekovatelný úbytek  $CD4^+CD25^+$  T-lymfocytů o více než 70%.

Deplece Treg vedla v tomto případě k signifikantnímu posílení imunitní odpovědi proti legumainu u myší imunizovaných modifikovaným genem LgmnRGG.TT11 (Obr. 29). Naopak v případě imunizace konstruktem LgmnRGG podání anti-CD25 protilátky žádný efekt nemělo.

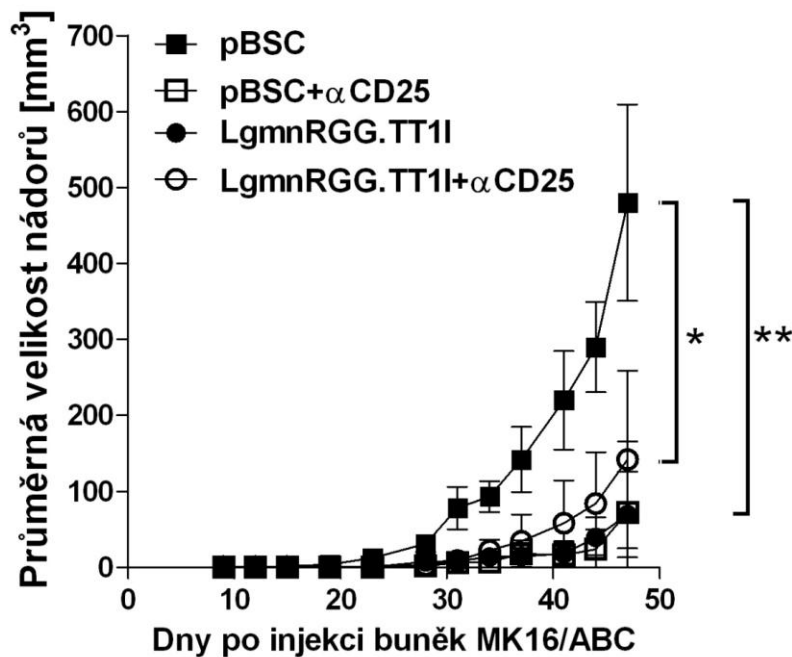


**Obr. 29: Deplece Treg posiluje indukcí  $T_H1$  odpovědi konstrukty s TT11 epitopem**

Při tomto opakování imunizačního experimentu jsme části myši 4 dny před imunizací intraperitoneálně (IP) podali 200  $\mu$ g protilátky proti CD25. Pomocí metody ELISPOT jsme stanovili počet buněk produkujících IFN- $\gamma$ . Na grafu jsou znázorněny aritmetické průměry  $\pm$  SD. Pro statistické vyhodnocení byl použit t-test. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$

## 5.2.9. Imunizace proti legumainu inhibuje růst nádorů indukovaných buňkami MK16/ABC

Na konec jsme se rozhodli otestovat, zda jsou námi připravené DNA vakcíny schopny ovlivnit růst nádorů. Imunizovali jsme tedy myši DNA vakcínou nesoucí gen LgmnRGG.TT11. Na základě analýzy imunitní odpovědi, jsme také u jedné skupiny myši přistoupili ke kombinaci deplece Treg a následné imunizaci. Týden po poslední imunizaci jsme myším injikovali  $5 \times 10^5$  buněk. Růst nádorů jsme pak monitorovali 2 $\times$  týdně. Zjistili jsme, že imunizace proti legumainu signifikantně snížila růst nádorů (Obr. 30). Stejněho výsledku jsme dosáhli i díky depleci Treg. Kombinace deplece Treg a následné imunizace již k inhibici růstu dále nepřispěla.

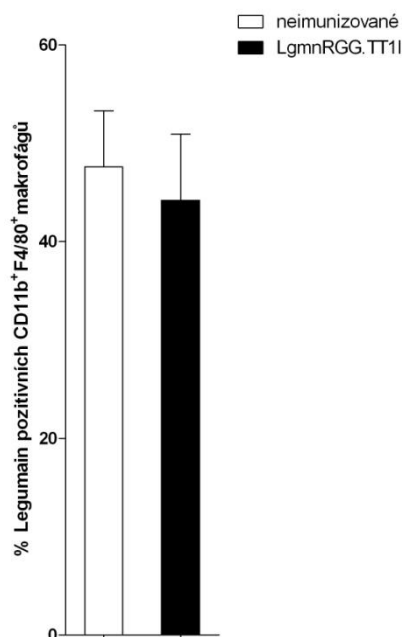


**Obr. 30: Imunizace DNA vakcínou nesoucí modifikovaný gen LgmnRGG.TT11 inhibuje růst nádorů**

Zopakovali jsme imunizační experiment, ale tentokrát jsme části myši před imunizací podali protilátku proti CD25. Týden po poslední imunizaci jsme myším subkutánně injikovali  $5 \times 10^5$  buněk MK16/ABC. Růst nádorů jsme monitorovali dvakrát týdně. Na grafu jsou znázorněny aritmetické průměry  $\pm$  SD. Pro statistické vyhodnocení byla použita dvoucestná ANOVA. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$

## 5.2.10. Imunizace proti legumainu neovlivňuje množství makrofágů asociovaných s nádory

Abychom zjistili, zda imunizace proti legumainu ovlivňuje množství makrofágů asociovaných s nádory, imunizovali jsme myši ( $n=6$ ) DNA vakcínou LgmnRGG.TT11. Týden po poslední imunizaci jsme myším injikovali MK16/ABC a čekali, až indukované nádory dorostou v nejdelším rozměru velikosti 1 cm. Myši s takovými nádory jsme usmrtili, nádory rozvolnili pomocí disociátoru a barvili pomocí detekčního panelu na přítomnost makrofágů exprimujících legumain. Zjistili jsme, že imunizace nemá vliv na zastoupení legumain exprimujících makrofágů (Obr. 31).



**Obr. 31: Imunizace proti legumainu neovlivňuje množství makrofágů asociovaných s nádory exprimujícími legumain.**

Neimunizovaným a imunizovaným myším jsme injikovali buňky MK16/ABC. Poté, co nádory dosáhly velikosti 1 cm v nejdelším rozměru, jsme je vyjmuli a analyzovali infiltraci makrofágů exprimující legumain.

### 5.2.11. Růst metastáz u myší imunizovaných proti legumainu

Makrofágy asociované s nádory se podílejí na tvorbě metastáz. Bylo rovněž pozorováno, že buňky MK16/ABC jsou schopny spontánně metastazovat do plic a orgánů. Rozhodli jsme se tedy ověřit, zda je imunizace proti legumainu schopna ovlivnit tvorbu plicních metastáz.

Pomocí genové pistole jsme imunizovali myši (n=6) pBSC, LgmRGG-TT11, popř. jsme použili kombinace s podáním CpG ODN či deplecí Treg podáním protilátky proti CD25. Týden po ukončení imunizace jsme myším injikovali buňky MK16/ABC. Jelikož vývoj metastáz u buněk MK16/ABC koreluje s vývojem primárních nádorů, čekali jsme, až vzniknou nádory, jejichž objem přesahuje 1 cm<sup>3</sup>. Myši s takovými nádory jsme usmrtili a vyjmuli jsme jejich plice, které jsme opláchnuli v PBS. Na vypreparovaných plicích jsme počítali vzniklé metastázy. V celé řadě skupin došlo k úhynu myší před tím, než dosáhl nádor velikosti 1 cm<sup>3</sup>. Všechny myši, jejichž nádor dosáhl velikosti 1 cm<sup>3</sup>, měly plicní metastázy a jejich počet se nijak nelišil mezi neimunizovanou a imunizovanou skupinou.

## 6. Diskuze

### 6.1. Vliv exprese IGFBP-3 na protinádorovou imunoterapii

Naše prvotní hypotéza předpokládala, že by vysoká hladina exprese IGFBP-3 zajištěná rekombinantním virem vakcinie mohla zpomalit růst nádorů a tak poskytnout čas pro indukci protinádorové imunitní odpovědi zacílené proti onkoproteinu E7. Vycházeli jsme při tom z pozorování, která ukázala snížení exprese IGFBP-3 v nádorových buňkách v důsledku hypermetylace promotoru či pozitivních regulačních elementů (Hanafusa *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2005). Snížení množství IGFBP-3 v nádorovém mikroprostředí zvyšuje zřejmě dostupnost IGF, které je následně schopné podávat prorůstové signály (viz. kapitola 2.1.2.1). Zároveň jsou buňky chráněny před indukcí apoptózy v důsledku internalizace IGFBP-3 a jeho transportu do jádra nebo jeho vazby na IGFBP-3R aktivující kaspázy (Micutkova *et al.*, 2012; Schedlich *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2005; Ingermann *et al.*, 2010). Buňky transformované HPV navíc díky E7 onkoproteinu mají schopnost snižovat množství IGFBP-3 v jádře zvýšenou polyubiquitinací a následnou degradací v proteazomu. Ačkoliv toto naznačuje, že použití našeho modelu není výhodné, je třeba počítat se schopností IGFBP-3 ovlivňovat buňky nádorového stromatu a také inhibiční dráhy nezávislé na jaderné lokalizaci. Bylo např. pozorováno, že inhibice signalizace z IGF-IR vede ke zvratu transformovaného fenotypu cervikálních nádorových buněk (Nakamura *et al.*, 2000).

Za účelem otestování naší hypotézy jsme zkonstruovali rVACV, jehož gen pro TK, byl přerušen vložením genu pro IGFBP-3 pod transkripční kontrolou časného promotoru H5 nebo syntetického časně-pozdního promotoru E/L, a zároveň nesl gen pro fúzní protein SigE7LAMP, který umožňuje indukci robustní imunitní odpovědi proti E7 onkoproteinu. Předpokládali jsme tedy, že nádory léčené podáním rVACV exprimujícími IGFBP-3 porostou pomaleji a budou lépe kontrolovány indukovanou imunitní odpovědí.

Jelikož v dané době nebyly dostupné informace o vlivu exprese IGFBP-3 na VACV, bylo třeba provést charakterizaci připravených rekombinantních virů. Odhalili jsme několik rozdílů mezi viry P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3, P13-SigE7LAMP-E/L-IGFBP-3 a kontrolním virem P13-SigE7LAMP-TK. Zjistili jsme, že infekce buněk CV-1 virem P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 vede k vyšší produkci IGFBP-3 než infekce virem P13-SigE7LAMP-E/L-IGFBP-3. Pozorování na jiných rVACV, jako např. rVACV exprimujícím IL-12 či Flt3L, ukazovala spíše vyšší expresi genů pod kontrolou E/L promotoru (Nemeckova *et al.*, 2003; Zurkova *et al.*, 2009). Na druhou stranu byly pozorovány případy, kdy příliš vysoká exprese proteinu interferovala s tvorbou infekčních virových partikulí, zatímco exprese pod kontrolou

H5 vznik rekombinantních virů umožňovala (Zurkova *et al.*, 2011). Rekombinantní viry, u kterých by v infikovaných buňkách pod kontrolou E/L promotoru docházelo k vysoké hladině exprese IGFBP-3, by tak nemusely vznikat a to ze dvou důvodů. Jednak by IGFBP-3 mohlo interferovat se sestavením virové partikule, což přicházelo v úvahu, neboť jsme pozorovali, že dochází k jeho inkorporaci do IMV. Za druhé, by mohlo docházet v důsledku vysoké hladiny IGFBP-3 k indukci apoptózy, která v případě kmene Praha není zcela inhibovaná antiapoptotickými mechanismy jako např. u kmene WR (Liskova *et al.*, 2011).

Rozdíly v množství produkovaného IGFBP-3 se nepodařilo potvrdit *in vivo*, neboť myší sérum inaktivuje IGFBP-3. Možným vysvětlením je buď přímo degradace IGFBP-3 nebo zakrytí vazebných míst pro použité protilátky vazbou IGF-I v myším séru.

V dalším kroku jsme testovali profylaktický a terapeutický účinek rVACV *in vivo* na našem modelu cervikálního karcinomu. Pro preventivní imunizaci jsme použili buňky MK16/ABC, které mají sníženou expresi MHC molekul I. třídy a jsou tudíž odolnější proti eliminaci CD8<sup>+</sup> CTL než TC-1 buňky (Smahel *et al.*, 2001). Opět jsme pozorovali rozdíly mezi jednotlivými rVACV. V případě preventivní imunizace byla průměrná velikost nádorů u myší imunizovaných virem P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 signifikantně menší než u myší imunizovaných virem P13-PreS2S a P13-H5-IGFBP-3. Podobně i u terapeutické imunizace měly myši léčené virem P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 signifikantně menší nádory než myši, kterým byl injikován kontrolní virus P13-SigE7LAMP-TK. Existuje několik možností vysvětlujících pozorovaný terapeutický efekt. Jednak je možné, že IGFBP-3 sám o sobě inhibuje růst nádorů, což by bylo v souladu s pozorováním, že virus P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 produkuje nejvíce IGFBP-3. Proti tomu ovšem svědčí pozorování z profylaktické a terapeutické imunizace, kdy rekombinantní viry exprimující pouze IGFBP-3 nebyly schopny ovlivnit růst nádorů. Druhým možným vysvětlením by mohlo být, že inserce IGFBP-3 ovlivňuje indukci imunitní odpovědi rekombinantním virem. Testování buněčné imunity pomocí metody ELISPOT ovšem odhalilo pouze nepatrné zvýšení buněčné imunitní odpovědi proti E7 onkogenu u viru P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 a P13-SigE7LAMP-E/L-IGFBP-3. Na druhou stranu jsme pozorovali výraznější rozdíly u odpovědi proti antigenům VACV, kdy buněčná odpověď byla vyšší u myší imunizovaných virem P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 a P13-SigE7LAMP-E/L-IGFBP-3 než u myší imunizovaných P13-SigE7LAMP-TK. Další možnost by mohla spočívat v rozdílném množení rekombinantních virů, což se potvrdilo, neboť jsme při testování replikace rVACV *in vivo* pomocí qPCR pozorovali vyšší množení viru P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 oproti ostatním virům, které ovšem v důsledku vysoké variability nebylo signifikantní. Pro potvrzení jsme tedy přistoupili k testování množení rVACV *in vitro* na buněčných liniích CV-1 a TC-1. Tyto buněčné linie jsme použili, jelikož CV-1 představuje standardní linii pro virovou titraci a TC-1 lépe odpovídají myšimu modelu. Pokusy *in vitro* potvrdily, že se virus P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 množí signifikantně lépe

než ostatní rVACV bez ohledu na použitou buněčnou linii. Lepší množení jsme pozorovali i u viru P13-SigE7LAMP-E/L-IGFBP-3, ale pouze při použití CV-1 buněk.

Abychom zjistili, zda je lepší množení viru P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 způsobeno vysokou hladinou IGFBP-3, rozhodli jsme se použít neutralizující polyklonální protilátku proti IGFBP-3. Pozorovali jsme, že i částečná neutralizace IGFBP-3 signifikantně snižuje replikaci viru. Naopak při použití stejné protilátky u viru P13-SigE7LAMP-TK<sup>-</sup> došlo k signifikantnímu zvýšení množství produkovaného viru. Tento jev může být spojen s tím, že se ve stárnoucích buněčných kulturách CV-1 buněk hromadí IGFBP-3 a pravděpodobně způsobuje snížení buněčného metabolismu. Neutralizace IGFBP-3 by tomuto mohla zabránit. Metabolicky aktivnější buňky pak podporují lepší replikaci viru.

Bylo pozorováno, že u rVACV může docházet k inkorporaci rekombinantních proteinů do různých částí virové partikule (Gomez a Esteban, 2001; Zurkova *et al.*, 2010). Pro stanovení zda je tomu tak také u IGFBP-3, jsme přes sacharózový gradient purifikovali IMV virů P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3, P13-SigE7LAMP-E/L-IGFBP-3 a P13-SigE7LAMP-TK<sup>-</sup> a jejich nezávisle připravených sesterských virů. Použití sesterských virů bylo nutné pro vyloučení vlivu náhodných mutací. Analýza za použití metody Western-blot odhalila přítomnost alespoň 4 proužků v případě IMV P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3. Slabý signál jsme detekovali také v IMV P13-SigE7LAMP-E/L-IGFBP-3, což naznačuje menší množství integrovaného proteinu. Žádný signál jsme nedetekovali u viru P13-SigE7LAMP-TK<sup>-</sup>. Proteiny obsažené v proužku I představují glykosylované IGFBP-3 a jsou detekovatelné ve všech frakcích viru P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3. Jistou výjimku představuje membránová frakce, kde byl IGFBP-3 detekován, ale pouze v nepatrném množství. Domníváme se, že proteiny obsažené v menších prouzcích II a III, detekovaných především v matrixové frakci, představují buď neglykosylované IGFBP-3 anebo produkty proteolytického štěpení IGFBP-3 virovými proteázami během maturace virionu. Tato domněnka je založena na poznatku, že proteázy kódované VACV rozpoznávají aminokyselinovou sekvenci AGX, kde X může být A, S nebo T, ale ne N (Byrd a Hruby, 2006). Pomocí *in silico* analýzy jsme zmíněné AGX sekvence odhalili v aminokyselinové sekvenci IGFBP-3. Největší proužek IV, detekovaný především v solubilní a nesolubilní core frakci, představuje zřejmě komplex obsahující IGFBP-3. Pro zjištění zda inkorporace IGFBP-3 ovlivňuje proteinové složení IMV, jsme tyto separovali na SDS-PAGE a gel následně obarvili coomassie blue. Nedetekovali jsme žádné rozdíly mezi viry exprimujícími IGFBP-3 a virem P13-SigE7LAMP-TK<sup>-</sup>.

Dále jsme přistoupili k analýze replikačního cyklu rVACV, abychom zjistili, která z jeho fází je ovlivněna IGFBP-3. Jako první jsme testovali možnost, že v důsledku integrace IGFBP-3 či jiné strukturální změny dochází k lepší adsorpci viru na buňky nebo lepší penetraci do buňky. IGFBP-3 by mohl adsorpci a penetraci viru podporovat díky své C-koncové části, která obsahuje vazebné domény pro různé komponenty ECM a pro kaveolin-1 (Yamada a Lee, 2009).

Navíc bylo pozorováno, že peptidy odvozené od domény IGFBP-3 schopné vázat heparin mohou sloužit jako nosiče pro transport proteinů do buněk (Goda *et al.*, 2008). Pro testování hypotézy, že IGFBP-3 pomáhá penetraci či adsorpci viru na buňky, jsme použili dva nezávislé testy. V penetračním testu jsme v daném časovém intervalu zastavili vstup viru do buňky pomocí neutralizujících protilátek proti VACV a následně sledovali rozdíly v počtu vzniklých plaků. Tento test ovšem neumožňuje odlišit, zda pozorované rozdíly nejsou dané lepší adsorpcí viru na buňky. Přistoupili jsme tedy ke stanovení míry adsorpce na základě množství neadsorbovaného viru v inokulu. Oba tyto testy v souladu s hypotézou, že IGFBP-3 podporuje adsorpci rVACV, ukázaly, že virus P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 adsorbuje na buňky lépe než kontrolní virus P13-SigE7LAMP-TK. Ačkoliv tedy tyto výsledky naznačují, že IGFBP-3 nesený IMV by mohl interagovat s ECM nebo buněčnými proteiny a tak podporovat lepší adsorpci viru, proti této hypotéze hovoří výsledky strukturní analýzy IMV. Je pravděpodobné, že v takovém případě by musel být IGFBP-3 detekovatelný v membránové frakci IMV, kde se ho podařilo detekovat pouze nepatrné množství.

Pro objasnění lepší adsorpce P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 na buňky jsme přistoupili k analýze obsahu PS v IMV. K tomuto kroku nás vedla pozorování, která ukazují, že VACV pro vstup do buněk používá makropinocytózu a molekulární mimikry, kdy se díky PS ve své membráně tváří jako apoptotické tělíčko (Mercer a Helenius, 2008; Mercer a Helenius, 2010). Bylo ovšem pozorováno, že různé kmeny VACV indukují různé formy makropinocytózy (Mercer *et al.*, 2010). Zatímco kmen WR indukuje tvorbu tzv. membránových blebů, kmen IHD-J indukuje tvorbu filopodií. To je dáno především rozdílnou aktivací buněčných Rho GTPáz jednotlivými kmeny (Mercer *et al.*, 2010). U IHD-J byla pozorována přednostní aktivace Cdc42, která se podílí na regulaci tvorby filopodií. Navíc použití dominantně negativní mutanty Cdc42 vedlo k signifikantnímu snížení infekce buněk. Naopak WR v buňkách aktivuje silněji Rac-1, ale na infekci se podílejí Rac 1 i Cdc42 stejnou měrou (Mercer *et al.*, 2010).

Pro analýzu obsahu PS jsme přistoupili k použití metod průtokové virometrie, které využívají napojení virionů na různé nanočástice či mikročástice, barvení virionů pomocí fluorescenčně značených protilátek a následné měření pomocí průtokového cytometru (Arakelyan *et al.*, 2013). Tyto metody byly použity pro detekci a analýzu vlastností virionů HIV, viru Nipah a Junin (Kim *et al.*, 2009; Arakelyan *et al.*, 2013; Landowski *et al.*, 2014; Gaudin a Barteneva, 2015). Při stanovování obsahu PS ve virionech rVACV jsme vycházeli především z práce zabývající se detekcí a kvantifikací HIV pomocí magnetických částic pokrytých protilátkami proti GP120 a následným barvením virionů pomocí fluorescenčních nanočástic (Kim *et al.*, 2009). V našem testu jsme imobilizovali purifikované IMV na mikrokuličkách pokrytých proteinem G a s navázanými protilátkami proti VACV. Výhodou tohoto přístupu je možnost použití FSC a SSC pro identifikaci komplexů mikrokuliček s viry. Ačkoliv se u VACV jedná o velký DNA virus, je z hlediska světelného rozptylu svou velikostí

kolem 300 nm na hraně detekovatelnosti běžného průtokového cytometru jako např. BD LSRFortessa (Headland *et al.*, 2014). K určení obsahu PS na navázaných virionech jsme následně použili fluorescenčně značený protein Annexin V, který je schopen zakrytím PS v membráně snížit infektivitu VACV (Mercer a Helenius, 2008). Za pomoci této metody jsme zjistili, že virus P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 ve své membráně obsahuje více PS než P13-SigE7LAMP-TK. Domníváme se tedy, že morfogeneze IMV v buňkách obsahujících vysoké množství pro-apoptického proteinu IGFBP-3 vede ke vzniku virionů se zvýšeným obsahem PS. Tyto viriony jsou efektivněji macropinocytovány, což ve výsledku zlepšuje efektivitu infekce a způsobuje lepší množení viru. Virus P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 by se tak *in vivo* mohl déle udržet v hostiteli, což by vedlo k déle trvající stimulaci protinádorové imunitní odpovědi a zpomalilo růst nádorů TC-1 v případě terapeutické imunizace a MK16/ABC nádorů v případě imunizace profylaktické.

## 6.2. Imunizace proti M2 polarizovaným TAM

Před započítáním testování DNA vakcíny proti legumainu bylo nutné ověřit, zda nádory vyvolané buňkami MK16 obsahují TAM a zda tyto exprimují legumain. Jako první jsme pro určení použili imunohistochemické metody, které ukázaly, že nádory obsahují makrofágy a buňky exprimující legumain. Histologie ovšem nebyla schopna zjistit, zda se u buněk exprimujících legumain jedná o makrofágy. Pro přesnější určení jsme se rozhodli použít průtokové cytometrie. Navrhli jsme tedy panel, ve kterém byly makrofágy definovány jako buňky exprimující F4/80 a MHC II. třídy. Testování ovšem ukázalo, že tento panel je nevhodný, jelikož nedokáže jasně vyčlenit skupinu TAM, ačkoliv je schopný detekovat např. peritoneální makrofágy. To je dáno zřejmě tím, že M2 polarizované TAM mohou mít sníženou expresi MHC II (Wang *et al.*, 2011). Diferenciace M2 polarizovaných TAM je řízena IL-4, IL-10 a TGF- $\beta$ , které snižují expresi transkripčního transaktivátoru CIITA řídícího expresi MHC II. třídy (O'Keefe *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1997). Na inhibici exprese CIITA se mohou podílet i dalšími molekuly nádorového mikroprostředí jako např. DcR3 (Chang *et al.*, 2008). V nádorech se můžeme setkat s produkcí PGE<sub>2</sub>, který prostřednictvím svého receptoru aktivuje adenylátcyklázu produkující cAMP. Cyklické AMP následně aktivuje PKA, která fosforyluje a inaktivuje CIITA (Li *et al.*, 2001).

Rozhodli jsme se tedy TAM definovat jako buňky exprimující CD11b a F4/80. Tímto způsobem se nám podařilo jasně definovat populaci TAM, ve které jsme stanovovali expresi legumainu. Jelikož se legumain kromě endozomů a lysozomů vyskytuje na povrchu buněk v komplexu s integriny, kde se podílí na degradaci ECM, rozhodli jsme se pro detekci extracelulárním barvením (Liu *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2012; Dall a Brandstetter, 2013; Chen *et al.*, 2001; Shirahama-Noda *et al.*, 2003). Zjistili jsme, že 48% TAM v nádorech MK16/ABC exprimuje legumain. Během testování panelů detekčních protilátek jsme rovněž

testovali použití různých disociačních enzymů pro přípravu jednobuněčné suspenze z nádorů. Porovnávali jsme použití trypsinu (EC 3.4.21.4) a akutázy, která představuje směs enzymů mořských organismů s proteolytickou a kolagenolytickou aktivitou. Zjistili jsme, že z hlediska výtěžku legumain exprimujících TAM se jako lepší jeví použití akutázy. Pozorovali jsme, že při použití trypsinu je množství detekovaných legumain<sup>+</sup> TAM signifikantně nižší. To je zřejmě dáno tím, že trypsin jako agresivnější enzym může štěpit povrchové molekuly a způsobit disociaci legumainu z povrchu TAM.

Následně jsme přistoupili k přípravě DNA vakcíny. Pro zvýšení imunogennosti legumainu jsme se rozhodli provést genové modifikace. Jako první jsme se rozhodli provést mutagenезi vazebného RGD motivu. Vycházeli jsme při tom z práce, ve které bylo pospáno, že mutace v RGD motivu PC-1 vedla ke změně lokalizace a stability (Lusson *et al.*, 1997; Rovere *et al.*, 1999). Předpokládali jsme, že snížení stability a změny lokalizace by mohlo vést ke zvýšené tvorbě antigenních peptidů. V souladu s touto hypotézou jsme pozorovali, že mutované legumainové proteiny mají inhibovanou maturaci a pozměněnou lokalizaci v buňce, což bylo spojeno se zhruba trojnásobným zvýšením imunogennosti oproti nemutovanému proteinu. Podobné zvýšení imunogennosti bylo pozorovatelné i v případě, kdy byl do sekvence pro legumain vložen pomocný epitop p30 odvozený od tetanového toxinu, schopný se vázat na MHC II. třídy a tak aktivovat pomocné CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty. Kombinace obou modifikací již další zlepšení nepřinesla. Předpokládáme, že to může být způsobeno srovnatelným efektem vložení epitopu p30 na maturaci a buněčnou lokalizaci.

DNA vakcinace pomocí biolistické metody vede k indukci T<sub>H</sub>1 i T<sub>H</sub>2 imunity (Dean *et al.*, 2003). I my jsme pozorovali, že proti pomocnému epitopu p30 použitému v DNA vakcínách proti legumainu odpovídají jak T<sub>H</sub>1, tak T<sub>H</sub>2 lymfocyty (Smahel *et al.*, 2014). Cytokiny produkované T<sub>H</sub>2 lymfocyty podporují protilátkovou odpověď a mohou vést k diferenciaci supresorových M2 polarizovaných makrofágů (Ouyang *et al.*, 1998; Usui *et al.*, 2003; Mantovani *et al.*, 2004; Baay *et al.*, 2011). Naopak T<sub>H</sub>1 lymfocyty jsou důležitou součástí protinádorové imunity. Jsou důležité pro proces licencování, při kterém aktivují DC, z nichž se stávají lepší stimulatory protinádorových CD8<sup>+</sup> CTL (Ridge *et al.*, 1998; Bennett *et al.*, 1997). Navíc T<sub>H</sub>1 lymfocyty podporují infiltraci CTL do nádorů a chrání je před funkčním vyčerpáním (Bos a Sherman, 2010; Aubert *et al.*, 2011).

Pro posílení indukce T<sub>H</sub>1 odpovědi jsme se rozhodli zkombinovat imunizaci pomocí genové pistole s IP podáním CpG-ODN, které funguje jako adjuvans posilující T<sub>H</sub>1 odpověď (Bode *et al.*, 2011). Výsledky publikované naší laboratoří ukázaly, že systémové podání CpG motivů může posílit protinádorový efekt DNA imunizace pomocí genové pistole (Smahel *et al.*, 2011). Z molekulárního hlediska nemetylované CpG motivy mimikují bakteriální DNA, která představuje PAMP (Bode *et al.*, 2011). Nemetylovaná DNA je rozpoznávána TLR-9 exprimovaným na pDC, který v nich prostřednictvím IRF7 indukuje

produkcí IFN I. třídy (Kumagai *et al.*, 2008). Cytozolická TIR doména TLR-9 interaguje s adaptorovým proteinem MyD88. Ten interakcí s dalšími proteiny indukuje signální dráhy vedoucí k aktivaci NF- $\kappa$ B, AP-1 a IRF5, které indukují expresi prozánětlivých cytokinů jako jsou IL-6, IL-12 a TNF- $\alpha$  (Kumagai *et al.*, 2008). Kromě produkce cytokinů dochází v pDC pod vlivem aktivace TLR-9 ke zvýšení exprese MHC II, kostimulačních molekul CD40, CD80 a CD86 (Bode *et al.*, 2011). Nepodařilo se nám prokázat, že by podání CpG posílilo indukci T<sub>H</sub>1 odpovědi proti legumainu (Smahel *et al.*, 2014). Zároveň jsme nepozorovali žádný efekt na indukci CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů. Naopak, podání CpG u konstruktu LgmnRGG.TT11 vedla k mírnému snížení produkce IFN- $\gamma$  CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty. Bylo pozorováno, že systémové podání CpG může snížit aktivaci CD8<sup>+</sup> lymfocytů ve slezině a to v důsledku indukceIDO na CD19<sup>+</sup> DC (Smahel *et al.*, 2011; Wingender *et al.*, 2006; Mellor *et al.*, 2005).

Indukce imunitní odpovědi proti tělu vlastním antigenům může být inhibována Treg. Bylo popsáno, že jejich deplece protilátkou proti CD25 může posílit aktivaci CD8<sup>+</sup> CTL (Chuang *et al.*, 2009). V souladu s tímto pozorováním deplece Treg před imunizací signifikantně zvýšila imunitní odpověď proti legumainu při imunizaci konstruktem LgmnRGG.TT11.

Následně jsme přistoupili k ověření, zda imunizace konstruktem LgmnRGG.TT11 dokáže sama nebo v kombinaci s deplecí inhibovat růst nádorů. Zjistili jsme, že imunizace proti legumainu signifikantně inhibuje růst nádorů a to stejně dobře jako samotná deplece Treg. Kombinace deplece Treg a imunizace proti legumainu další zlepšení nepřinesla a velikost nádorů v této skupině myší byla nepatrně větší než u myší, které byly jen imunizovány LgmnRGG.TT11. Ačkoliv je CD25 konstitutivně exprimováno na povrchu Treg, dochází k jeho indukcii i na aktivovaných efektorových T-lymfocytech (Seddiki *et al.*, 2006). Při podání anti-CD25 protilátky tak může rovněž docházet k eliminaci časně aktivovaných efektorových T-lymfocytů.

Dále jsme analyzovali, zda je inhibice růstu nádorů spojena se snížením počtu legumain<sup>+</sup> TAM. Nepodařilo se nám prokázat, že by imunizace LgmnRGG.TT11 snižovala množství legumain<sup>+</sup> TAM. Pro analýzu průtokovou cytometrií jsme vybírali vždy nádory, které byly v nejdelším rozměru velké min. 1 cm. Je možné, že u takto velkých nádorů dochází k akumulaci legumain<sup>+</sup> TAM hlavně v hypoxických oblastech. Tento předpoklad je založen na pozorováních, která ukazují, že TAM preferenčně infiltrují hypoxické oblasti nádorů (Chanmee *et al.*, 2014). Navíc bylo pozorováno, že ke zvýšené expresi legumainu dochází za hypoxických podmínek (Chen *et al.*, 2015; Luo *et al.*, 2006). V hypoxických oblastech dochází pod vlivem HIF-1 $\alpha$  ke zvýšené produkci laktátu, který inhibuje funkci CD8<sup>+</sup> CTL (Semenza 2009; Fischer *et al.*, 2007). Navíc i samotné T-lymfocyty reagují na hypoxii zvýšením exprese HIF-1 $\alpha$ , který negativně reguluje signální transdukcii z TCR a snižuje expresi pro-zánětlivých cytokinů (Kumar a Gabrilovich, 2014). Hypoxie podporuje aktivitu CD39 a CD73, což vede

k akumulaci imunosupresivního adenosinu (Kumar a Gabrilovich, 2014). Hypoxické podmínky mohou dále podporovat expresi koinhibiční molekuly PD-1L na TAM, což může vést k inhibici CD8<sup>+</sup> CTL (Noman *et al.*, 2014). Předpokládáme tedy, že by k eliminaci legumain<sup>+</sup> TAM mohlo docházet v raných fázích, kdy jsou nádory ještě malé a CD8<sup>+</sup> CTL mají lepší přístup k TAM. Díky odstraňování TAM by tak nádory byly ve svém růstu znevýhodněny. Nedá se ovšem vyloučit možnost, že legumain v nádorech exprimují i jiné buňky, jako např. samotné nádorové buňky MK16/ABC. Nicméně analýza MK16/ABC pomocí western-blotu expresi legumainu neprokázala (data nejsou ukázána). K jeho indukci by ovšem mohlo dojít *in vivo* pod vlivem hypoxie, což ovšem neukazují histologické řezy.

Nepodařilo se nám rovněž prokázat, že by imunizace proti legumainu snižovala tvorbu plicních metastáz. Vývoj plicních metastáz u nádorů vyvolaných MK16/ABC koreluje s vývojem primárního nádoru (Mikyskova *et al.*, 2000). Analyzovali jsme tedy myši, jejichž nádory dosáhly velikosti 1 cm<sup>3</sup>. Je možné, že je při této velikosti nádorů imunitní systém již vyčerpaný a nedokáže tvorbě metastáz zabránit.

## 7. Závěr

Testovali jsme dvě strategie modulace nádorového prostředí. První strategie spočívala v konstrukci rekombinantních virů vakcinie nesoucích tumor supresorový gen IGFBP-3 a imunogen SigE7Lamp. Zjistili jsme, že nejvyšší exprese IGFBP-3 je dosaženo, pokud se gen nachází pod kontrolou časného promotoru H5. Pozorovali jsme, že vysoká hladina exprese IGFBP-3 korelovala s inhibicí růstu nádorů u myši imunizovaných virem P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3. Na druhé straně jsme ukázali, že samotná exprese IGFBP-3 růst nádorů neovlivňuje. Ve snaze objasnit mechanismus pozorovaného inhibičního efektu, jsme zjistili, že se virus P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 množí signifikantně lépe než kontrolní virus P13-SigE7LAMP-TK<sup>-</sup> a jeho lepší množení souvisí s vysokou hladinou exprese IGFBP-3. Strukturní analýza viru P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 odhalila několik odlišností od viru P13-SigE7LAMP-TK<sup>-</sup>. Zprv jsme zjistili, že v důsledku vysoké hladiny exprese IGFBP-3 dochází k jeho inkorporaci do IMV P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3, a že toto koreluje s lepší adsorpcí viru na buňky. Zadruhé jsme pozorovali, že vysoká hladina exprese pro-apoptotického IGFBP-3 způsobuje zvýšení množství PS v membráně IMV P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 oproti P13-SigE7LAMP-TK<sup>-</sup>. Pro přímé měření obsahu PS ve virionech rVACV jsme navrhli metodu, při které jsou viry pomocí protilátek proti VACV imobilizovány na mikrokuličkách. Množství PS jsme pak stanovovali pomocí průtokové cytometrie. Na základě těchto výsledků jsme navrhli hypotézu, v níž předpokládáme, že vysoká hladina IGFBP-3 vede ke zvýšení množství PS a jeho inkorporaci do IMV. Tyto IMV mohou následně efektivněji infikovat buňky v důsledku efektivnější indukce makropinocytózy. Efektivnější infekce pak umožňuje rVACV déle perzistovat v hostiteli, což je spojeno s delší stimulací imunitní odpovědi, která následně dokáže inhibovat růst nádorů vyvolaných buňkami TC-1. Naše pozorování tedy naznačují, že je možné měnit obsah PS v IMV VACV a tak ovlivňovat množení rekombinantních virů.

Druhá strategie spočívala v konstrukci DNA vakcíny proti M2 polarizovaným TAM, které se vyznačují zvýšenou expresí endopeptidázy legumain. V první fázi jsme charakterizovali model cervikálního karcinomu založený na buňkách MK16/ABC z hlediska přítomnosti legumain<sup>+</sup> TAM. Za použití imunohistochemie a průtokové cytometrie jsme zjistili, že nádory vyvolané buňkami MK16/ABC obsahují TAM, a že 48% z nich exprimuje legumain. Následně jsme přistoupili k přípravě DNA vakcíny, ve které jsme pro zvýšení imunogennosti legumainu navrhli dvě genové modifikace a to mutaci v sekvenci RGD a vložení pomocného epitopu p30. Ukázali jsme, že obě modifikace ovlivňují maturaci genu pro legumain a jeho buněčnou lokalizaci, což je spojeno se zvýšenou indukcí imunitní odpovědi proti legumainu. Zjistili jsme, že další kombinace mutagenese RGG a vložení epitopu p30 již k dalšímu zvýšení imunitní odpovědi nevede. Jelikož DNA vakcinace biolistickou metodou indukuje také T<sub>H</sub>2 odpověď, rozhodli jsme se posílit indukci T<sub>H</sub>1 a CD8<sup>+</sup>CTL odpovědi pomocí podání CpG nebo deplecí

Treg. Zjistili jsme, že zatímco podání CpG již k dalšímu zvýšení CTL odpovědi nevede, deplece Treg významně posílila indukci imunitní odpovědi konstruktem LgmnRGG.TT11. Imunitní odpověď indukovaná LgmnRGG.TT11 významně potlačovala růst nádorů MK16/ABC a to stejně dobře jako samotná deplece Treg. Kombinace deplece Treg a následná imunizace LgmnRGG.TT11 již další zlepšení nepřinesla. Sledovali jsme, zda imunizace proti legumainu sníží množství legumain<sup>+</sup> TAM v nádorech a bude schopna inhibovat tvorbu metastáz. Nepodařilo se nám prokázat, že by imunizace DNA vakcínou LgmnRGG.TT11 snížila množství legumain<sup>+</sup> TAM v nádorech nebo byla schopna potlačit tvorbu plicních metastáz. Domníváme se, že imunizace proti legumainu inhibuje růst nádorů v raných fázích vývoje. Větší nádory se již kontrole imunitního systému vymykají, což umožňuje tvorbu plicních metastáz. Legumain<sup>+</sup> TAM se pak mohou ve větších nádorech akumulovat v hypoxických oblastech, kde nejsou přístupny k cytolyze CD8<sup>+</sup> CTL.

## 8. Seznam citované literatury

- Abdollahi, A., P. Hahnfeldt, C. Maercker, H. J. Grone, J. Debus, W. Ansorge, J. Folkman, L. Hlatky, and P. E. Huber. 2004. Endostatin's antiangiogenic signaling network. *Mol.Cell* 13:649-663. doi:S1097276504001029 [pii].
- Acosta-Rodriguez, E. V., G. Napolitani, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2007. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat.Immunol.* 8:942-949. doi:ni1496 [pii];10.1038/ni1496 [doi].
- Acosta-Rodriguez, E. V., L. Rivino, J. Geginat, D. Jarrossay, M. Gattorno, A. Lanzavecchia, F. Sallusto, and G. Napolitani. 2007. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat.Immunol.* 8:639-646. doi:ni1467 [pii];10.1038/ni1467 [doi].
- Acuto, O. and F. Michel. 2003. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat.Rev.Immunol.* 3:939-951. doi:10.1038/nri1248 [doi];nri1248 [pii].
- Adair-Kirk, T. L., J. J. Atkinson, T. J. Broekelmann, M. Doi, K. Tryggvason, J. H. Miner, R. P. Mecham, and R. M. Senior. 2003. A site on laminin alpha 5, AQARSAASKVKVSMKF, induces inflammatory cell production of matrix metalloproteinase-9 and chemotaxis. *J.Immunol.* 171:398-406.
- Aggarwal, S. and M. F. Pittenger. 2005. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105:1815-1822. doi:2004-04-1559 [pii];10.1182/blood-2004-04-1559 [doi].
- Aguirre Ghiso, J. A. 2002. Inhibition of FAK signaling activated by urokinase receptor induces dormancy in human carcinoma cells in vivo. *Oncogene* 21:2513-2524. doi:10.1038/sj.onc.1205342 [doi].
- Ahmadzadeh, M., L. A. Johnson, B. Heemskerck, J. R. Wunderlich, M. E. Dudley, D. E. White, and S. A. Rosenberg. 2009. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood* 114:1537-1544. doi:blood-2008-12-195792 [pii];10.1182/blood-2008-12-195792 [doi].
- Ahn, E. Y., G. Pan, S. M. Vickers, and J. M. McDonald. 2002. IFN-gamma upregulates apoptosis-related molecules and enhances Fas-mediated apoptosis in human cholangiocarcinoma. *Int.J.Cancer* 100:445-451. doi:10.1002/ijc.10516 [doi].
- Aki, M., N. Shimbara, M. Takashina, K. Akiyama, S. Kagawa, T. Tamura, N. Tanahashi, T. Yoshimura, K. Tanaka, and A. Ichihara. 1994. Interferon-gamma induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes. *J.Biochem.* 115:257-269.
- Akiyama, K., S. Kagawa, T. Tamura, N. Shimbara, M. Takashina, P. Kristensen, K. B. Hendil, K. Tanaka, and A. Ichihara. 1994. Replacement of proteasome subunits X and Y by LMP7 and LMP2 induced by interferon-gamma for acquirement of the functional diversity responsible for antigen processing. *FEBS Lett.* 343:85-88. doi:0014-5793(94)80612-8 [pii].
- Akiyama, M., T. Hideshima, T. Hayashi, Y. T. Tai, C. S. Mitsiades, N. Mitsiades, D. Chauhan, P. Richardson, N. C. Munshi, and K. C. Anderson. 2003. Nuclear factor-kappaB p65 mediates tumor necrosis factor alpha-induced nuclear translocation of telomerase reverse transcriptase protein. *Cancer Res.* 63:18-21.
- Al-Hazmi, N., G. J. Thomas, P. M. Speight, and S. A. Whawell. 2007. The 120 kDa cell-binding fragment of fibronectin up-regulates migration of alphavbeta6-expressing cells by increasing matrix metalloproteinase-2 and -9 secretion. *Eur.J.Oral Sci.* 115:454-458. doi:EOS481 [pii];10.1111/j.1600-0722.2007.00481.x [doi].
- Alessi, D. R., S. R. James, C. P. Downes, A. B. Holmes, P. R. Gaffney, C. B. Reese, and P. Cohen. 1997. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr.Biol.* 7:261-269. doi:S0960-9822(06)00122-9 [pii].
- Allavena, P. and A. Mantovani. 2012. Immunology in the clinic review series; focus on cancer: tumour-associated macrophages: undisputed stars of the inflammatory tumour microenvironment. *Clin.Exp.Immunol.* 167:195-205. doi:10.1111/j.1365-2249.2011.04515.x [doi].
- Allavena, P., A. Sica, G. Solinas, C. Porta, and A. Mantovani. 2008. The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. *Crit Rev.Oncol.Hematol.* 66:1-9. doi:S1040-8428(07)00162-X [pii];10.1016/j.critrevonc.2007.07.004 [doi].
- Almholt, K., L. R. Lund, J. Rygaard, B. S. Nielsen, K. Dano, J. Romer, and M. Johnsen. 2005. Reduced metastasis of transgenic mammary cancer in urokinase-deficient mice. *Int.J.Cancer* 113:525-532. doi:10.1002/ijc.20631 [doi].
- Althoff, K., P. Reddy, N. Voltz, S. Rose-John, and J. Mullberg. 2000. Shedding of interleukin-6 receptor and tumor necrosis factor alpha. Contribution of the stalk sequence to the cleavage pattern of transmembrane proteins. *Eur.J.Biochem.* 267:2624-2631. doi:ejb1278 [pii].
- Alvarez-Silva, M. and R. Borojevic. 1996. GM-CSF and IL-3 activities in schistosomal liver granulomas are controlled by stroma-associated heparan sulfate proteoglycans. *J.Leukoc.Biol.* 59:435-441.

- Ambarus, C. A., S. Krausz, E. M. van, J. Hamann, T. R. Radstake, K. A. Reedquist, P. P. Tak, and D. L. Baeten. 2012. Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages. *J.Immunol.Methods* 375:196-206. doi:S0022-1759(11)00294-8 [pii];10.1016/j.jim.2011.10.013 [doi].
- Ambesi, A., R. M. Klein, K. M. Pumiglia, and P. J. McKeown-Longo. 2005. Anastellin, a fragment of the first type III repeat of fibronectin, inhibits extracellular signal-regulated kinase and causes G(1) arrest in human microvessel endothelial cells. *Cancer Res.* 65:148-156. doi:65/1/148 [pii].
- Ambesi, A. and P. J. McKeown-Longo. 2009. Anastellin, the angiostatic fibronectin peptide, is a selective inhibitor of lysophospholipid signaling. *Mol.Cancer Res.* 7:255-265. doi:1541-7786.MCR-08-0195 [pii];10.1158/1541-7786.MCR-08-0195 [doi].
- Amsen, D., A. Antov, D. Jankovic, A. Sher, F. Radtke, A. Souabni, M. Busslinger, B. McCright, T. Gridley, and R. A. Flavell. 2007. Direct regulation of Gata3 expression determines the T helper differentiation potential of Notch. *Immunity.* 27:89-99. doi:S1074-7613(07)00333-0 [pii];10.1016/j.immuni.2007.05.021 [doi].
- Amsen, D., J. M. Blander, G. R. Lee, K. Tanigaki, T. Honjo, and R. A. Flavell. 2004. Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. *Cell* 117:515-526. doi:S0092867404004519 [pii].
- Andarawewa, K. L., E. R. Motrescu, M. P. Chenard, A. Gansmuller, I. Stoll, C. Tomasetto, and M. C. Rio. 2005. Stromelysin-3 is a potent negative regulator of adipogenesis participating to cancer cell-adipocyte interaction/crosstalk at the tumor invasive front. *Cancer Res.* 65:10862-10871. doi:65/23/10862 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-05-1231 [doi].
- Andersson, J., D. Q. Tran, M. Pesu, T. S. Davidson, H. Ramsey, J. J. O'Shea, and E. M. Shevach. 2008. CD4+ FoxP3+ regulatory T cells confer infectious tolerance in a TGF-beta-dependent manner. *J.Exp.Med.* 205:1975-1981. doi:jem.20080308 [pii];10.1084/jem.20080308 [doi].
- Ankathatti, M. M., Y. Deng, S. J. Mulligan, and J. Xiang. 2011. Th17 and Th17-stimulated CD8(+) T cells play a distinct role in Th17-induced preventive and therapeutic antitumor immunity. *Cancer Immunol.Immunother.* 60:1473-1484. doi:10.1007/s00262-011-1054-y [doi].
- Antonioli, L., C. Blandizzi, P. Pacher, and G. Hasko. 2013. Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. *Nat.Rev.Cancer* 13:842-857. doi:nrc3613 [pii];10.1038/nrc3613 [doi].
- Arai, T., W. Busby, Jr., and D. R. Clemmons. 1996. Binding of insulin-like growth factor (IGF) I or II to IGF-binding protein-2 enables it to bind to heparin and extracellular matrix. *Endocrinology* 137:4571-4575. doi:10.1210/endo.137.11.8895319 [doi].
- Arakelyan, A., W. Fitzgerald, L. Margolis, and J. C. Grivel. 2013. Nanoparticle-based flow virometry for the analysis of individual virions. *J.Clin.Invest* 123:3716-3727. doi:67042 [pii];10.1172/JCI67042 [doi].
- Arenberg, D. A., M. P. Keane, B. DiGiovine, S. L. Kunkel, S. R. Strom, M. D. Burdick, M. D. Iannettoni, and R. M. Strieter. 2000. Macrophage infiltration in human non-small-cell lung cancer: the role of CC chemokines. *Cancer Immunol.Immunother.* 49:63-70.
- Arend, W. P., M. Malyak, M. F. Smith, Jr., T. D. Whisenand, J. L. Slack, J. E. Sims, J. G. Giri, and S. K. Dower. 1994. Binding of IL-1 alpha, IL-1 beta, and IL-1 receptor antagonist by soluble IL-1 receptors and levels of soluble IL-1 receptors in synovial fluids. *J.Immunol.* 153:4766-4774.
- Armulik, A., G. Genove, and C. Betsholtz. 2011. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev.Cell* 21:193-215. doi:S1534-5807(11)00269-3 [pii];10.1016/j.devcel.2011.07.001 [doi].
- Au, P., J. Tam, D. Fukumura, and R. K. Jain. 2008. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells facilitate engineering of long-lasting functional vasculature. *Blood* 111:4551-4558. doi:10.1182/blood-2007-10-118273 [pii];10.1182/blood-2007-10-118273 [doi].
- Aubert, R. D., A. O. Kamphorst, S. Sarkar, V. Vezys, S. J. Ha, D. L. Barber, L. Ye, A. H. Sharpe, G. J. Freeman, and R. Ahmed. 2011. Antigen-specific CD4 T-cell help rescues exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 108:21182-21187. doi:1118450109 [pii];10.1073/pnas.1118450109 [doi].
- Avice, M. N., M. Rubio, M. Sergerie, G. Delespesse, and M. Sarfati. 2000. CD47 ligation selectively inhibits the development of human naive T cells into Th1 effectors. *J.Immunol.* 165:4624-4631.
- Baay, M., A. Brouwer, P. Pauwels, M. Peeters, and F. Lardon. 2011. Tumor cells and tumor-associated macrophages: secreted proteins as potential targets for therapy. *Clin.Dev.Immunol.* 2011:565187. doi:10.1155/2011/565187 [doi].
- Bailey, S. R., M. H. Nelson, R. A. Himes, Z. Li, S. Mehrotra, and C. M. Paulos. 2014. Th17 cells in cancer: the ultimate identity crisis. *Front Immunol.* 5:276. doi:10.3389/fimmu.2014.00276 [doi].
- Baitsch, L., P. Baumgaertner, E. Devere, S. K. Raghav, A. Legat, L. Barba, S. Wiecekowsk, H. Bouzourene, B. Deplancke, P. Romero, N. Rufer, and D. E. Speiser. 2011. Exhaustion of tumor-specific CD8(+) T cells in metastases from melanoma patients. *J.Clin.Invest* 121:2350-2360. doi:46102 [pii];10.1172/JCI46102 [doi].

- Balbin, M., A. Fueyo, A. M. Tester, A. M. Pendas, A. S. Pitiot, A. Astudillo, C. M. Overall, S. D. Shapiro, and C. Lopez-Otin. 2003. Loss of collagenase-2 confers increased skin tumor susceptibility to male mice. *Nat.Genet.* 35:252-257. doi:10.1038/ng1249 [doi];ng1249 [pii].
- Ballesteros-Tato, A., B. Leon, F. E. Lund, and T. D. Randall. 2013. CD4+ T helper cells use CD154-CD40 interactions to counteract T reg cell-mediated suppression of CD8+ T cell responses to influenza. *J.Exp.Med.* 210:1591-1601. doi:jem.20130097 [pii];10.1084/jem.20130097 [doi].
- Balsamo, M., F. Scordamaglia, G. Pietra, C. Manzini, C. Cantoni, M. Boitano, P. Queirolo, W. Vermi, F. Facchetti, A. Moretta, L. Moretta, M. C. Mingari, and M. Vitale. 2009. Melanoma-associated fibroblasts modulate NK cell phenotype and antitumor cytotoxicity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 106:20847-20852. doi:0906481106 [pii];10.1073/pnas.0906481106 [doi].
- Banerjee, A., S. M. Gordon, A. M. Intlekofer, M. A. Paley, E. C. Mooney, T. Lindsten, E. J. Wherry, and S. L. Reiner. 2010. Cutting edge: The transcription factor eomesodermin enables CD8+ T cells to compete for the memory cell niche. *J.Immunol.* 185:4988-4992. doi:jimmunol.1002042 [pii];10.4049/jimmunol.1002042 [doi].
- Barcellos-de-Souza, P., V. Gori, F. Bambi, and P. Chiarugi. 2013. Tumor microenvironment: bone marrow-mesenchymal stem cells as key players. *Biochim.Biophys.Acta* 1836:321-335. doi:S0304-419X(13)00046-2 [pii];10.1016/j.bbcan.2013.10.004 [doi].
- Bardel, E., F. Larousserie, P. Charlot-Rabiega, A. Coulomb-L'Hermine, and O. Devergne. 2008. Human CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells do not constitutively express IL-35. *J.Immunol.* 181:6898-6905. doi:181/10/6898 [pii].
- Barderas, R., R. A. Bartolome, M. J. Fernandez-Acenero, S. Torres, and J. I. Casal. 2012. High expression of IL-13 receptor alpha2 in colorectal cancer is associated with invasion, liver metastasis, and poor prognosis. *Cancer Res.* 72:2780-2790. doi:0008-5472.CAN-11-4090 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-11-4090 [doi].
- Barleon, B., S. Sozzani, D. Zhou, H. A. Weich, A. Mantovani, and D. Marme. 1996. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 87:3336-3343.
- Barry, M. and R. C. Bleackley. 2002. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat.Rev.Immunol.* 2:401-409. doi:10.1038/nri819 [doi].
- Barthson, J., C. M. Germano, F. Moore, A. Maida, D. J. Drucker, P. Marchetti, C. Gysemans, C. Mathieu, G. Nunez, A. Jurisicova, D. L. Eizirik, and E. N. Gurbuz. 2011. Cytokines tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma induce pancreatic beta-cell apoptosis through STAT1-mediated Bim protein activation. *J.Biol.Chem.* 286:39632-39643. doi:M111.253591 [pii];10.1074/jbc.M111.253591 [doi].
- Bates, G. J., S. B. Fox, C. Han, R. D. Leek, J. F. Garcia, A. L. Harris, and A. H. Banham. 2006. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J.Clin.Oncol.* 24:5373-5380. doi:24/34/5373 [pii];10.1200/JCO.2006.05.9584 [doi].
- Battaglia, M., A. Stabilini, and M. G. Roncarolo. 2005. Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. *Blood* 105:4743-4748. doi:2004-10-3932 [pii];10.1182/blood-2004-10-3932 [doi].
- Beckermann, B. M., G. Kallifatidis, A. Groth, D. Frommhold, A. Apel, J. Mattern, A. V. Salnikov, G. Moldenhauer, W. Wagner, A. Diehlmann, R. Saffrich, M. Schubert, A. D. Ho, N. Giese, M. W. Buchler, H. Friess, P. Buchler, and I. Herr. 2008. VEGF expression by mesenchymal stem cells contributes to angiogenesis in pancreatic carcinoma. *Br.J.Cancer* 99:622-631. doi:6604508 [pii];10.1038/sj.bjc.6604508 [doi].
- Beezhold, D. H. and C. Personius. 1992. Fibronectin fragments stimulate tumor necrosis factor secretion by human monocytes. *J.Leukoc.Biol.* 51:59-64.
- Behan, J. W., J. P. Yun, M. P. Proektor, E. A. Ehsanipour, A. Arutyunyan, A. S. Moses, V. I. Avramis, S. G. Louie, A. Butturini, N. Heisterkamp, and S. D. Mittelman. 2009. Adipocytes impair leukemia treatment in mice. *Cancer Res.* 69:7867-7874. doi:0008-5472.CAN-09-0800 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-09-0800 [doi].
- Bekeredjian-Ding, I., M. Schafer, E. Hartmann, R. Pries, M. Parcina, P. Schneider, T. Giese, S. Endres, B. Wollenberg, and G. Hartmann. 2009. Tumour-derived prostaglandin E and transforming growth factor-beta synergize to inhibit plasmacytoid dendritic cell-derived interferon-alpha. *Immunology* 128:439-450. doi:IMM3134 [pii];10.1111/j.1365-2567.2009.03134.x [doi].
- Belotti, D., P. Paganoni, L. Manenti, A. Garofalo, S. Marchini, G. Taraboletti, and R. Giavazzi. 2003. Matrix metalloproteinases (MMP9 and MMP2) induce the release of vascular endothelial growth factor (VEGF) by ovarian carcinoma cells: implications for ascites formation. *Cancer Res.* 63:5224-5229.
- Benevides, L., C. R. Cardoso, D. G. Tiezzi, H. R. Marana, J. M. Andrade, and J. S. Silva. 2013. Enrichment of regulatory T cells in invasive breast tumor correlates with the upregulation of IL-17A expression and
- Bennett, S. R., F. R. Carbone, F. Karamalis, J. F. Miller, and W. R. Heath. 1997. Induction of a CD8+ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4+ T cell help. *J.Exp.Med.* 186:65-70.

- Benson, M. J., K. Pino-Lagos, M. Roseblatt, and R. J. Noelle. 2007. All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *J.Exp.Med.* 204:1765-1774. doi:jem.20070719 [pii];10.1084/jem.20070719 [doi].
- Beppu, R., K. Nakamura, H. Miyajima-Uchida, M. Kuroki, P. D. Khare, Y. Yamauchi, Y. Yamashita, T. Shirakusa, and M. Kuroki. 2001. Soluble thrombospondin-1 suppresses T cell proliferation and enhances IL-10 secretion by antigen presenting cells stimulated with phytohemagglutinin. *Immunol.Invest* 30:143-156.
- Bergers, G., R. Brekken, G. McMahon, T. H. Vu, T. Itoh, K. Tamaki, K. Tanzawa, P. Thorpe, S. Itohara, Z. Werb, and D. Hanahan. 2000. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat.Cell Biol.* 2:737-744. doi:10.1038/35036374 [doi].
- Bergmann, U., H. Funatomi, M. Yokoyama, H. G. Beger, and M. Korc. 1995. Insulin-like growth factor I overexpression in human pancreatic cancer: evidence for autocrine and paracrine roles. *Cancer Res.* 55:2007-2011.
- Bernfield, M., M. Gotte, P. W. Park, O. Reizes, M. L. Fitzgerald, J. Lincecum, and M. Zako. 1999. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu.Rev.Biochem.* 68:729-777. doi:10.1146/annurev.biochem.68.1.729 [doi].
- Betelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner, and V. K. Kuchroo. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441:235-238. doi:nature04753 [pii];10.1038/nature04753 [doi].
- Betelli, E., M. Dastrange, and M. Oukka. 2005. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102:5138-5143. doi:0501675102 [pii];10.1073/pnas.0501675102 [doi].
- Bexell, D., S. Gunnarsson, A. Tormin, A. Darabi, D. Gisselsson, L. Roybon, S. Scheduling, and J. Bengzon. 2009. Bone marrow multipotent mesenchymal stroma cells act as pericyte-like migratory vehicles in experimental gliomas. *Mol.Ther.* 17:183-190. doi:mt2008229 [pii];10.1038/mt.2008.229 [doi].
- Bi, Y., D. Ehrlichou, T. M. Kilts, C. A. Inkson, M. C. Embree, W. Sonoyama, L. Li, A. I. Leet, B. M. Seo, L. Zhang, S. Shi, and M. F. Young. 2007. Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. *Nat.Med.* 13:1219-1227. doi:nm1630 [pii];10.1038/nm1630 [doi].
- Birnbaum, T., J. Hildebrandt, G. Nuebling, P. Sostak, and A. Straube. 2011. Glioblastoma-dependent differentiation and angiogenic potential of human mesenchymal stem cells in vitro. *J.Neurooncol.* 105:57-65. doi:10.1007/s11060-011-0561-1 [doi].
- Bisson, C., S. Blacher, M. Polette, J. F. Blanc, F. Kebers, J. Desreux, B. Tetu, J. Rosenbaum, J. M. Foidart, P. Birembaut, and A. Noel. 2003. Restricted expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase by myofibroblasts adjacent to human breast cancer cells. *Int.J.Cancer* 105:7-13. doi:10.1002/ijc.11012 [doi].
- Biswas, S. K., L. Gangi, S. Paul, T. Schioppa, A. Sacconi, M. Sironi, B. Bottazzi, A. Doni, B. Vincenzo, F. Pasqualini, L. Vago, M. Nebuloni, A. Mantovani, and A. Sica. 2006. A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation). *Blood* 107:2112-2122. doi:2005-01-0428 [pii];10.1182/blood-2005-01-0428 [doi].
- Biswas, S. K. and A. Mantovani. 2010. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat.Immunol.* 11:889-896. doi:ni.1937 [pii];10.1038/ni.1937 [doi].
- Bix, G., R. Castello, M. Burrows, J. J. Zoeller, M. Weech, R. A. Iozzo, C. Cardi, M. L. Thakur, C. A. Barker, K. Camphausen, and R. V. Iozzo. 2006. Endorepellin in vivo: targeting the tumor vasculature and retarding cancer growth and metabolism. *J.Natl.Cancer Inst.* 98:1634-1646. doi:98/22/1634 [pii];10.1093/jnci/djj441 [doi].
- Bix, G., J. Fu, E. M. Gonzalez, L. Macro, A. Barker, S. Campbell, M. M. Zutter, S. A. Santoro, J. K. Kim, M. Hook, C. C. Reed, and R. V. Iozzo. 2004. Endorepellin causes endothelial cell disassembly of actin cytoskeleton and focal adhesions through alpha2beta1 integrin. *J.Cell Biol.* 166:97-109. doi:10.1083/jcb.200401150 [doi];jcb.200401150 [pii].
- Black, R. A., C. T. Rauch, C. J. Kozlosky, J. J. Peschon, J. L. Slack, M. F. Wolfson, B. J. Castner, K. L. Stocking, P. Reddy, S. Srinivasan, N. Nelson, N. Boiani, K. A. Schooley, M. Gerhart, R. Davis, J. N. Fitzner, R. S. Johnson, R. J. Paxton, C. J. March, and D. P. Cerretti. 1997. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385:729-733. doi:10.1038/385729a0 [doi].
- Blackburn, S. D., H. Shin, W. N. Haining, T. Zou, C. J. Workman, A. Polley, M. R. Betts, G. J. Freeman, D. A. Vignali, and E. J. Wherry. 2009. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat.Immunol.* 10:29-37. doi:ni.1679 [pii];10.1038/ni.1679 [doi].
- Bochet, L., C. Lehuède, S. Dauvillier, Y. Y. Wang, B. Dirat, V. Laurent, C. Dray, R. Guiet, I. Maridonneau-Parini, G. S. Le, B. Couderc, G. Escourrou, P. Valet, and C. Muller. 2013. Adipocyte-derived fibroblasts promote tumor progression and contribute to the desmoplastic reaction in breast cancer. *Cancer Res.* 73:5657-5668. doi:0008-5472.CAN-13-0530 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-13-0530 [doi].
- Bode, C., G. Zhao, F. Steinhagen, T. Kinjo, and D. M. Klinman. 2011. CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert.Rev.Vaccines.* 10:499-511. doi:10.1586/erv.10.174 [doi].

- Bol, D. K., K. Kiguchi, I. Gimenez-Conti, T. Rupp, and J. DiGiovanni. 1997. Overexpression of insulin-like growth factor-1 induces hyperplasia, dermal abnormalities, and spontaneous tumor formation in transgenic mice. *Oncogene* 14:1725-1734. doi:10.1038/sj.onc.1201011 [doi].
- Bollyky, P. L., B. A. Falk, R. P. Wu, J. H. Buckner, T. N. Wight, and G. T. Nepom. 2009. Intact extracellular matrix and the maintenance of immune tolerance: high molecular weight hyaluronan promotes persistence of induced CD4+CD25+ regulatory T cells. *J.Leukoc.Biol.* 86:567-572. doi:jlbo.0109001 [pii];10.1189/jlb.0109001 [doi].
- Bollyky, P. L., J. D. Lord, S. A. Masewicz, S. P. Evanko, J. H. Buckner, T. N. Wight, and G. T. Nepom. 2007. Cutting edge: high molecular weight hyaluronan promotes the suppressive effects of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J.Immunol.* 179:744-747. doi:179/2/744 [pii].
- Bollyky, P. L., R. P. Wu, B. A. Falk, J. D. Lord, S. A. Long, A. Preisinger, B. Teng, G. E. Holt, N. E. Standifer, K. R. Braun, C. F. Xie, P. L. Samuels, R. B. Vernon, J. A. Gebe, T. N. Wight, and G. T. Nepom. 2011. ECM components guide IL-10 producing regulatory T-cell (TR1) induction from effector memory T-cell precursors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 108:7938-7943. doi:1017360108 [pii];10.1073/pnas.1017360108 [doi].
- Booth, B. A., M. Boes, D. L. Andress, B. L. Dake, M. C. Kiefer, C. Maack, R. J. Linhardt, K. Bar, E. E. Caldwell, J. Weiler, and . 1995. IGFBP-3 and IGFBP-5 association with endothelial cells: role of C-terminal heparin binding domain. *Growth Regul.* 5:1-17.
- Bopp, T., C. Becker, M. Klein, S. Klein-Hessling, A. Palmethofer, E. Serfling, V. Heib, M. Becker, J. Kubach, S. Schmitt, S. Stoll, H. Schild, M. S. Staeger, M. Stassen, H. Jonuleit, and E. Schmitt. 2007. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J.Exp.Med.* 204:1303-1310. doi:jem.20062129 [pii];10.1084/jem.20062129 [doi].
- Borrego, F., M. Ulbrecht, E. H. Weiss, J. E. Coligan, and A. G. Brooks. 1998. Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis. *J.Exp.Med.* 187:813-818.
- Bos, R. and L. A. Sherman. 2010. CD4+ T-cell help in the tumor milieu is required for recruitment and cytolytic function of CD8+ T lymphocytes. *Cancer Res.* 70:8368-8377. doi:0008-5472.CAN-10-1322 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-10-1322 [doi].
- Bosco, M. C., G. Reffo, M. Puppo, and L. Varesio. 2004. Hypoxia inhibits the expression of the CCR5 chemokine receptor in macrophages. *Cell Immunol.* 228:1-7. doi:10.1016/j.cellimm.2004.03.006 [doi];S0008874904000309 [pii].
- Bossard, C., L. Van den Berghe, H. Laurell, C. Castano, M. Cerutti, A. C. Prats, and H. Prats. 2004. Antiangiogenic properties of fibstatin, an extracellular FGF-2-binding polypeptide. *Cancer Res.* 64:7507-7512. doi:64/20/7507 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-04-0287 [doi].
- Boutet, P., S. Aguera-Gonzalez, S. Atkinson, C. J. Pennington, D. R. Edwards, G. Murphy, H. T. Reyburn, and M. Vales-Gomez. 2009. Cutting edge: the metalloproteinase ADAM17/TNF-alpha-converting enzyme regulates proteolytic shedding of the MHC class I-related chain B protein. *J.Immunol.* 182:49-53. doi:182/1/49 [pii].
- Braber, S., P. J. Koelink, P. A. Henricks, P. L. Jackson, F. P. Nijkamp, J. Garssen, A. D. Kraneveld, J. E. Blalock, and G. Folkerts. 2011. Cigarette smoke-induced lung emphysema in mice is associated with prolyl endopeptidase, an enzyme involved in collagen breakdown. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 300:L255-L265. doi:ajplung.00304.2010 [pii];10.1152/ajplung.00304.2010 [doi].
- Brandt, C. S., M. Baratin, E. C. Yi, J. Kennedy, Z. Gao, B. Fox, B. Haldeman, C. D. Ostrander, T. Kaifu, C. Chabannon, A. Moretta, R. West, W. Xu, E. Vivier, and S. D. Levin. 2009. The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *J.Exp.Med.* 206:1495-1503. doi:jem.20090681 [pii];10.1084/jem.20090681 [doi].
- Braumuller, H., T. Wieder, E. Brenner, S. Assmann, M. Hahn, M. Alkhaled, K. Schilbach, F. Essmann, M. Kneilling, C. Griessinger, F. Ranta, S. Ullrich, R. Mocikat, K. Braungart, T. Mehra, B. Fehrenbacher, J. Berdel, H. Niessner, F. Meier, M. van den Broek, H. U. Haring, R. Handgretinger, L. Quintanilla-Martinez, F. Fend, M. Pesic, J. Bauer, L. Zender, M. Schaller, K. Schulze-Osthoff, and M. Rocken. 2013. T-helper-cell cytokines drive cancer into senescence-1. *Nature* 494:361-365. doi:nature11824 [pii];10.1038/nature11824 [doi].
- Bremnes, R. M., T. Donnem, S. Al-Saad, K. Al-Shibli, S. Andersen, R. Sirera, C. Camps, I. Marinez, and L. T. Busund. 2011. The role of tumor stroma in cancer progression and prognosis: emphasis on carcinoma-associated fibroblasts and non-small cell lung cancer. *J.Thorac.Oncol.* 6:209-217. doi:10.1097/JTO.0b013e3181f8a1bd [doi].
- Brocker, C. N., V. Vasilidou, and D. W. Nebert. 2009. Evolutionary divergence and functions of the ADAM and ADAMTS gene families. *Hum.Genomics* 4:43-55. doi:F00665JT121R6757 [pii].
- Brockman, W. W. and D. Nathans. 1974. The isolation of simian virus 40 variants with specifically altered genomes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 71:942-946.
- Buckanovich, R. J., A. Facciabene, S. Kim, F. Benencia, D. Sasaroli, K. Balint, D. Katsaros, A. O'Brien-Jenkins, P. A. Gimotty, and G. Coukos. 2008. Endothelin B receptor mediates the endothelial barrier to T cell homing to tumors and disables immune therapy. *Nat.Med.* 14:28-36. doi:nm1699 [pii];10.1038/nm1699 [doi].

- Buggert, M., J. Tauriainen, T. Yamamoto, J. Frederiksen, M. A. Ivarsson, J. Michaelsson, O. Lund, B. Hejdeman, M. Jansson, A. Sonnerborg, R. A. Koup, M. R. Betts, and A. C. Karlsson. 2014. T-bet and Eomes are differentially linked to the exhausted phenotype of CD8<sup>+</sup> T cells in HIV infection. *PLoS.Pathog.* 10:e1004251. doi:10.1371/journal.ppat.1004251 [doi];PPATHOGENS-D-14-00459 [pii].
- Bullock, T. N. and H. Yagita. 2005. Induction of CD70 on dendritic cells through CD40 or TLR stimulation contributes to the development of CD8<sup>+</sup> T cell responses in the absence of CD4<sup>+</sup> T cells. *J.Immunol.* 174:710-717. doi:174/2/710 [pii].
- Burchill, M. A., J. Yang, C. Vogtenhuber, B. R. Blazar, and M. A. Farrar. 2007. IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *J.Immunol.* 178:280-290. doi:178/1/280 [pii].
- Byrd, C. M. and D. E. Hruby. 2006. Vaccinia virus proteolysis--a review. *Rev.Med.Virol.* 16:187-202. doi:10.1002/rmv.499 [doi].
- Cai, J., H. Tang, L. Xu, X. Wang, C. Yang, S. Ruan, J. Guo, S. Hu, and Z. Wang. 2012. Fibroblasts in omentum activated by tumor cells promote ovarian cancer growth, adhesion and invasiveness. *Carcinogenesis* 33:20-29. doi:bgr230 [pii];10.1093/carcin/bgr230 [doi].
- Cailhier, J. F., I. Sirois, P. Laplante, S. Lepage, M. A. Raymond, N. Brassard, A. Prat, R. V. Iozzo, A. V. Pshezhetsky, and M. J. Hebert. 2008. Caspase-3 activation triggers extracellular cathepsin L release and endorepellin proteolysis. *J.Biol.Chem.* 283:27220-27229. doi:M801164200 [pii];10.1074/jbc.M801164200 [doi].
- Calalb, M. B., T. R. Polte, and S. K. Hanks. 1995. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Mol.Cell Biol.* 15:954-963.
- Calalb, M. B., X. Zhang, T. R. Polte, and S. K. Hanks. 1996. Focal adhesion kinase tyrosine-861 is a major site of phosphorylation by Src. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 228:662-668. doi:S0006-291X(96)91714-3 [pii];10.1006/bbrc.1996.1714 [doi].
- Calderwood, D. A., R. Zent, R. Grant, D. J. Rees, R. O. Hynes, and M. H. Ginsberg. 1999. The Talin head domain binds to integrin beta subunit cytoplasmic tails and regulates integrin activation. *J.Biol.Chem.* 274:28071-28074.
- Calon, A., E. Espinet, S. Palomo-Ponce, D. V. Tauriello, M. Iglesias, M. V. Cespedes, M. Sevillano, C. Nadal, P. Jung, X. H. Zhang, D. Byrom, A. Riera, D. Rossell, R. Mangues, J. Massague, E. Sancho, and E. Batlle. 2012. Dependency of colorectal cancer on a TGF-beta-driven program in stromal cells for metastasis initiation. *Cancer Cell* 22:571-584. doi:S1535-6108(12)00355-8 [pii];10.1016/j.ccr.2012.08.013 [doi].
- Camisaschi, C., C. Casati, F. Rini, M. Perego, F. A. De, F. Triebel, G. Parmiani, F. Belli, L. Rivoltini, and C. Castelli. 2010. LAG-3 expression defines a subset of CD4(+)CD25(high)Foxp3(+) regulatory T cells that are expanded at tumor sites. *J.Immunol.* 184:6545-6551. doi:jimmunol.0903879 [pii];10.4049/jimmunol.0903879 [doi].
- Camperio, C., S. Caristi, G. Fanelli, M. Soligo, P. P. Del, and E. Piccolella. 2012. Forkhead transcription factor FOXP3 upregulates CD25 expression through cooperation with RelA/NF-kappaB. *PLoS.One.* 7:e48303. doi:10.1371/journal.pone.0048303 [doi];PONE-D-12-23148 [pii].
- Camus, M., M. Tosolini, B. Mlecnik, F. Pages, A. Kirilovsky, A. Berger, A. Costes, G. Bindea, P. Charoentong, P. Bruneval, Z. Trajanoski, W. H. Fridman, and J. Galon. 2009. Coordination of intratumoral immune reaction and human colorectal cancer recurrence. *Cancer Res.* 69:2685-2693. doi:0008-5472.CAN-08-2654 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-08-2654 [doi].
- Cannarile, M. A., N. A. Lind, R. Rivera, A. D. Sheridan, K. A. Camfield, B. B. Wu, K. P. Cheung, Z. Ding, and A. W. Goldrath. 2006. Transcriptional regulator Id2 mediates CD8<sup>+</sup> T cell immunity. *Nat.Immunol.* 7:1317-1325. doi:ni1403 [pii];10.1038/ni1403 [doi].
- Cao, Y., Z. Sun, L. Liao, Y. Meng, Q. Han, and R. C. Zhao. 2005. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 332:370-379. doi:S0006-291X(05)00900-9 [pii];10.1016/j.bbrc.2005.04.135 [doi].
- Carragher, N. O., S. M. Walker, L. A. Scott Carragher, F. Harris, T. K. Sawyer, V. G. Brunton, B. W. Ozanne, and M. C. Frame. 2006. Calpain 2 and Src dependence distinguishes mesenchymal and amoeboid modes of tumour cell invasion: a link to integrin function. *Oncogene* 25:5726-5740. doi:1209582 [pii];10.1038/sj.onc.1209582 [doi].
- Carswell, E. A., L. J. Old, R. L. Kassel, S. Green, N. Fiore, and B. Williamson. 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 72:3666-3670.
- Carter, J. C. and F. C. Church. 2012. Mature breast adipocytes promote breast cancer cell motility. *Exp.Mol.Pathol.* 92:312-317. doi:S0014-4800(12)00034-2 [pii];10.1016/j.yexmp.2012.03.005 [doi].
- Cary, L. A., J. F. Chang, and J. L. Guan. 1996. Stimulation of cell migration by overexpression of focal adhesion kinase and its association with Src and Fyn. *J.Cell Sci.* 109 ( Pt 7):1787-1794.
- Cary, L. A., D. C. Han, T. R. Polte, S. K. Hanks, and J. L. Guan. 1998. Identification of p130Cas as a mediator of focal adhesion kinase-promoted cell migration. *J.Cell Biol.* 140:211-221.
- Casazza, A., D. Laoui, M. Wenes, S. Rizzolio, N. Bassani, M. Mambretti, S. Deschoemaeker, J. A. Van Ginderachter, L. Tamagnone, and M. Mazzone. 2013. Impeding macrophage entry into hypoxic tumor areas by Sema3A/Nrp1

- signaling blockade inhibits angiogenesis and restores antitumor immunity. *Cancer Cell* 24:695-709. doi:S1535-6108(13)00494-7 [pii];10.1016/j.ccr.2013.11.007 [doi].
- Castermans, K., S. P. Tabruyn, R. Zeng, J. R. van Beijnum, C. Eppolito, W. J. Leonard, P. A. Shrikant, and A. W. Griffioen. 2008. Angiostatic activity of the antitumor cytokine interleukin-21. *Blood* 112:4940-4947. doi:blood-2007-09-113878 [pii];10.1182/blood-2007-09-113878 [doi].
- Caux, C., C. Massacrier, B. Vanbervliet, B. Dubois, K. C. Van, I. Durand, and J. Banchereau. 1994. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J.Exp.Med.* 180:1263-1272.
- Cebula, A., M. Seweryn, G. A. Rempala, S. S. Pabla, R. A. McIndoe, T. L. Denning, L. Bry, P. Kraj, P. Kisielow, and L. Ignatowicz. 2013. Thymus-derived regulatory T cells contribute to tolerance to commensal microbiota. *Nature* 497:258-262. doi:nature12079 [pii];10.1038/nature12079 [doi].
- Cella, M., D. Scheidegger, K. Palmer-Lehmann, P. Lane, A. Lanzavecchia, and G. Alber. 1996. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J.Exp.Med.* 184:747-752.
- Chalmin, F., G. Mignot, M. Bruchard, A. Chevriaux, F. Vegran, A. Hichami, S. Ladoire, V. Derangere, J. Vincent, D. Masson, S. C. Robson, G. Eberl, J. R. Pallandre, C. Borg, B. Ryffel, L. Apetoh, C. Rebe, and F. Ghiringhelli. 2012. Stat3 and Gfi-1 transcription factors control Th17 cell immunosuppressive activity via the regulation of ectonucleotidase expression. *Immunity.* 36:362-373. doi:S1074-7613(12)00082-9 [pii];10.1016/j.immuni.2011.12.019 [doi].
- Chang, C. H., J. Hammer, J. E. Loh, W. L. Fodor, and R. A. Flavell. 1992. The activation of major histocompatibility complex class I genes by interferon regulatory factor-1 (IRF-1). *Immunogenetics* 35:378-384.
- Chang, C. I., J. C. Liao, and L. Kuo. 2001. Macrophage arginase promotes tumor cell growth and suppresses nitric oxide-mediated tumor cytotoxicity. *Cancer Res.* 61:1100-1106.
- Chang, H. C., S. Sehra, R. Goswami, W. Yao, Q. Yu, G. L. Stritesky, R. Jabeen, C. McKinley, A. N. Ahyi, L. Han, E. T. Nguyen, M. J. Robertson, N. B. Perumal, R. S. Tepper, S. L. Nutt, and M. H. Kaplan. 2010. The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. *Nat.Immunol.* 11:527-534. doi:ni.1867 [pii];10.1038/ni.1867 [doi].
- Chang, H. C., S. Zhang, V. T. Thieu, R. B. Slee, H. A. Bruns, R. N. Laribee, M. J. Klemsz, and M. H. Kaplan. 2005. PU.1 expression delineates heterogeneity in primary Th2 cells. *Immunity.* 22:693-703. doi:S1074-7613(05)00138-X [pii];10.1016/j.immuni.2005.03.016 [doi].
- Chang, J. T., E. J. Wherry, and A. W. Goldrath. 2014. Molecular regulation of effector and memory T cell differentiation. *Nat.Immunol.* 15:1104-1115. doi:ni.3031 [pii];10.1038/ni.3031 [doi].
- Chang, L. Y., Y. C. Lin, J. Mahalingam, C. T. Huang, T. W. Chen, C. W. Kang, H. M. Peng, Y. Y. Chu, J. M. Chiang, A. Dutta, Y. J. Day, T. C. Chen, C. T. Yeh, and C. Y. Lin. 2012. Tumor-derived chemokine CCL5 enhances TGF-beta-mediated killing of CD8(+) T cells in colon cancer by T-regulatory cells. *Cancer Res.* 72:1092-1102. doi:0008-5472.CAN-11-2493 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-11-2493 [doi].
- Chang, S. H., S. G. Mirabolfathinejad, H. Katta, A. M. Cumpian, L. Gong, M. S. Caetano, S. J. Moghaddam, and C. Dong. 2014. T helper 17 cells play a critical pathogenic role in lung cancer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 111:5664-5669. doi:1319051111 [pii];10.1073/pnas.1319051111 [doi].
- Chang, Y., N. P. de, I. Azzaoui, O. Morales, N. Delhem, H. Vornig, S. Tomavo, Y. S. Ait, G. Zhang, B. Wallaert, C. Chenivresse, and A. Tscopoulos. 2010. The chemokine CCL18 generates adaptive regulatory T cells from memory CD4+ T cells of healthy but not allergic subjects. *FASEB J.* 24:5063-5072. doi:fj.10-162560 [pii];10.1096/fj.10-162560 [doi].
- Chang, Y. C., T. C. Chen, C. T. Lee, C. Y. Yang, H. W. Wang, C. C. Wang, and S. L. Hsieh. 2008. Epigenetic control of MHC class II expression in tumor-associated macrophages by decoy receptor 3. *Blood* 111:5054-5063. doi:blood-2007-12-130609 [pii];10.1182/blood-2007-12-130609 [doi].
- Chanmee, T., P. Ontong, K. Konno, and N. Itano. 2014. Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers.(Basel)* 6:1670-1690. doi:cancers6031670 [pii];10.3390/cancers6031670 [doi].
- Chappert, P. and R. H. Schwartz. 2010. Induction of T cell anergy: integration of environmental cues and infectious tolerance. *Curr.Opin.Immunol.* 22:552-559. doi:S0952-7915(10)00114-7 [pii];10.1016/j.coi.2010.08.005 [doi].
- Charles, K. A., H. Kulbe, R. Soper, M. Escorcio-Correia, T. Lawrence, A. Schultheis, P. Chakravarty, R. G. Thompson, G. Kollias, J. F. Smyth, F. R. Balkwill, and T. Hagemann. 2009. The tumor-promoting actions of TNF-alpha involve TNFR1 and IL-17 in ovarian cancer in mice and humans. *J.Clin.Invest* 119:3011-3023. doi:39065 [pii];10.1172/JCI39065 [doi].
- Chatterjee, S., S. Das, P. Chakraborty, A. Manna, M. Chatterjee, and S. K. Choudhuri. 2013. Myeloid derived suppressor cells (MDSCs) can induce the generation of Th17 response from naive CD4+ T cells. *Immunobiology* 218:718-724. doi:S0171-2985(12)00477-9 [pii];10.1016/j.imbio.2012.08.271 [doi].

- Chaudhry, A., D. Rudra, P. Treuting, R. M. Samstein, Y. Liang, A. Kas, and A. Y. Rudensky. 2009. CD4+ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. *Science* 326:986-991. doi:1172702 [pii];10.1126/science.1172702 [doi].
- Chen, C., Y. Shen, Q. X. Qu, X. Q. Chen, X. G. Zhang, and J. A. Huang. 2013. Induced expression of B7-H3 on the lung cancer cells and macrophages suppresses T-cell mediating anti-tumor immune response. *Exp.Cell Res.* 319:96-102. doi:S0014-4827(12)00398-9 [pii];10.1016/j.yexcr.2012.09.006 [doi].
- Chen, H., X. Liu, E. S. Clayman, F. Shao, M. Xiao, X. Tian, W. Fu, C. Zhang, B. Ruan, P. Zhou, Z. Liu, Y. Wang, and W. Rui. 2015. Synthesis and Evaluation of a CBZ-AAN-Dox Prodrug and its in vitro Effects on SiHa Cervical Cancer Cells Under Hypoxic Conditions. *Chem.Biol Drug Des.* doi:10.1111/cbdd.12525 [doi].
- Chen, H. C., P. A. Appeddu, H. Isoda, and J. L. Guan. 1996. Phosphorylation of tyrosine 397 in focal adhesion kinase is required for binding phosphatidylinositol 3-kinase. *J.Biol.Chem.* 271:26329-26334.
- Chen, H. C., P. A. Appeddu, J. T. Parsons, J. D. Hildebrand, M. D. Schaller, and J. L. Guan. 1995. Interaction of focal adhesion kinase with cytoskeletal protein talin. *J.Biol.Chem.* 270:16995-16999.
- Chen, H. C. and J. L. Guan. 1994. Association of focal adhesion kinase with its potential substrate phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91:10148-10152.
- Chen, H. L., D. Gabrilovich, R. Tampe, K. R. Girgis, S. Nadaf, and D. P. Carbone. 1996. A functionally defective allele of TAP1 results in loss of MHC class I antigen presentation in a human lung cancer. *Nat.Genet.* 13:210-213. doi:10.1038/ng0696-210 [doi].
- Chen, J. M., P. M. Dando, R. A. Stevens, M. Fortunato, and A. J. Barrett. 1998. Cloning and expression of mouse legumain, a lysosomal endopeptidase. *Biochem.J.* 335 ( Pt 1):111-117.
- Chen, J. M., M. Fortunato, and A. J. Barrett. 2000. Activation of human prolegumain by cleavage at a C-terminal asparagine residue. *Biochem.J.* 352 Pt 2:327-334.
- Chen, J. M., M. Fortunato, R. A. Stevens, and A. J. Barrett. 2001. Activation of progelatinase A by mammalian legumain, a recently discovered cysteine proteinase. *Biol.Chem.* 382:777-783. doi:10.1515/BC.2001.093 [doi].
- Chen, K., J. P. McAleer, Y. Lin, D. L. Paterson, M. Zheng, J. F. Alcorn, C. T. Weaver, and J. K. Kolls. 2011. Th17 cells mediate clade-specific, serotype-independent mucosal immunity. *Immunity.* 35:997-1009. doi:S1074-7613(11)00514-0 [pii];10.1016/j.immuni.2011.10.018 [doi].
- Chen, L. and D. B. Flies. 2013. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat.Rev.Immunol.* 13:227-242. doi:nri3405 [pii];10.1038/nri3405 [doi].
- Chen, L., E. E. Tredget, P. Y. Wu, and Y. Wu. 2008. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS.One.* 3:e1886. doi:10.1371/journal.pone.0001886 [doi].
- Chen, M. L., M. J. Pittet, L. Gorelik, R. A. Flavell, R. Weissleder, B. H. von, and K. Khazaie. 2005. Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102:419-424. doi:0408197102 [pii];10.1073/pnas.0408197102 [doi].
- Chen, Q., W. Yang, S. Gupta, P. Biswas, P. Smith, G. Bhagat, and A. B. Pernis. 2008. IRF-4-binding protein inhibits interleukin-17 and interleukin-21 production by controlling the activity of IRF-4 transcription factor. *Immunity.* 29:899-911. doi:S1074-7613(08)00502-5 [pii];10.1016/j.immuni.2008.10.011 [doi].
- Chen, S. Y. and H. C. Chen. 2006. Direct interaction of focal adhesion kinase (FAK) with Met is required for FAK to promote hepatocyte growth factor-induced cell invasion. *Mol.Cell Biol.* 26:5155-5167. doi:26/13/5155 [pii];10.1128/MCB.02186-05 [doi].
- Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K. J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady, and S. M. Wahl. 2003. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J.Exp.Med.* 198:1875-1886. doi:10.1084/jem.20030152 [doi];jem.20030152 [pii].
- Chen, X., J. Wan, J. Liu, W. Xie, X. Diao, J. Xu, B. Zhu, and Z. Chen. 2010. Increased IL-17-producing cells correlate with poor survival and lymphangiogenesis in NSCLC patients. *Lung Cancer* 69:348-354. doi:S0169-5002(09)00590-X [pii];10.1016/j.lungcan.2009.11.013 [doi].
- Cheng, G. Z., W. Z. Zhang, M. Sun, Q. Wang, D. Coppola, M. Mansour, L. M. Xu, C. Costanzo, J. Q. Cheng, and L. H. Wang. 2008. Twist is transcriptionally induced by activation of STAT3 and mediates STAT3 oncogenic function. *J.Biol.Chem.* 283:14665-14673. doi:M707429200 [pii];10.1074/jbc.M707429200 [doi].
- Chinnadurai, R., I. B. Copland, S. R. Patel, and J. Galipeau. 2014. IDO-independent suppression of T cell effector function by IFN-gamma-licensed human mesenchymal stromal cells. *J.Immunol.* 192:1491-1501. doi:jimmunol.1301828 [pii];10.4049/jimmunol.1301828 [doi].
- Chiquet-Ehrismann, R., M. Tannheimer, M. Koch, A. Brunner, J. Spring, D. Martin, S. Baumgartner, and M. Chiquet. 1994. Tenascin-C expression by fibroblasts is elevated in stressed collagen gels. *J.Cell Biol.* 127:2093-2101.
- Cho, Y., M. Miyamoto, K. Kato, A. Fukunaga, T. Shichinohe, Y. Kawarada, Y. Hida, T. Oshikiri, T. Kurokawa, M. Suzuoki, Y. Nakakubo, K. Hiraoka, S. Murakami, T. Shinohara, T. Itoh, S. Okushiba, S. Kondo, and H. Katoh. 2003.

- CD4+ and CD8+ T cells cooperate to improve prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 63:1555-1559.
- Choi, S. and R. H. Schwartz. 2007. Molecular mechanisms for adaptive tolerance and other T cell anergy models. *Semin.Immunol.* 19:140-152. doi:S1044-5323(07)00010-3 [pii];10.1016/j.smim.2007.02.005 [doi].
- Chomarat, P., J. Banchereau, J. Davoust, and A. K. Palucka. 2000. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat.Immunol.* 1:510-514. doi:10.1038/82763 [doi].
- Christiansen, V. J., K. W. Jackson, K. N. Lee, and P. A. McKee. 2007. Effect of fibroblast activation protein and alpha2-antiplasmin cleaving enzyme on collagen types I, III, and IV. *Arch.Biochem.Biophys.* 457:177-186. doi:S0003-9861(06)00437-1 [pii];10.1016/j.abb.2006.11.006 [doi].
- Chuang, C. M., T. Hoory, A. Monie, A. Wu, M. C. Wang, and C. F. Hung. 2009. Enhancing therapeutic HPV DNA vaccine potency through depletion of CD4+CD25+ T regulatory cells. *Vaccine* 27:684-689. doi:S0264-410X(08)01574-0 [pii];10.1016/j.vaccine.2008.11.042 [doi].
- Chung, D. J., M. Rossi, E. Romano, J. Ghith, J. Yuan, D. H. Munn, and J. W. Young. 2009. Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing mature human monocyte-derived dendritic cells expand potent autologous regulatory T cells. *Blood* 114:555-563. doi:10.1182/blood-2008-11-191197 [pii];10.1182/blood-2008-11-191197 [doi].
- Chung, Y., S. H. Chang, G. J. Martinez, X. O. Yang, R. Nurieva, H. S. Kang, L. Ma, S. S. Watowich, A. M. Jetten, Q. Tian, and C. Dong. 2009. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity.* 30:576-587. doi:S1074-7613(09)00142-3 [pii];10.1016/j.immuni.2009.02.007 [doi].
- Churg, A., R. D. Wang, H. Tai, X. Wang, C. Xie, J. Dai, S. D. Shapiro, and J. L. Wright. 2003. Macrophage metalloelastase mediates acute cigarette smoke-induced inflammation via tumor necrosis factor-alpha release. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 167:1083-1089. doi:10.1164/rccm.200212-1396OC [doi];200212-1396OC [pii].
- Ciofani, M., A. Madar, C. Galan, M. Sellars, K. Mace, F. Pauli, A. Agarwal, W. Huang, C. N. Parkurst, M. Muratet, K. M. Newberry, S. Meadows, A. Greenfield, Y. Yang, P. Jain, F. K. Kirigin, C. Birchmeier, E. F. Wagner, K. M. Murphy, R. M. Myers, R. Bonneau, and D. R. Littman. 2012. A validated regulatory network for Th17 cell specification. *Cell* 151:289-303. doi:S0092-8674(12)01123-3 [pii];10.1016/j.cell.2012.09.016 [doi].
- Clark, C. E., S. R. Hingorani, R. Mick, C. Combs, D. A. Tuveson, and R. H. Vonderheide. 2007. Dynamics of the immune reaction to pancreatic cancer from inception to invasion. *Cancer Res.* 67:9518-9527. doi:67/19/9518 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-07-0175 [doi].
- Clemmons, D. R. 1997. Insulin-like growth factor binding proteins and their role in controlling IGF actions. *Cytokine Growth Factor Rev.* 8:45-62. doi:S1359610196000536 [pii].
- Cobbold, S. P., E. Adams, C. A. Farquhar, K. F. Nolan, D. Howie, K. O. Lui, P. J. Fairchild, A. L. Mellor, D. Ron, and H. Waldmann. 2009. Infectious tolerance via the consumption of essential amino acids and mTOR signaling. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 106:12055-12060. doi:0903919106 [pii];10.1073/pnas.0903919106 [doi].
- Codarri, L., G. Gyulveszi, V. Tosevski, L. Hesske, A. Fontana, L. Magnenat, T. Suter, and B. Becher. 2011. RORgammat drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat.Immunol.* 12:560-567. doi:ni.2027 [pii];10.1038/ni.2027 [doi].
- Coffelt, S. B., F. C. Marini, K. Watson, K. J. Zvezdaryk, J. L. Dembinski, H. L. LaMarca, S. L. Tomchuck, B. K. Honer zu, E. S. Danka, S. L. Henkle, and A. B. Scandurro. 2009. The pro-inflammatory peptide LL-37 promotes ovarian tumor progression through recruitment of multipotent mesenchymal stromal cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 106:3806-3811. doi:0900244106 [pii];10.1073/pnas.0900244106 [doi].
- Colorado, P. C., A. Torre, G. Kamphaus, Y. Maeshima, H. Hopfer, K. Takahashi, R. Volk, E. D. Zamborsky, S. Herman, P. K. Sarkar, M. B. Ericksen, M. Dhanabal, M. Simons, M. Post, D. W. Kufe, R. R. Weichselbaum, V. P. Sukhatme, and R. Kalluri. 2000. Anti-angiogenic cues from vascular basement membrane collagen. *Cancer Res.* 60:2520-2526.
- Condeelis, J. and J. W. Pollard. 2006. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 124:263-266. doi:S0092-8674(06)00055-9 [pii];10.1016/j.cell.2006.01.007 [doi].
- Conway, R. E., K. Joiner, A. Patterson, D. Bourgeois, R. Rampp, B. C. Hannah, S. McReynolds, J. M. Elder, H. Gilfilen, and L. H. Shapiro. 2013. Prostate specific membrane antigen produces pro-angiogenic laminin peptides downstream of matrix metalloprotease-2. *Angiogenesis.* 16:847-860. doi:10.1007/s10456-013-9360-y [doi].
- Coombes, J. L., K. R. Siddiqui, C. V. Arancibia-Carcamo, J. Hall, C. M. Sun, Y. Belkaid, and F. Powrie. 2007. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J.Exp.Med.* 204:1757-1764. doi:jem.20070590 [pii];10.1084/jem.20070590 [doi].
- Corcoran, K. E., K. A. Trzaska, H. Fernandes, M. Bryan, M. Taborga, V. Srinivas, K. Packman, P. S. Patel, and P. Rameshwar. 2008. Mesenchymal stem cells in early entry of breast cancer into bone marrow. *PLoS.One.* 3:e2563. doi:10.1371/journal.pone.0002563 [doi].

- Cornelius, L. A., L. C. Nehring, E. Harding, M. Bolanowski, H. G. Welgus, D. K. Kobayashi, R. A. Pierce, and S. D. Shapiro. 1998. Matrix metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization. *J.Immunol.* 161:6845-6852.
- Cote-Sierra, J., G. Foucras, L. Guo, L. Chiodetti, H. A. Young, J. Hu-Li, J. Zhu, and W. E. Paul. 2004. Interleukin 2 plays a central role in Th2 differentiation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101:3880-3885. doi:10.1073/pnas.0400339101 [doi];0400339101 [pii].
- Coulson-Thomas, V. J., T. F. Gesteira, Y. M. Coulson-Thomas, C. M. Vicente, I. L. Tersariol, H. B. Nader, and L. Toma. 2010. Fibroblast and prostate tumor cell cross-talk: fibroblast differentiation, TGF-beta, and extracellular matrix down-regulation. *Exp.Cell Res.* 316:3207-3226. doi:S0014-4827(10)00399-X [pii];10.1016/j.yexcr.2010.08.005 [doi].
- Coussens, L. M., B. Fingleton, and L. M. Matrisian. 2002. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* 295:2387-2392. doi:10.1126/science.1067100 [doi];295/5564/2387 [pii].
- Cramer, T., Y. Yamanishi, B. E. Clausen, I. Forster, R. Pawlinski, N. Mackman, V. H. Haase, R. Jaenisch, M. Corr, V. Nizet, G. S. Firestein, H. P. Gerber, N. Ferrara, and R. S. Johnson. 2003. HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell* 112:645-657. doi:S0092867403001545 [pii].
- Crane, C. A., S. J. Han, J. J. Barry, B. J. Ahn, L. L. Lanier, and A. T. Parsa. 2010. TGF-beta downregulates the activating receptor NKG2D on NK cells and CD8+ T cells in glioma patients. *Neuro.Oncol.* 12:7-13. doi:nop009 [pii];10.1093/neuonc/nop009 [doi].
- Crawford, Y., I. Kasman, L. Yu, C. Zhong, X. Wu, Z. Modrusan, J. Kaminker, and N. Ferrara. 2009. PDGF-C mediates the angiogenic and tumorigenic properties of fibroblasts associated with tumors refractory to anti-VEGF treatment. *Cancer Cell* 15:21-34. doi:S1535-6108(08)00407-8 [pii];10.1016/j.ccr.2008.12.004 [doi].
- Crespo, J., H. Sun, T. H. Welling, Z. Tian, and W. Zou. 2013. T cell anergy, exhaustion, senescence, and stemness in the tumor microenvironment. *Curr.Opin.Immunol.* 25:214-221. doi:S0952-7915(12)00193-8 [pii];10.1016/j.coi.2012.12.003 [doi].
- Crisostomo, P. R., Y. Wang, T. A. Markel, M. Wang, T. Lahm, and D. R. Meldrum. 2008. Human mesenchymal stem cells stimulated by TNF-alpha, LPS, or hypoxia produce growth factors by an NF kappa B- but not JNK-dependent mechanism. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 294:C675-C682. doi:00437.2007 [pii];10.1152/ajpcell.00437.2007 [doi].
- Cui, W., Y. Liu, J. S. Weinstein, J. Craft, and S. M. Kaech. 2011. An interleukin-21-interleukin-10-STAT3 pathway is critical for functional maturation of memory CD8+ T cells. *Immunity.* 35:792-805. doi:S1074-7613(11)00465-1 [pii];10.1016/j.immuni.2011.09.017 [doi].
- Cullen, K. J., H. S. Smith, S. Hill, N. Rosen, and M. E. Lippman. 1991. Growth factor messenger RNA expression by human breast fibroblasts from benign and malignant lesions. *Cancer Res.* 51:4978-4985.
- Curiel, T. J., G. Coukos, L. Zou, X. Alvarez, P. Cheng, P. Mottram, M. Evdemon-Hogan, J. R. Conejo-Garcia, L. Zhang, M. Burow, Y. Zhu, S. Wei, I. Kryczek, B. Daniel, A. Gordon, L. Myers, A. Lackner, M. L. Disis, K. L. Knutson, L. Chen, and W. Zou. 2004. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat.Med.* 10:942-949. doi:10.1038/nm1093 [doi];nm1093 [pii].
- Curotto de Lafaille, M. A. and J. J. Lafaille. 2009. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity.* 30:626-635. doi:S1074-7613(09)00199-X [pii];10.1016/j.immuni.2009.05.002 [doi].
- Curtsinger, J. M., D. C. Lins, and M. F. Mescher. 2003. Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function. *J.Exp.Med.* 197:1141-1151. doi:10.1084/jem.20021910 [doi];jem.20021910 [pii].
- D'Souza, W. N. and L. Lefrancois. 2003. IL-2 is not required for the initiation of CD8 T cell cycling but sustains expansion. *J.Immunol.* 171:5727-5735.
- Dall, E. and H. Brandstetter. 2013. Mechanistic and structural studies on legumain explain its zymogenicity, distinct activation pathways, and regulation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 110:10940-10945. doi:1300686110 [pii];10.1073/pnas.1300686110 [doi].
- Dallas, S. L., J. L. Rosser, G. R. Mundy, and L. F. Bonewald. 2002. Proteolysis of latent transforming growth factor-beta (TGF-beta)-binding protein-1 by osteoclasts. A cellular mechanism for release of TGF-beta from bone matrix. *J.Biol.Chem.* 277:21352-21360. doi:10.1074/jbc.M111663200 [doi];M111663200 [pii].
- Damon, D. H., R. R. Lobb, P. A. D'Amore, and J. A. Wagner. 1989. Heparin potentiates the action of acidic fibroblast growth factor by prolonging its biological half-life. *J.Cell Physiol* 138:221-226. doi:10.1002/jcp.1041380202 [doi].
- Daniel, C., B. Weigmann, R. Bronson, and B. H. von. 2011. Prevention of type 1 diabetes in mice by tolerogenic vaccination with a strong agonist insulin mimetope. *J.Exp.Med.* 208:1501-1510. doi;jem.20110574 [pii];10.1084/jem.20110574 [doi].

- Daniel, V., M. Sadeghi, H. Wang, and G. Opelz. 2013. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD178<sup>+</sup> human induced Treg (iTreg) contribute to suppression of alloresponses by apoptosis of responder cells. *Hum.Immunol.* 74:151-162. doi:S0198-8859(12)00561-7 [pii];10.1016/j.humimm.2012.09.010 [doi].
- Dardalhon, V., A. Awasthi, H. Kwon, G. Galileos, W. Gao, R. A. Sobel, M. Mitsdoerffer, T. B. Strom, W. Elyaman, I. C. Ho, S. Khoury, M. Oukka, and V. K. Kuchroo. 2008. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3<sup>+</sup> T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> Foxp3(-) effector T cells. *Nat.Immunol.* 9:1347-1355. doi:ni.1677 [pii];10.1038/ni.1677 [doi].
- Das, J., G. Ren, L. Zhang, A. I. Roberts, X. Zhao, A. L. Bothwell, K. L. Van, Y. Shi, and G. Das. 2009. Transforming growth factor beta is dispensable for the molecular orchestration of Th17 cell differentiation. *J.Exp.Med.* 206:2407-2416. doi:jem.20082286 [pii];10.1084/jem.20082286 [doi].
- Dass, K., A. Ahmad, A. S. Azmi, S. H. Sarkar, and F. H. Sarkar. 2008. Evolving role of uPA/uPAR system in human cancers. *Cancer Treat.Rev.* 34:122-136. doi:S0305-7372(07)00181-8 [pii];10.1016/j.ctrv.2007.10.005 [doi].
- Davidson, T. S., R. J. DiPaolo, J. Andersson, and E. M. Shevach. 2007. Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3<sup>+</sup> T regulatory cells. *J.Immunol.* 178:4022-4026. doi:178/7/4022 [pii].
- Davis, G. E., K. J. Bayless, M. J. Davis, and G. A. Meininger. 2000. Regulation of tissue injury responses by the exposure of matricryptic sites within extracellular matrix molecules. *Am.J.Pathol.* 156:1489-1498. doi:S0002-9440(10)65020-1 [pii];10.1016/S0002-9440(10)65020-1 [doi].
- de la Motte, C., J. Nigro, A. Vasanji, H. Rho, S. Kessler, S. Bandyopadhyay, S. Danese, C. Fiocchi, and R. Stern. 2009. Platelet-derived hyaluronidase 2 cleaves hyaluronan into fragments that trigger monocyte-mediated production of proinflammatory cytokines. *Am.J.Pathol.* 174:2254-2264. doi:S0002-9440(10)61084-X [pii];10.2353/ajpath.2009.080831 [doi].
- De, B. A., P. Pauwels, K. Hensen, J. L. Rummens, W. Westbroek, A. Hendrix, D. Maynard, H. Denys, K. Lambein, G. Braems, C. Gespach, M. Bracke, and W. O. De. 2013. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote colorectal cancer progression through paracrine neuregulin 1/HER3 signalling. *Gut* 62:550-560. doi:gutjnl-2011-301393 [pii];10.1136/gutjnl-2011-301393 [doi].
- De, M. L., M. Reni, E. Tassi, D. Clavenna, I. Papa, H. Recalde, M. Braga, C. Di, V. C. Doglioni, and M. P. Protti. 2011. Intratumor T helper type 2 cell infiltrate correlates with cancer-associated fibroblast thymic stromal lymphopoietin production and reduced survival in pancreatic cancer. *J.Exp.Med.* 208:469-478. doi:jem.20101876 [pii];10.1084/jem.20101876 [doi].
- Deaglio, S., K. M. Dwyer, W. Gao, D. Friedman, A. Usheva, A. Erat, J. F. Chen, K. Enjoji, J. Linden, M. Oukka, V. K. Kuchroo, T. B. Strom, and S. C. Robson. 2007. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J.Exp.Med.* 204:1257-1265. doi:jem.20062512 [pii];10.1084/jem.20062512 [doi].
- Dean, H. J., D. Fuller, and J. E. Osorio. 2003. Powder and particle-mediated approaches for delivery of DNA and protein vaccines into the epidermis. *Comp Immunol.Microbiol.Infect.Dis.* 26:373-388. doi:S0147-9571(03)00021-3 [pii];10.1016/S0147-9571(03)00021-3 [doi].
- Debret, R., F. Antonicelli, A. Theill, W. Hornebeck, P. Bernard, M. Guenounou, and N. R. Le. 2005. Elastin-derived peptides induce a T-helper type 1 polarization of human blood lymphocytes. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 25:1353-1358. doi:01.ATV.0000168412.50855.9f [pii];10.1161/01.ATV.0000168412.50855.9f [doi].
- Debret, R., R. R. Le Naour, J. M. Sallenave, A. Deshorgue, W. G. Hornebeck, M. Guenounou, P. Bernard, and F. D. Antonicelli. 2006. Elastin fragments induce IL-1beta upregulation via NF-kappaB pathway in melanoma cells. *J.Invest Dermatol.* 126:1860-1868. doi:5700337 [pii];10.1038/sj.jid.5700337 [doi].
- del, R. A., R. Perez-Jimenez, R. Liu, P. Roca-Cusachs, J. M. Fernandez, and M. P. Sheetz. 2009. Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding. *Science* 323:638-641. doi:323/5914/638 [pii];10.1126/science.1162912 [doi].
- Demeure, C. E., H. Tanaka, V. Mateo, M. Rubio, G. Delespesse, and M. Sarfati. 2000. CD47 engagement inhibits cytokine production and maturation of human dendritic cells. *J.Immunol.* 164:2193-2199. doi:ji\_v164n4p2193 [pii].
- DeNardo, D. G., J. B. Barreto, P. Andreu, L. Vazquez, D. Tawfik, N. Kolhatkar, and L. M. Coussens. 2009. CD4(+)-T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer Cell* 16:91-102. doi:S1535-6108(09)00216-5 [pii];10.1016/j.ccr.2009.06.018 [doi].
- Denburg, J. A., J. E. Silver, and J. S. Abrams. 1991. Interleukin-5 is a human basophilopoietin: induction of histamine content and basophilic differentiation of HL-60 cells and of peripheral blood basophil-eosinophil progenitors. *Blood* 77:1462-1468.
- Deng, Y., S. Yi, G. Wang, J. Cheng, Y. Zhang, W. Chen, Y. Tai, S. Chen, G. Chen, W. Liu, Q. Zhang, and Y. Yang. 2014. Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells Instruct Dendritic Cells to Acquire Tolerogenic Phenotypes Through the IL-6-Mediated Upregulation of SOCS1. *Stem Cells Dev.* 23:2080-2092. doi:10.1089/scd.2013.0559 [doi].

- Derhovanessian, E., V. Adams, K. Hahnel, A. Groeger, H. Pandha, S. Ward, and G. Pawelec. 2009. Pretreatment frequency of circulating IL-17+ CD4+ T-cells, but not Tregs, correlates with clinical response to whole-cell vaccination in prostate cancer patients. *Int.J.Cancer* 125:1372-1379. doi:10.1002/ijc.24497 [doi].
- Diehl, S., J. Anguita, A. Hoffmeyer, T. Zapton, J. N. Ihle, E. Fikrig, and M. Rincon. 2000. Inhibition of Th1 differentiation by IL-6 is mediated by SOCS1. *Immunity*. 13:805-815. doi:S1074-7613(00)00078-9 [pii].
- Dirat, B., L. Bochet, M. Dabek, D. Daviaud, S. Dauvillier, B. Majed, Y. Y. Wang, A. Meulle, B. Salles, G. S. Le, I. Garrido, G. Escourrou, P. Valet, and C. Muller. 2011. Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer Res.* 71:2455-2465. doi:71/7/2455 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-10-3323 [doi].
- Direkze, N. C., K. Hodivala-Dilke, R. Jeffery, T. Hunt, R. Poulson, D. Oukrif, M. R. Alison, and N. A. Wright. 2004. Bone marrow contribution to tumor-associated myofibroblasts and fibroblasts. *Cancer Res.* 64:8492-8495. doi:64/23/8492 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-04-1708 [doi].
- Djouad, F., L. M. Charbonnier, C. Bouffi, P. Louis-Pence, C. Bony, F. Apparailly, C. Cantos, C. Jorgensen, and D. Noel. 2007. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem Cells* 25:2025-2032. doi:2006-0548 [pii];10.1634/stemcells.2006-0548 [doi].
- Djuretic, I. M., D. Levanon, V. Negreanu, Y. Groner, A. Rao, and K. M. Ansel. 2007. Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate Ifng and silence Il4 in T helper type 1 cells. *Nat.Immunol.* 8:145-153. doi:ni1424 [pii];10.1038/ni1424 [doi].
- Dominici, M., B. K. Le, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop, and E. Horwitz. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 8:315-317. doi:Q2183N8UT042W62H [pii];10.1080/14653240600855905 [doi].
- Dong, H., S. E. Strome, D. R. Salomao, H. Tamura, F. Hirano, D. B. Flies, P. C. Roche, J. Lu, G. Zhu, K. Tamada, V. A. Lennon, E. Celis, and L. Chen. 2002. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat.Med.* 8:793-800. doi:10.1038/nm730 [doi];nm730 [pii].
- Dong, J., J. Grunstein, M. Tejada, F. Peale, G. Frantz, W. C. Liang, W. Bai, L. Yu, J. Kowalski, X. Liang, G. Fuh, H. P. Gerber, and N. Ferrara. 2004. VEGF-null cells require PDGFR alpha signaling-mediated stromal fibroblast recruitment for tumorigenesis. *EMBO J.* 23:2800-2810. doi:10.1038/sj.emboj.7600289 [doi];7600289 [pii].
- Du, J., C. Huang, B. Zhou, and S. F. Ziegler. 2008. Isoform-specific inhibition of ROR alpha-mediated transcriptional activation by human FOXP3. *J.Immunol.* 180:4785-4792. doi:180/7/4785 [pii].
- Duhen, T., R. Duhen, A. Lanzavecchia, F. Sallusto, and D. J. Campbell. 2012. Functionally distinct subsets of human FOXP3+ Treg cells that phenotypically mirror effector Th cells. *Blood* 119:4430-4440. doi:blood-2011-11-392324 [pii];10.1182/blood-2011-11-392324 [doi].
- Duluc, D., M. Corvaisier, S. Blanchard, L. Catala, P. Descamps, E. Gamelin, S. Ponsoda, Y. Delneste, M. Hebbar, and P. Jeannin. 2009. Interferon-gamma reverses the immunosuppressive and protumoral properties and prevents the generation of human tumor-associated macrophages. *Int.J.Cancer* 125:367-373. doi:10.1002/ijc.24401 [doi].
- Dumont, P., A. Berton, N. Nagy, F. Sandras, S. Tinton, P. Demetter, F. Mascart, A. Allaoui, C. Decaestecker, and I. Salmon. 2008. Expression of galectin-3 in the tumor immune response in colon cancer. *Lab Invest* 88:896-906. doi:labinvest200854 [pii];10.1038/labinvest.2008.54 [doi].
- Dunn, G. P., A. T. Bruce, H. Ikeda, L. J. Old, and R. D. Schreiber. 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat.Immunol.* 3:991-998. doi:10.1038/ni1102-991 [doi];ni1102-991 [pii].
- Dunn, G. P., K. C. Sheehan, L. J. Old, and R. D. Schreiber. 2005. IFN unresponsiveness in LNCaP cells due to the lack of JAK1 gene expression. *Cancer Res.* 65:3447-3453. doi:65/8/3447 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-04-4316 [doi].
- Duramad, O., K. L. Fearon, J. H. Chan, H. Kanzler, J. D. Marshall, R. L. Coffman, and F. J. Barrat. 2003. IL-10 regulates plasmacytoid dendritic cell response to CpG-containing immunostimulatory sequences. *Blood* 102:4487-4492. doi:10.1182/blood-2003-07-2465 [doi];2003-07-2465 [pii].
- Durant, L., W. T. Watford, H. L. Ramos, A. Laurence, G. Vahedi, L. Wei, H. Takahashi, H. W. Sun, Y. Kanno, F. Powrie, and J. J. O'Shea. 2010. Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis. *Immunity*. 32:605-615. doi:S1074-7613(10)00169-X [pii];10.1016/j.immuni.2010.05.003 [doi].
- Dure, M. and F. Macian. 2009. IL-2 signaling prevents T cell anergy by inhibiting the expression of anergy-inducing genes. *Mol.Immunol.* 46:999-1006. doi:S0161-5890(08)00695-0 [pii];10.1016/j.molimm.2008.09.029 [doi].
- Dwyer, K. M., D. Hanidziar, P. Putheti, P. A. Hill, S. Pommey, J. L. McRae, A. Winterhalter, G. Doherty, S. Deaglio, M. Koulmanda, W. Gao, S. C. Robson, and T. B. Strom. 2010. Expression of CD39 by human peripheral blood CD4+ CD25+ T cells denotes a regulatory memory phenotype. *Am.J.Transplant.* 10:2410-2420. doi:10.1111/j.1600-6143.2010.03291.x [doi].

- Dwyer, R. M., S. M. Potter-Beirne, K. A. Harrington, A. J. Lowery, E. Hennessy, J. M. Murphy, F. P. Barry, T. O'Brien, and M. J. Kerin. 2007. Monocyte chemotactic protein-1 secreted by primary breast tumors stimulates migration of mesenchymal stem cells. *Clin.Cancer Res.* 13:5020-5027. doi:13/17/5020 [pii];10.1158/1078-0432.CCR-07-0731 [doi].
- Efimova, O. V. and T. W. Kelley. 2009. Induction of granzyme B expression in T-cell receptor/CD28-stimulated human regulatory T cells is suppressed by inhibitors of the PI3K-mTOR pathway. *BMC.Immunol.* 10:59. doi:1471-2172-10-59 [pii];10.1186/1471-2172-10-59 [doi].
- Egeblad, M., E. S. Nakasone, and Z. Werb. 2010. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev.Cell* 18:884-901. doi:S1534-5807(10)00248-0 [pii];10.1016/j.devcel.2010.05.012 [doi].
- El-Behi, M., B. Ciric, H. Dai, Y. Yan, M. Cullimore, F. Safavi, G. X. Zhang, B. N. Dittel, and A. Rostami. 2011. The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nat.Immunol.* 12:568-575. doi:ni.2031 [pii];10.1038/ni.2031 [doi].
- Elyaman, W., R. Bassil, E. M. Bradshaw, W. Orent, Y. Lahoud, B. Zhu, F. Radtke, H. Yagita, and S. J. Khoury. 2012. Notch receptors and Smad3 signaling cooperate in the induction of interleukin-9-producing T cells. *Immunity.* 36:623-634. doi:S1074-7613(12)00133-1 [pii];10.1016/j.immuni.2012.01.020 [doi].
- English, K., J. M. Ryan, L. Tobin, M. J. Murphy, F. P. Barry, and B. P. Mahon. 2009. Cell contact, prostaglandin E(2) and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+CD25(High) forkhead box P3+ regulatory T cells. *Clin.Exp.Immunol.* 156:149-160. doi:CEI3874 [pii];10.1111/j.1365-2249.2009.03874.x [doi].
- Erez, N., M. Truitt, P. Olson, S. T. Arron, and D. Hanahan. 2010. Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-kappaB-Dependent Manner. *Cancer Cell* 17:135-147. doi:S1535-6108(10)00004-8 [pii];10.1016/j.ccr.2009.12.041 [doi].
- Erices, A., P. Conget, and J. J. Minguell. 2000. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br.J.Haematol.* 109:235-242. doi:bjh1986 [pii].
- Eyles, J., A. L. Puaux, X. Wang, B. Toh, C. Prakash, M. Hong, T. G. Tan, L. Zheng, L. C. Ong, Y. Jin, M. Kato, A. Prevost-Blondel, P. Chow, H. Yang, and J. P. Abastado. 2010. Tumor cells disseminate early, but immunosurveillance limits metastatic outgrowth, in a mouse model of melanoma. *J.Clin.Invest* 120:2030-2039. doi:42002 [pii];10.1172/JCI42002 [doi].
- Fabricius, D., M. Neubauer, B. Mandel, C. Schutz, A. Viardot, A. Vollmer, B. Jahrsdorfer, and K. M. Debatin. 2010. Prostaglandin E2 inhibits IFN-alpha secretion and Th1 costimulation by human plasmacytoid dendritic cells via E-prostanoid 2 and E-prostanoid 4 receptor engagement. *J.Immunol.* 184:677-684. doi:jimmunol.0902028 [pii];10.4049/jimmunol.0902028 [doi].
- Facciabene, A., X. Peng, I. S. Hagemann, K. Balint, A. Barchetti, L. P. Wang, P. A. Gimotty, C. B. Gilks, P. Lal, L. Zhang, and G. Coukos. 2011. Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells. *Nature* 475:226-230. doi:nature10169 [pii];10.1038/nature10169 [doi].
- Fager, G., G. Camejo, and G. Bondjers. 1992. Heparin-like glycosaminoglycans influence growth and phenotype of human arterial smooth muscle cells in vitro. I. Evidence for reversible binding and inactivation of the platelet-derived growth factor by heparin. *In Vitro Cell Dev.Biol.* 28A:168-175.
- Fager, G., G. Camejo, U. Olsson, G. Ostergren-Lunden, and G. Bondjers. 1992. Heparin-like glycosaminoglycans influence growth and phenotype of human arterial smooth muscle cells in vitro. II. The platelet-derived growth factor A-chain contains a sequence that specifically binds heparin. *In Vitro Cell Dev.Biol.* 28A:176-180.
- Faham, S., R. E. Hileman, J. R. Fromm, R. J. Linhardt, and D. C. Rees. 1996. Heparin structure and interactions with basic fibroblast growth factor. *Science* 271:1116-1120.
- Fallarino, F., U. Grohmann, K. W. Hwang, C. Orabona, C. Vacca, R. Bianchi, M. L. Belladonna, M. C. Fioretti, M. L. Alegre, and P. Puccetti. 2003. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat.Immunol.* 4:1206-1212. doi:10.1038/ni1003 [doi];ni1003 [pii].
- Fallarino, F., U. Grohmann, S. You, B. C. McGrath, D. R. Cavener, C. Vacca, C. Orabona, R. Bianchi, M. L. Belladonna, C. Volpi, P. Santamaria, M. C. Fioretti, and P. Puccetti. 2006. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J.Immunol.* 176:6752-6761. doi:176/11/6752 [pii].
- Fang, D. and Y. C. Liu. 2001. Proteolysis-independent regulation of PI3K by Cbl-b-mediated ubiquitination in T cells. *Nat.Immunol.* 2:870-875. doi:10.1038/ni0901-870 [doi];ni0901-870 [pii].
- Fang, T. C., Y. Yashiro-Ohtani, B. C. Del, D. M. Knoblock, S. C. Blacklow, and W. S. Pear. 2007. Notch directly regulates Gata3 expression during T helper 2 cell differentiation. *Immunity.* 27:100-110. doi:S1074-7613(07)00338-X [pii];10.1016/j.immuni.2007.04.018 [doi].
- Fantuzzi, G., G. Ku, M. W. Harding, D. J. Livingston, J. D. Sipe, K. Kuida, R. A. Flavell, and C. A. Dinarello. 1997. Response to local inflammation of IL-1 beta-converting enzyme- deficient mice. *J.Immunol.* 158:1818-1824.

- Fassbender, M., B. Gerlitzki, N. Ullrich, C. Lupp, M. Klein, M. P. Radsak, E. Schmitt, T. Bopp, and H. Schild. 2010. Cyclic adenosine monophosphate and IL-10 coordinately contribute to nTreg cell-mediated suppression of dendritic cell activation. *Cell Immunol.* 265:91-96. doi:S0008-8749(10)00195-4 [pii];10.1016/j.cellimm.2010.07.007 [doi].
- Fassett, M. S., W. Jiang, A. M. D'Alise, D. Mathis, and C. Benoist. 2012. Nuclear receptor Nr4a1 modulates both regulatory T-cell (Treg) differentiation and clonal deletion. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 109:3891-3896. doi:1200090109 [pii];10.1073/pnas.1200090109 [doi].
- Feau, S., Z. Garcia, R. Arens, H. Yagita, J. Borst, and S. P. Schoenberger. 2012. The CD4(+) T-cell help signal is transmitted from APC to CD8(+) T-cells via CD27-CD70 interactions. *Nat.Comm.* 3:948. doi:ncomms1948 [pii];10.1038/ncomms1948 [doi].
- Felbor, U., L. Dreier, R. A. Bryant, H. L. Ploegh, B. R. Olsen, and W. Mothes. 2000. Secreted cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII. *EMBO J.* 19:1187-1194. doi:10.1093/emboj/19.6.1187 [doi].
- Ferreras, M., U. Felbor, T. Lenhard, B. R. Olsen, and J. Delaisse. 2000. Generation and degradation of human endostatin proteins by various proteinases. *FEBS Lett.* 486:247-251. doi:S0014579300022493 [pii].
- Fialova, A., S. Partlova, L. Sojka, H. Hromadkova, T. Brtnicky, J. Fucikova, P. Kocian, L. Rob, J. Bartunkova, and R. Spisek. 2013. Dynamics of T-cell infiltration during the course of ovarian cancer: the gradual shift from a Th17 effector cell response to a predominant infiltration by regulatory T-cells. *Int.J.Cancer* 132:1070-1079. doi:10.1002/ijc.27759 [doi].
- Fiaschi, T., E. Giannoni, M. L. Taddei, P. Cirri, A. Marini, G. Pintus, C. Nativi, B. Richichi, A. Scozzafava, F. Carta, E. Torre, C. T. Supuran, and P. Chiarugi. 2013. Carbonic anhydrase IX from cancer-associated fibroblasts drives epithelial-mesenchymal transition in prostate carcinoma cells. *Cell Cycle* 12:1791-1801. doi:24902 [pii];10.4161/cc.24902 [doi].
- Fichtner-Feigl, S., W. Strober, K. Kawakami, R. K. Puri, and A. Kitani. 2006. IL-13 signaling through the IL-13alpha2 receptor is involved in induction of TGF-beta1 production and fibrosis. *Nat.Med.* 12:99-106. doi:nm1332 [pii];10.1038/nm1332 [doi].
- Fillingham, I., A. R. Gingras, E. Papagrigoriou, B. Patel, J. Emsley, D. R. Critchley, G. C. Roberts, and I. L. Barsukov. 2005. A vinculin binding domain from the talin rod unfolds to form a complex with the vinculin head. *Structure.* 13:65-74. doi:S0969-2126(04)00382-X [pii];10.1016/j.str.2004.11.006 [doi].
- Fischer, K., P. Hoffmann, S. Voelkl, N. Meidenbauer, J. Ammer, M. Edinger, E. Gottfried, S. Schwarz, G. Rothe, S. Hoves, K. Renner, B. Timischl, A. Mackensen, L. Kunz-Schughart, R. Andreesen, S. W. Krause, and M. Kreutz. 2007. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood* 109:3812-3819. doi:blood-2006-07-035972 [pii];10.1182/blood-2006-07-035972 [doi].
- Fisher, J. L., P. S. Mackie, M. L. Howard, H. Zhou, and P. F. Choong. 2001. The expression of the urokinase plasminogen activator system in metastatic murine osteosarcoma: an in vivo mouse model. *Clin.Cancer Res.* 7:1654-1660.
- Fisk, B., C. G. Ioannides, S. Aggarwal, J. T. Wharton, C. A. O'Brian, N. Restifo, and B. S. Glisson. 1994. Enhanced expression of HLA-A,B,C and inducibility of TAP-1, TAP-2, and HLA-A,B,C by interferon-gamma in a multidrug-resistant small cell lung cancer line. *Lymphokine Cytokine Res.* 13:125-131.
- Flavell, R. A., S. Sanjabi, S. H. Wrzesinski, and P. Licona-Limon. 2010. The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFbeta. *Nat.Rev.Immunol.* 10:554-567. doi:nri2808 [pii];10.1038/nri2808 [doi].
- Fontenot, J. D., M. A. Gavin, and A. Y. Rudensky. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat.Immunol.* 4:330-336. doi:10.1038/ni904 [doi];ni904 [pii].
- Forsell, J., A. Oberg, M. L. Henriksson, R. Stenling, A. Jung, and R. Palmqvist. 2007. High macrophage infiltration along the tumor front correlates with improved survival in colon cancer. *Clin.Cancer Res.* 13:1472-1479. doi:13/5/1472 [pii];10.1158/1078-0432.CCR-06-2073 [doi].
- Fossiez, F., O. Djossou, P. Chomarat, L. Flores-Romo, S. Ait-Yahia, C. Maat, J. J. Pin, P. Garrone, E. Garcia, S. Saeland, D. Blanchard, C. Gaillard, M. B. Das, E. Rouvier, P. Golstein, J. Banchereau, and S. Lebecque. 1996. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J.Exp.Med.* 183:2593-2603.
- Fourcade, J., Z. Sun, M. Benallaoua, P. Guillaume, I. F. Luescher, C. Sander, J. M. Kirkwood, V. Kuchroo, and H. M. Zarour. 2010. Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8+ T cell dysfunction in melanoma patients. *J.Exp.Med.* 207:2175-2186. doi:jem.20100637 [pii];10.1084/jem.20100637 [doi].
- Fowlkes, J. L., J. J. Enghild, K. Suzuki, and H. Nagase. 1994. Matrix metalloproteinases degrade insulin-like growth factor-binding protein-3 in dermal fibroblast cultures. *J.Biol.Chem.* 269:25742-25746.
- Fowlkes, J. L. and D. M. Serra. 1996. Characterization of glycosaminoglycan-binding domains present in insulin-like growth factor-binding protein-3. *J.Biol.Chem.* 271:14676-14679.
- Frame, M. C., H. Patel, B. Serrels, D. Lietha, and M. J. Eck. 2010. The FERM domain: organizing the structure and function of FAK. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 11:802-814. doi:nrm2996 [pii];10.1038/nrm2996 [doi].

- Francois, M., R. Romieu-Mourez, M. Li, and J. Galipeau. 2012. Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation. *Mol. Ther.* 20:187-195. doi:mt2011189 [pii];10.1038/mt.2011.189 [doi].
- Frank, G. M., A. J. Lepisto, M. L. Freeman, B. S. Sheridan, T. L. Cherpes, and R. L. Hendricks. 2010. Early CD4(+) T cell help prevents partial CD8(+) T cell exhaustion and promotes maintenance of Herpes Simplex Virus 1 latency. *J. Immunol.* 184:277-286. doi:jimmunol.0902373 [pii];10.4049/jimmunol.0902373 [doi].
- Franklin, R. A., W. Liao, A. Sarkar, M. V. Kim, M. R. Bivona, K. Liu, E. G. Pamer, and M. O. Li. 2014. The cellular and molecular origin of tumor-associated macrophages. *Science* 344:921-925. doi:science.1252510 [pii];10.1126/science.1252510 [doi].
- Fridlender, Z. G., V. Kapoor, G. Buchlis, G. Cheng, J. Sun, L. C. Wang, S. Singhal, L. A. Snyder, and S. M. Albelda. 2011. Monocyte chemoattractant protein-1 blockade inhibits lung cancer tumor growth by altering macrophage phenotype and activating CD8+ cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 44:230-237. doi:2010-0080OC [pii];10.1165/rcmb.2010-0080OC [doi].
- Fridlender, Z. G., J. Sun, S. Kim, V. Kapoor, G. Cheng, L. Ling, G. S. Worthen, and S. M. Albelda. 2009. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell* 16:183-194. doi:S1535-6108(09)00215-3 [pii];10.1016/j.ccr.2009.06.017 [doi].
- Fridman, W. H., F. Pages, C. Sautes-Fridman, and J. Galon. 2012. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer* 12:298-306. doi:nrc3245 [pii];10.1038/nrc3245 [doi].
- Friedenstein, A. J., R. K. Chailakhyan, and U. V. Gerasimov. 1987. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet.* 20:263-272.
- Froesch, E. R., C. Schmid, J. Schwander, and J. Zapf. 1985. Actions of insulin-like growth factors. *Annu. Rev. Physiol.* 47:443-467. doi:10.1146/annurev.ph.47.030185.002303 [doi].
- Fu, J., D. Xu, Z. Liu, M. Shi, P. Zhao, B. Fu, Z. Zhang, H. Yang, H. Zhang, C. Zhou, J. Yao, L. Jin, H. Wang, Y. Yang, Y. X. Fu, and F. S. Wang. 2007. Increased regulatory T cells correlate with CD8 T-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *Gastroenterology* 132:2328-2339. doi:S0016-5085(07)00628-2 [pii];10.1053/j.gastro.2007.03.102 [doi].
- Fu, W., A. Ergun, T. Lu, J. A. Hill, S. Haxhinasto, M. S. Fassett, R. Gazit, S. Adoro, L. Glimcher, S. Chan, P. Kastner, D. Rossi, J. J. Collins, D. Mathis, and C. Benoist. 2012. A multiply redundant genetic switch 'locks in' the transcriptional signature of regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 13:972-980. doi:ni.2420 [pii];10.1038/ni.2420 [doi].
- Fujisawa, T., B. Joshi, A. Nakajima, and R. K. Puri. 2009. A novel role of interleukin-13 receptor alpha2 in pancreatic cancer invasion and metastasis. *Cancer Res.* 69:8678-8685. doi:0008-5472.CAN-09-2100 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-09-2100 [doi].
- Fujisawa, T., B. H. Joshi, and R. K. Puri. 2012. IL-13 regulates cancer invasion and metastasis through IL-13Ralpha2 via ERK/AP-1 pathway in mouse model of human ovarian cancer. *Int. J. Cancer* 131:344-356. doi:10.1002/ijc.26366 [doi].
- Fukuchi, Y., H. Nakajima, D. Sugiyama, I. Hirose, T. Kitamura, and K. Tsuji. 2004. Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. *Stem Cells* 22:649-658. doi:10.1634/stemcells.22-5-649 [doi];22/5/649 [pii].
- Fukumura, D., R. Xavier, T. Sugiura, Y. Chen, E. C. Park, N. Lu, M. Selig, G. Nielsen, T. Taksir, R. K. Jain, and B. Seed. 1998. Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell* 94:715-725. doi:S0092-8674(00)81731-6 [pii].
- Gabrilovich, D. 2004. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat. Rev. Immunol.* 4:941-952. doi:nri1498 [pii];10.1038/nri1498 [doi].
- Gabrilovich, D. I., H. L. Chen, K. R. Girgis, H. T. Cunningham, G. M. Meny, S. Nadaf, D. Kavanaugh, and D. P. Carbone. 1996. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat. Med.* 2:1096-1103.
- Gabrysova, L., J. R. Christensen, X. Wu, A. Kissenpfennig, B. Malissen, and A. O'Garra. 2011. Integrated T-cell receptor and costimulatory signals determine TGF-beta-dependent differentiation and maintenance of Foxp3+ regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.* 41:1242-1248. doi:10.1002/eji.201041073 [doi].
- Gaggioli, C., S. Hooper, C. Hidalgo-Carcedo, R. Grosse, J. F. Marshall, K. Harrington, and E. Sahai. 2007. Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat. Cell Biol.* 9:1392-1400. doi:ncb1658 [pii];10.1038/ncb1658 [doi].
- Gajewski, T. F., H. Schreiber, and Y. X. Fu. 2013. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat. Immunol.* 14:1014-1022. doi:ni.2703 [pii];10.1038/ni.2703 [doi].
- Galdiero, M. R., E. Bonavita, I. Barajon, C. Garlanda, A. Mantovani, and S. Jaillon. 2013. Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer. *Immunobiology* 218:1402-1410. doi:S0171-2985(13)00116-2 [pii];10.1016/j.imbio.2013.06.003 [doi].

- Galon, J., F. Pages, F. M. Marincola, H. K. Angell, M. Thurin, A. Lugli, I. Zlobec, A. Berger, C. Bifulco, G. Botti, F. Tatangelo, C. M. Britten, S. Kreiter, L. Chouchane, P. Delrio, H. Arndt, M. Asslaber, M. Maio, G. V. Masucci, M. Mihm, F. Vidal-Vanaclocha, J. P. Allison, S. Gnjatic, L. Hakansson, C. Huber, H. Singh-Jasuja, C. Ottensmeier, H. Zwierzina, L. Laghi, F. Grizzi, P. S. Ohashi, P. A. Shaw, B. A. Clarke, B. G. Wouters, Y. Kawakami, S. Hazama, K. Okuno, E. Wang, J. O'Donnell-Tormey, C. Lagorce, G. Pawelec, M. I. Nishimura, R. Hawkins, R. Lapointe, A. Lundqvist, S. N. Khleif, S. Ogino, P. Gibbs, P. Waring, N. Sato, T. Torigoe, K. Itoh, P. S. Patel, S. N. Shukla, R. Palmqvist, I. D. Nagtegaal, Y. Wang, C. D'Arrigo, S. Kopetz, F. A. Sinicrope, G. Trinchieri, T. F. Gajewski, P. A. Ascierto, and B. A. Fox. 2012. Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. *J.Transl.Med.* 10:205. doi:1479-5876-10-205 [pii];10.1186/1479-5876-10-205 [doi].
- Gao, Q., S. J. Qiu, J. Fan, J. Zhou, X. Y. Wang, Y. S. Xiao, Y. Xu, Y. W. Li, and Z. Y. Tang. 2007. Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *J.Clin.Oncol.* 25:2586-2593. doi:25/18/2586 [pii];10.1200/JCO.2006.09.4565 [doi].
- Gao, Q., X. Y. Wang, S. J. Qiu, J. Zhou, Y. H. Shi, B. H. Zhang, and J. Fan. 2011. Tumor stroma reaction-related gene signature predicts clinical outcome in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci.* 102:1522-1531. doi:10.1111/j.1349-7006.2011.01981.x [doi].
- Garces, C. A., E. V. Kurenova, V. M. Golubovskaya, and W. G. Cance. 2006. Vascular endothelial growth factor receptor-3 and focal adhesion kinase bind and suppress apoptosis in breast cancer cells. *Cancer Res.* 66:1446-1454. doi:66/3/1446 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-05-1661 [doi].
- Garcion, E., A. Halilagic, A. Faissner, and C. French-Constant. 2004. Generation of an environmental niche for neural stem cell development by the extracellular matrix molecule tenascin C. *Development* 131:3423-3432. doi:10.1242/dev.01202 [doi];131/14/3423 [pii].
- Garin, M. I., C. C. Chu, D. Golshayan, E. Cernuda-Morollon, R. Wait, and R. I. Lechler. 2007. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood* 109:2058-2065. doi:10.1182/blood-2006-04-016451 [pii];10.1182/blood-2006-04-016451 [doi].
- Gattinoni, L., C. A. Klebanoff, and N. P. Restifo. 2012. Paths to stemness: building the ultimate antitumor T cell. *Nat.Rev.Cancer* 12:671-684. doi:nrc3322 [pii];10.1038/nrc3322 [doi].
- Gattinoni, L., E. Lugli, Y. Ji, Z. Pos, C. M. Paulos, M. F. Quigley, J. R. Almeida, E. Gostick, Z. Yu, C. Carpenito, E. Wang, D. C. Douek, D. A. Price, C. H. June, F. M. Marincola, M. Roederer, and N. P. Restifo. 2011. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat.Med.* 17:1290-1297. doi:nm.2446 [pii];10.1038/nm.2446 [doi].
- Gaudin, R. and N. S. Barteneva. 2015. Sorting of small infectious virus particles by flow virometry reveals distinct infectivity profiles. *Nat.Comm.* 6:6022. doi:ncomms7022 [pii];10.1038/ncomms7022 [doi].
- Gavin, M. A., T. R. Torgerson, E. Houston, P. DeRoos, W. Y. Ho, A. Stray-Pedersen, E. L. Ocheltree, P. D. Greenberg, H. D. Ochs, and A. Y. Rudensky. 2006. Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103:6659-6664. doi:0509484103 [pii];10.1073/pnas.0509484103 [doi].
- Gawenda, J., F. Traub, H. J. Luck, H. Kreipe, and W. R. von. 2007. Legumain expression as a prognostic factor in breast cancer patients. *Breast Cancer Res.Treat.* 102:1-6. doi:10.1007/s10549-006-9311-z [doi].
- Gazi, E., P. Gardner, N. P. Lockyer, C. A. Hart, M. D. Brown, and N. W. Clarke. 2007. Direct evidence of lipid translocation between adipocytes and prostate cancer cells with imaging FTIR microspectroscopy. *J.Lipid Res.* 48:1846-1856. doi:M700131-JLR200 [pii];10.1194/jlr.M700131-JLR200 [doi].
- Gazzaniga, S., A. I. Bravo, A. Guglielmotti, R. N. van, F. Maschi, A. Vecchi, A. Mantovani, J. Mordoh, and R. Wainstok. 2007. Targeting tumor-associated macrophages and inhibition of MCP-1 reduce angiogenesis and tumor growth in a human melanoma xenograft. *J.Invest Dermatol.* 127:2031-2041. doi:5700827 [pii];10.1038/sj.jid.5700827 [doi].
- Gehring, A. J., Z. Z. Ho, A. T. Tan, M. O. Aung, K. H. Lee, K. C. Tan, S. G. Lim, and A. Bertolotti. 2009. Profile of tumor antigen-specific CD8 T cells in patients with hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 137:682-690. doi:S0016-5085(09)00558-7 [pii];10.1053/j.gastro.2009.04.045 [doi].
- Geiger, B., A. Bershadsky, R. Pankov, and K. M. Yamada. 2001. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2:793-805. doi:10.1038/35099066 [doi];35099066 [pii].
- Germano, G., R. Frapolli, M. Simone, M. Tavecchio, E. Erba, S. Pesce, F. Pasqualini, F. Grosso, R. Sanfilippo, P. G. Casali, A. Gronchi, E. Virdis, E. Tarantino, S. Pilotti, A. Greco, M. Nebuloni, C. M. Galmarini, J. C. Tercero, A. Mantovani, M. D'Incalci, and P. Allavena. 2010. Antitumor and anti-inflammatory effects of trabectedin on human myxoid liposarcoma cells. *Cancer Res.* 70:2235-2244. doi:0008-5472.CAN-09-2335 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-09-2335 [doi].
- Ghiringhelli, F., C. Menard, M. Terme, C. Flament, J. Taieb, N. Chaput, P. E. Puig, S. Novault, B. Escudier, E. Vivier, A. Lécésne, C. Robert, J. Y. Blay, J. Bernard, S. Caillat-Zucman, A. Freitas, T. Tursz, O. Wagner-Ballon, C. Capron, W. Vainchenker, F. Martin, and L. Zitvogel. 2005. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J.Exp.Med.* 202:1075-1085. doi:jem.20051511 [pii];10.1084/jem.20051511 [doi].

- Ghiringhelli, F., P. E. Puig, S. Roux, A. Parcellier, E. Schmitt, E. Solary, G. Kroemer, F. Martin, B. Chauffert, and L. Zitvogel. 2005. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J.Exp.Med.* 202:919-929. doi:jem.20050463 [pii];10.1084/jem.20050463 [doi].
- Ghosh, P., K. L. Komschlies, M. Cippitelli, D. L. Longo, J. Subleski, J. Ye, A. Sica, H. A. Young, R. H. Wiltrot, and A. C. Ochoa. 1995. Gradual loss of T-helper 1 populations in spleen of mice during progressive tumor growth. *J.Natl.Cancer Inst.* 87:1478-1483.
- Giani, C., K. J. Cullen, D. Campani, and A. Rasmussen. 1996. IGF-II mRNA and protein are expressed in the stroma of invasive breast cancers: an in situ hybridization and immunohistochemistry study. *Breast Cancer Res.Treat.* 41:43-50.
- Giannone, G., G. Jiang, D. H. Sutton, D. R. Critchley, and M. P. Sheetz. 2003. Talin1 is critical for force-dependent reinforcement of initial integrin-cytoskeleton bonds but not tyrosine kinase activation. *J.Cell Biol.* 163:409-419. doi:10.1083/jcb.200302001 [doi];jcb.200302001 [pii].
- Giannoni, E., F. Bianchini, L. Masieri, S. Serni, E. Torre, L. Calorini, and P. Chiarugi. 2010. Reciprocal activation of prostate cancer cells and cancer-associated fibroblasts stimulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness. *Cancer Res.* 70:6945-6956. doi:0008-5472.CAN-10-0785 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-10-0785 [doi].
- Gil-Bernabe, A. M., S. Ferjancic, M. Tlalka, L. Zhao, P. D. Allen, J. H. Im, K. Watson, S. A. Hill, A. Amirkhosravi, J. L. Francis, J. W. Pollard, W. Ruf, and R. J. Muschel. 2012. Recruitment of monocytes/macrophages by tissue factor-mediated coagulation is essential for metastatic cell survival and premetastatic niche establishment in mice. *Blood* 119:3164-3175. doi:blood-2011-08-376426 [pii];10.1182/blood-2011-08-376426 [doi].
- Gingras, A. R., W. H. Ziegler, R. Frank, I. L. Barsukov, G. C. Roberts, D. R. Critchley, and J. Emsley. 2005. Mapping and consensus sequence identification for multiple vinculin binding sites within the talin rod. *J.Biol.Chem.* 280:37217-37224. doi:M508060200 [pii];10.1074/jbc.M508060200 [doi].
- Gjertsen, M. K., J. Bjrheim, I. Saeterdal, J. Myklebust, and G. Gaudernack. 1997. Cytotoxic CD4+ and CD8+ T lymphocytes, generated by mutant p21-ras (12Val) peptide vaccination of a patient, recognize 12Val-dependent nested epitopes present within the vaccine peptide and kill autologous tumour cells carrying this mutation. *Int.J.Cancer* 72:784-790. doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19970904)72:5<784::AID-IJC14>3.0.CO;2-9 [pii].
- Gobert, M., I. Treilleux, N. Bendriss-Vermare, T. Bachelot, S. Goddard-Leon, V. Arfi, C. Biota, A. C. Doffin, I. Durand, D. Olive, S. Perez, N. Pasqual, C. Faure, I. Ray-Coquard, A. Puisieux, C. Caux, J. Y. Blay, and C. Menetrier-Caux. 2009. 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.* 69:2000-2009. doi:0008-5472.CAN-08-2360 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-08-2360 [doi].
- Goc, J., W. H. Fridman, C. Sautes-Fridman, and M. C. Dieu-Nosjean. 2013. Characteristics of tertiary lymphoid structures in primary cancers. *Oncoimmunology.* 2:e26836. doi:10.4161/onci.26836 [doi];2013ONCOIMM0285R [pii].
- Gocheva, V., H. W. Wang, B. B. Gadea, T. Shree, K. E. Hunter, A. L. Garfall, T. Berman, and J. A. Joyce. 2010. IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion. *Genes Dev.* 24:241-255. doi:gad.1874010 [pii];10.1101/gad.1874010 [doi].
- Goda, N., T. Tenno, K. Inomata, M. Shirakawa, T. Tanaka, and H. Hiroaki. 2008. Intracellular protein delivery activity of peptides derived from insulin-like growth factor binding proteins 3 and 5. *Exp.Cell Res.* 314:2352-2361. doi:S0014-4827(08)00210-3 [pii];10.1016/j.yexcr.2008.05.008 [doi].
- Godefroy, E., O. Manches, B. Dreno, T. Hochman, L. Rolnitzky, N. Labarriere, Y. Guilloux, J. Goldberg, F. Jotereau, and N. Bhardwaj. 2011. Matrix metalloproteinase-2 conditions human dendritic cells to prime inflammatory T(H)2 cells via an IL-12- and OX40L-dependent pathway. *Cancer Cell* 19:333-346. doi:S1535-6108(11)00049-3 [pii];10.1016/j.ccr.2011.01.037 [doi].
- Goenka, S. and M. H. Kaplan. 2011. Transcriptional regulation by STAT6. *Immunol.Res.* 50:87-96. doi:10.1007/s12026-011-8205-2 [doi].
- Gomez, C. E. and M. Esteban. 2001. Recombinant proteins produced by vaccinia virus vectors can be incorporated within the virion (IMV form) into different compartments. *Arch.Virol.* 146:875-892.
- Gomis-Ruth, F. X. 2009. Catalytic domain architecture of metzincin metalloproteases. *J.Biol.Chem.* 284:15353-15357. doi:R800069200 [pii];10.1074/jbc.R800069200 [doi].
- Gong, D. and T. R. Malek. 2007. Cytokine-dependent Blimp-1 expression in activated T cells inhibits IL-2 production. *J.Immunol.* 178:242-252. doi:178/1/242 [pii].
- Gong, D., W. Shi, S. J. Yi, H. Chen, J. Groffen, and N. Heisterkamp. 2012. TGFbeta signaling plays a critical role in promoting alternative macrophage activation. *BMC.Immunol.* 13:31. doi:1471-2172-13-31 [pii];10.1186/1471-2172-13-31 [doi].
- Gonzalez, E. M., C. C. Reed, G. Bix, J. Fu, Y. Zhang, B. Gopalakrishnan, D. S. Greenspan, and R. V. Iozzo. 2005. BMP-1/Tolloid-like metalloproteases process endorepellin, the angiostatic C-terminal fragment of perlecan. *J.Biol.Chem.* 280:7080-7087. doi:M409841200 [pii];10.1074/jbc.M409841200 [doi].

- Gorelik, L., S. Constant, and R. A. Flavell. 2002. Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation. *J.Exp.Med.* 195:1499-1505.
- Gorelik, L., P. E. Fields, and R. A. Flavell. 2000. Cutting edge: TGF-beta inhibits Th type 2 development through inhibition of GATA-3 expression. *J.Immunol.* 165:4773-4777.
- Goswami, R., R. Jabeen, R. Yagi, D. Pham, J. Zhu, S. Goenka, and M. H. Kaplan. 2012. STAT6-dependent regulation of Th9 development. *J.Immunol.* 188:968-975. doi:jimmunol.1102840 [pii];10.4049/jimmunol.1102840 [doi].
- Gottschalk, R. A., E. Corse, and J. P. Allison. 2010. TCR ligand density and affinity determine peripheral induction of Foxp3 in vivo. *J.Exp.Med.* 207:1701-1711. doi:jem.20091999 [pii];10.1084/jem.20091999 [doi].
- Graf, C., F. Heidel, S. Tenzer, M. P. Radsak, F. K. Solem, C. M. Britten, C. Huber, T. Fischer, and T. Wolfel. 2007. A neoepitope generated by an FLT3 internal tandem duplication (FLT3-ITD) is recognized by leukemia-reactive autologous CD8+ T cells. *Blood* 109:2985-2988. doi:blood-2006-07-032839 [pii];10.1182/blood-2006-07-032839 [doi].
- Grallert, B. and E. Boye. 2013. GCN2, an old dog with new tricks. *Biochem.Soc.Trans.* 41:1687-1691. doi:BST20130210 [pii];10.1042/BST20130210 [doi].
- Griffiths, R. W., E. Elkord, D. E. Gilham, V. Ramani, N. Clarke, P. L. Stern, and R. E. Hawkins. 2007. Frequency of regulatory T cells in renal cell carcinoma patients and investigation of correlation with survival. *Cancer Immunol.Immunother.* 56:1743-1753. doi:10.1007/s00262-007-0318-z [doi].
- Grimshaw, M. J. and F. R. Balkwill. 2001. Inhibition of monocyte and macrophage chemotaxis by hypoxia and inflammation--a potential mechanism. *Eur.J.Immunol.* 31:480-489. doi:10.1002/1521-4141(200102)31:2<480::AID-IMMU480>3.0.CO;2-L [pii];10.1002/1521-4141(200102)31:2<480::AID-IMMU480>3.0.CO;2-L [doi].
- Groettrup, M., S. Khan, K. Schwarz, and G. Schmidtke. 2001. Interferon-gamma inducible exchanges of 20S proteasome active site subunits: why? *Biochimie* 83:367-372. doi:S0300-9084(01)01251-2 [pii].
- GROSS, J. and C. M. LAPIERE. 1962. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 48:1014-1022.
- Grossman, W. J., J. W. Verbsky, W. Barchet, M. Colonna, J. P. Atkinson, and T. J. Ley. 2004. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity.* 21:589-601. doi:S1074761304002729 [pii];10.1016/j.immuni.2004.09.002 [doi].
- Grugan, K. D., C. G. Miller, Y. Yao, C. Z. Michaylira, S. Ohashi, A. J. Klein-Szanto, J. A. Diehl, M. Herlyn, M. Han, H. Nakagawa, and A. K. Rustgi. 2010. Fibroblast-secreted hepatocyte growth factor plays a functional role in esophageal squamous cell carcinoma invasion. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 107:11026-11031. doi:0914295107 [pii];10.1073/pnas.0914295107 [doi].
- Gu, L., S. Tseng, R. M. Horner, C. Tam, M. Loda, and B. J. Rollins. 2000. Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Nature* 404:407-411. doi:10.1038/35006097 [doi];35006097 [pii].
- Gunther, C., N. Zimmermann, N. Berndt, M. Grosser, A. Stein, A. Koch, and M. Meurer. 2011. Up-regulation of the chemokine CCL18 by macrophages is a potential immunomodulatory pathway in cutaneous T-cell lymphoma. *Am.J.Pathol.* 179:1434-1442. doi:S0002-9440(11)00539-6 [pii];10.1016/j.ajpath.2011.05.040 [doi].
- Guo, P., Z. Zhu, Z. Sun, Z. Wang, X. Zheng, and H. Xu. 2013. Expression of legumain correlates with prognosis and metastasis in gastric carcinoma. *PLoS.One.* 8:e73090. doi:10.1371/journal.pone.0073090 [doi];PONE-D-13-25471 [pii].
- Hamanishi, J., M. Mandai, M. Iwasaki, T. Okazaki, Y. Tanaka, K. Yamaguchi, T. Higuchi, H. Yagi, K. Takakura, N. Minato, T. Honjo, and S. Fujii. 2007. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 104:3360-3365. doi:0611533104 [pii];10.1073/pnas.0611533104 [doi].
- Han, J., S. Jogie-Brahim, A. Harada, and Y. Oh. 2011. Insulin-like growth factor-binding protein-3 suppresses tumor growth via activation of caspase-dependent apoptosis and cross-talk with NF-kappaB signaling. *Cancer Lett.* 307:200-210. doi:S0304-3835(11)00194-7 [pii];10.1016/j.canlet.2011.04.004 [doi].
- Han, Y., A. Ye, L. Bi, J. Wu, K. Yu, and S. Zhang. 2014. Th17 cells and interleukin-17 increase with poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia. *Cancer Sci.* 105:933-942. doi:10.1111/cas.12459 [doi].
- Hanada, T., M. Nakagawa, A. Emoto, T. Nomura, N. Nasu, and Y. Nomura. 2000. Prognostic value of tumor-associated macrophage count in human bladder cancer. *Int.J.Urol.* 7:263-269.
- Hanafusa, T., Y. Yumoto, K. Nouse, H. Nakatsukasa, T. Onishi, T. Fujikawa, M. Taniyama, S. Nakamura, M. Uemura, Y. Takuma, E. Yumoto, T. Higashi, and T. Tsuji. 2002. Reduced expression of insulin-like growth factor binding protein-3 and its promoter hypermethylation in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 176:149-158. doi:S0304383501007364 [pii].
- Hangai, M., N. Kitaya, J. Xu, C. K. Chan, J. J. Kim, Z. Werb, S. J. Ryan, and P. C. Brooks. 2002. Matrix metalloproteinase-9-dependent exposure of a cryptic migratory control site in collagen is required before retinal

angiogenesis. *Am.J.Pathol.* 161:1429-1437. doi:S0002-9440(10)64418-5 [pii];10.1016/S0002-9440(10)64418-5 [doi].

Hao, J., T. G. Li, X. Qi, D. F. Zhao, and G. Q. Zhao. 2006. WNT/beta-catenin pathway up-regulates Stat3 and converges on LIF to prevent differentiation of mouse embryonic stem cells. *Dev.Biol.* 290:81-91. doi:S0012-1606(05)00789-X [pii];10.1016/j.ydbio.2005.11.011 [doi].

Haro, H., H. C. Crawford, B. Fingleton, K. Shinomiya, D. M. Spengler, and L. M. Matrisian. 2000. Matrix metalloproteinase-7-dependent release of tumor necrosis factor-alpha in a model of herniated disc resorption. *J.Clin.Invest* 105:143-150. doi:10.1172/JCI7091 [doi].

Harvat, B. L., P. Seth, and A. M. Jetten. 1997. The role of p27Kip1 in gamma interferon-mediated growth arrest of mammary epithelial cells and related defects in mammary carcinoma cells. *Oncogene* 14:2111-2122. doi:10.1038/sj.onc.1201055 [doi].

Hashimoto, S., T. Suzuki, H. Y. Dong, S. Nagai, N. Yamazaki, and K. Matsushima. 1999. Serial analysis of gene expression in human monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 94:845-852.

Haugen, M. H., K. Boye, J. M. Nesland, S. J. Pettersen, E. V. Egeland, T. Tamhane, K. Brix, G. M. Maelandsmo, and K. Flatmark. 2015. High expression of the cysteine proteinase legumain in colorectal cancer - implications for therapeutic targeting. *Eur.J.Cancer* 51:9-17. doi:S0959-8049(14)01056-9 [pii];10.1016/j.ejca.2014.10.020 [doi].

Hauzenberger, D., P. Olivier, D. Gundersen, and C. Ruegg. 1999. Tenascin-C inhibits beta1 integrin-dependent T lymphocyte adhesion to fibronectin through the binding of its fnIII 1-5 repeats to fibronectin. *Eur.J.Immunol.* 29:1435-1447. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199905)29:05<1435::AID-IMMU1435>3.0.CO;2-N [pii].

Haxhinasto, S., D. Mathis, and C. Benoist. 2008. The AKT-mTOR axis regulates de novo differentiation of CD4+Foxp3+ cells. *J.Exp.Med.* 205:565-574. doi:jem.20071477 [pii];10.1084/jem.20071477 [doi].

Haynesworth, S. E., J. Goshima, V. M. Goldberg, and A. I. Caplan. 1992. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* 13:81-88. doi:8756-3282(92)90364-3 [pii].

He, D., H. Li, N. Yusuf, C. A. Elmets, M. Athar, S. K. Katiyar, and H. Xu. 2012. IL-17 mediated inflammation promotes tumor growth and progression in the skin. *PLoS.One.* 7:e32126. doi:10.1371/journal.pone.0032126 [doi];PONE-D-11-20801 [pii].

He, D., H. Li, N. Yusuf, C. A. Elmets, J. Li, J. D. Mountz, and H. Xu. 2010. IL-17 promotes tumor development through the induction of tumor promoting microenvironments at tumor sites and myeloid-derived suppressor cells. *J.Immunol.* 184:2281-2288. doi:jimmunol.0902574 [pii];10.4049/jimmunol.0902574 [doi].

Headland, S. E., H. R. Jones, A. S. D'Sa, M. Perretti, and L. V. Norling. 2014. Cutting-edge analysis of extracellular microparticles using ImageStream(X) imaging flow cytometry. *Sci.Rep.* 4:5237. doi:srep05237 [pii];10.1038/srep05237 [doi].

Heissmeyer, V., F. Macian, S. H. Im, R. Varma, S. Feske, K. Venuprasad, H. Gu, Y. C. Liu, M. L. Dustin, and A. Rao. 2004. Calcineurin imposes T cell unresponsiveness through targeted proteolysis of signaling proteins. *Nat.Immunol.* 5:255-265. doi:10.1038/ni1047 [doi];ni1047 [pii].

Hemmings, L., D. J. Rees, V. Ohanian, S. J. Bolton, A. P. Gilmore, B. Patel, H. Priddle, J. E. Trevithick, R. O. Hynes, and D. R. Critchley. 1996. Talin contains three actin-binding sites each of which is adjacent to a vinculin-binding site. *J.Cell Sci.* 109 ( Pt 11):2715-2726.

Hendriks, J., Y. Xiao, and J. Borst. 2003. CD27 promotes survival of activated T cells and complements CD28 in generation and establishment of the effector T cell pool. *J.Exp.Med.* 198:1369-1380. doi:10.1084/jem.20030916 [doi];jem.20030916 [pii].

Hendriks, J., Y. Xiao, J. W. Rossen, K. F. van der Sluijs, K. Sugamura, N. Ishii, and J. Borst. 2005. During viral infection of the respiratory tract, CD27, 4-1BB, and OX40 collectively determine formation of CD8+ memory T cells and their capacity for secondary expansion. *J.Immunol.* 175:1665-1676. doi:175/3/1665 [pii].

Henriksson, M. L., S. Edin, A. M. Dahlin, P. A. Oldenborg, A. Oberg, G. B. Van, J. Rutegard, R. Stenling, and R. Palmqvist. 2011. Colorectal cancer cells activate adjacent fibroblasts resulting in FGF1/FGFR3 signaling and increased invasion. *Am.J.Pathol.* 178:1387-1394. doi:S0002-9440(10)00219-1 [pii];10.1016/j.ajpath.2010.12.008 [doi].

Herrmann, J. L., B. R. Weil, A. M. Abarbanell, Y. Wang, J. A. Poynter, M. C. Manukyan, and D. R. Meldrum. 2011. IL-6 and TGF-alpha costimulate mesenchymal stem cell vascular endothelial growth factor production by ERK-, JNK-, and PI3K-mediated mechanisms. *Shock* 35:512-516. doi:10.1097/SHK.0b013e31820b2fb9 [doi].

Hibino, S., K. Kato, S. Kudoh, H. Yagita, and K. Okumura. 1998. Tenascin suppresses CD3-mediated T cell activation. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 250:119-124. doi:S0006-291X(98)99258-0 [pii];10.1006/bbrc.1998.9258 [doi].

Hickman, H. D., K. Takeda, C. N. Skon, F. R. Murray, S. E. Hensley, J. Loomis, G. N. Barber, J. R. Bennink, and J. W. Yewdell. 2008. Direct priming of antiviral CD8+ T cells in the peripheral interfollicular region of lymph nodes. *Nat.Immunol.* 9:155-165. doi:ni1557 [pii];10.1038/ni1557 [doi].

- Higashiyama, S., J. A. Abraham, J. Miller, J. C. Fiddes, and M. Klagsbrun. 1991. A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. *Science* 251:936-939.
- Hinz, S., A. Trauzold, L. Boenicke, C. Sandberg, S. Beckmann, E. Bayer, H. Walczak, H. Kalthoff, and H. Ungefroren. 2000. Bcl-XL protects pancreatic adenocarcinoma cells against. *Oncogene* 19:5477-5486. doi:10.1038/sj.onc.1203936 [doi].
- Hiraoka, N., K. Onozato, T. Kosuge, and S. Hirohashi. 2006. Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin.Cancer Res.* 12:5423-5434. doi:12/18/5423 [pii];10.1158/1078-0432.CCR-06-0369 [doi].
- Hite, L. A., J. D. Shannon, J. B. Bjarnason, and J. W. Fox. 1992. Sequence of a cDNA clone encoding the zinc metalloproteinase hemorrhagic toxin e from *Crotalus atrox*: evidence for signal, zymogen, and disintegrin-like structures. *Biochemistry* 31:6203-6211.
- Ho, I. C., T. S. Tai, and S. Y. Pai. 2009. GATA3 and the T-cell lineage: essential functions before and after T-helper-2-cell differentiation. *Nat.Rev.Immunol.* 9:125-135. doi:nri2476 [pii];10.1038/nri2476 [doi].
- Hodge-Dufour, J., P. W. Noble, M. R. Horton, C. Bao, M. Wysoka, M. D. Burdick, R. M. Strieter, G. Trinchieri, and E. Pure. 1997. Induction of IL-12 and chemokines by hyaluronan requires adhesion-dependent priming of resident but not elicited macrophages. *J.Immunol.* 159:2492-2500.
- Hoebe, K., E. M. Janssen, S. O. Kim, L. Alexopoulou, R. A. Flavell, J. Han, and B. Beutler. 2003. Upregulation of costimulatory molecules induced by lipopolysaccharide and double-stranded RNA occurs by Trif-dependent and Trif-independent pathways. *Nat.Immunol.* 4:1223-1229. doi:10.1038/ni1010 [doi];ni1010 [pii].
- Hoechst, B., L. A. Ormandy, M. Ballmaier, F. Lehner, C. Kruger, M. P. Manns, T. F. Greten, and F. Korangy. 2008. A new population of myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients induces CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells. *Gastroenterology* 135:234-243. doi:S0016-5085(08)00456-3 [pii];10.1053/j.gastro.2008.03.020 [doi].
- Hofmann, O., O. L. Caballero, B. J. Stevenson, Y. T. Chen, T. Cohen, R. Chua, C. A. Maher, S. Panji, U. Schaefer, A. Kruger, M. Lehtvaslaihio, P. Carninci, Y. Hayashizaki, C. V. Jongeneel, A. J. Simpson, L. J. Old, and W. Hide. 2008. Genome-wide analysis of cancer/testis gene expression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 105:20422-20427. doi:0810777105 [pii];10.1073/pnas.0810777105 [doi].
- Horton, M. R., S. Shapiro, C. Bao, C. J. Lowenstein, and P. W. Noble. 1999. Induction and regulation of macrophage metalloelastase by hyaluronan fragments in mouse macrophages. *J.Immunol.* 162:4171-4176.
- Hoskin, D. W., J. S. Mader, S. J. Furlong, D. M. Conrad, and J. Blay. 2008. Inhibition of T cell and natural killer cell function by adenosine and its contribution to immune evasion by tumor cells (Review). *Int.J.Oncol.* 32:527-535.
- Hotary, K., X. Y. Li, E. Allen, S. L. Stevens, and S. J. Weiss. 2006. A cancer cell metalloprotease triad regulates the basement membrane transmigration program. *Genes Dev.* 20:2673-2686. doi:gad.1451806 [pii];10.1101/gad.1451806 [doi].
- Houghton, A. M., J. L. Grisolano, M. L. Baumann, D. K. Kobayashi, R. D. Hautamaki, L. C. Nehring, L. A. Cornelius, and S. D. Shapiro. 2006. Macrophage elastase (matrix metalloproteinase-12) suppresses growth of lung metastases. *Cancer Res.* 66:6149-6155. doi:66/12/6149 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-04-0297 [doi].
- Houghton, A. M., P. A. Quintero, D. L. Perkins, D. K. Kobayashi, D. G. Kelley, L. A. Marconcini, R. P. Mecham, R. M. Senior, and S. D. Shapiro. 2006. Elastin fragments drive disease progression in a murine model of emphysema. *J.Clin.Invest* 116:753-759. doi:10.1172/JCI25617 [doi].
- Hsia, D. A., S. K. Mitra, C. R. Hauck, D. N. Strelow, J. A. Nelson, D. Ilic, S. Huang, E. Li, G. R. Nemerow, J. Leng, K. S. Spencer, D. A. Cheresh, and D. D. Schlaepfer. 2003. Differential regulation of cell motility and invasion by FAK. *J.Cell Biol.* 160:753-767. doi:10.1083/jcb.200212114 [doi];jcb.200212114 [pii].
- Huang, B., Z. Lei, J. Zhao, W. Gong, J. Liu, Z. Chen, Y. Liu, D. Li, Y. Yuan, G. M. Zhang, and Z. H. Feng. 2007. CCL2/CCR2 pathway mediates recruitment of myeloid suppressor cells to cancers. *Cancer Lett.* 252:86-92. doi:S0304-3835(06)00684-7 [pii];10.1016/j.canlet.2006.12.012 [doi].
- Huang, C., E. Bi, Y. Hu, W. Deng, Z. Tian, C. Dong, Y. Hu, and B. Sun. 2006. A novel NF-kappaB binding site controls human granzyme B gene transcription. *J.Immunol.* 176:4173-4181. doi:176/7/4173 [pii].
- Huhtala, P., M. J. Humphries, J. B. McCarthy, P. M. Tremble, Z. Werb, and C. H. Damsky. 1995. Cooperative signaling by alpha 5 beta 1 and alpha 4 beta 1 integrins regulates metalloproteinase gene expression in fibroblasts adhering to fibronectin. *J.Cell Biol.* 129:867-879.
- Humphries, J. D., A. Byron, and M. J. Humphries. 2006. Integrin ligands at a glance. *J.Cell Sci.* 119:3901-3903. doi:119/19/3901 [pii];10.1242/jcs.03098 [doi].
- Hundhausen, C., A. Schulte, B. Schulz, M. G. Andrzejewski, N. Schwarz, H. P. von, U. Winter, K. Paliga, K. Reiss, P. Saftig, C. Weber, and A. Ludwig. 2007. Regulated shedding of transmembrane chemokines by the disintegrin and metalloproteinase 10 facilitates detachment of adherent leukocytes. *J.Immunol.* 178:8064-8072. doi:178/12/8064 [pii].

- Hwang, E. S., S. J. Szabo, P. L. Schwartzberg, and L. H. Glimcher. 2005. T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3. *Science* 307:430-433. doi:307/5708/430 [pii];10.1126/science.1103336 [doi].
- Hwang, R. F., T. Moore, T. Arumugam, V. Ramachandran, K. D. Amos, A. Rivera, B. Ji, D. B. Evans, and C. D. Logsdon. 2008. Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression. *Cancer Res.* 68:918-926. doi:68/3/918 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-07-5714 [doi].
- Ichii, H., A. Sakamoto, Y. Kuroda, and T. Tokuhisa. 2004. Bcl6 acts as an amplifier for the generation and proliferative capacity of central memory CD8+ T cells. *J.Immunol.* 173:883-891.
- Ichiyama, K., H. Yoshida, Y. Wakabayashi, T. Chinen, K. Saeki, M. Nakaya, G. Takaesu, S. Hori, A. Yoshimura, and T. Kobayashi. 2008. Foxp3 inhibits RORgammat-mediated IL-17A mRNA transcription through direct interaction with RORgammat. *J.Biol.Chem.* 283:17003-17008. doi:M801286200 [pii];10.1074/jbc.M801286200 [doi].
- Iida, T., M. Iwahashi, M. Katsuda, K. Ishida, M. Nakamori, M. Nakamura, T. Naka, T. Ojima, K. Ueda, K. Hayata, Y. Nakamura, and H. Yamaue. 2011. Tumor-infiltrating CD4+ Th17 cells produce IL-17 in tumor microenvironment and promote tumor progression in human gastric cancer. *Oncol.Rep.* 25:1271-1277. doi:10.3892/or.2011.1201 [doi].
- Ilic, D., Y. Furuta, S. Kanazawa, N. Takeda, K. Sobue, N. Nakatsuji, S. Nomura, J. Fujimoto, M. Okada, and T. Yamamoto. 1995. Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature* 377:539-544. doi:10.1038/377539a0 [doi].
- Ingermann, A. R., Y. F. Yang, J. Han, A. Mikami, A. E. Garza, L. Mohanraj, L. Fan, M. Idowu, J. L. Ware, H. S. Kim, D. Y. Lee, and Y. Oh. 2010. Identification of a novel cell death receptor mediating IGF1P-3-induced anti-tumor effects in breast and prostate cancer. *J.Biol.Chem.* 285:30233-30246. doi:M110.122226 [pii];10.1074/jbc.M110.122226 [doi].
- Iozzo, R. V. and R. D. Sanderson. 2011. Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis. *J.Cell Mol.Med.* 15:1013-1031. doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01236.x [doi].
- Ishida, H., G. Yang, N. Harada, R. L. Hastings, B. E. Castle, R. Kastelein, A. Miyajima, and M. Howard. 1991. Evaluation of murine interleukin 4 (IL-4) receptor expression using anti-receptor monoclonal antibodies and S1 nuclease protection analyses. *Cell Immunol.* 136:142-154.
- Ishida, T., T. Ishii, A. Inagaki, H. Yano, H. Komatsu, S. Iida, H. Inagaki, and R. Ueda. 2006. Specific recruitment of CC chemokine receptor 4-positive regulatory T cells in Hodgkin lymphoma fosters immune privilege. *Cancer Res.* 66:5716-5722. doi:66/11/5716 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-06-0261 [doi].
- Ishii, M., H. Wen, C. A. Corsa, T. Liu, A. L. Coelho, R. M. Allen, W. F. Carson, K. A. Cavassani, X. Li, N. W. Lukacs, C. M. Hogaboam, Y. Dou, and S. L. Kunkel. 2009. Epigenetic regulation of the alternatively activated macrophage phenotype. *Blood* 114:3244-3254. doi:blood-2009-04-217620 [pii];10.1182/blood-2009-04-217620 [doi].
- Isogai, Z., R. N. Ono, S. Ushiro, D. R. Keene, Y. Chen, R. Mazziere, N. L. Charbonneau, D. P. Reinhardt, D. B. Rifkin, and L. Y. Sakai. 2003. Latent transforming growth factor beta-binding protein 1 interacts with fibrillin and is a microfibril-associated protein. *J.Biol.Chem.* 278:2750-2757. doi:10.1074/jbc.M209256200 [doi];M209256200 [pii].
- Isomura, I., S. Palmer, R. J. Grumont, K. Bunting, G. Hoyne, N. Wilkinson, A. Banerjee, A. Proietto, R. Gugasyan, L. Wu, A. McNally, R. J. Steptoe, R. Thomas, M. F. Shannon, and S. Gerondakis. 2009. c-Rel is required for the development of thymic Foxp3+ CD4 regulatory T cells. *J.Exp.Med.* 206:3001-3014. doi:jem.20091411 [pii];10.1084/jem.20091411 [doi].
- Ito, A., A. Mukaiyama, Y. Itoh, H. Nagase, I. B. Thogersen, J. J. Enghild, Y. Sasaguri, and Y. Mori. 1996. Degradation of interleukin 1beta by matrix metalloproteinases. *J.Biol.Chem.* 271:14657-14660.
- Ito, T., S. Hanabuchi, Y. H. Wang, W. R. Park, K. Arima, L. Bover, F. X. Qin, M. Gilliet, and Y. J. Liu. 2008. Two functional subsets of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus and periphery. *Immunity.* 28:870-880. doi:S1074-7613(08)00228-8 [pii];10.1016/j.immuni.2008.03.018 [doi].
- Ito, T., Y. H. Wang, O. Duramad, T. Hori, G. J. Delespesse, N. Watanabe, F. X. Qin, Z. Yao, W. Cao, and Y. J. Liu. 2005. TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. *J.Exp.Med.* 202:1213-1223. doi:jem.20051135 [pii];10.1084/jem.20051135 [doi].
- Jaafar, F., E. Righi, V. Lindstrom, C. Linton, M. Nohadani, N. S. Van, T. Lloyd, J. Poznansky, G. Stamp, R. Dina, D. V. Coleman, and M. C. Poznansky. 2009. Correlation of CXCL12 expression and FoxP3+ cell infiltration with human papillomavirus infection and clinicopathological progression of cervical cancer. *Am.J.Pathol.* 175:1525-1535. doi:S0002-9440(10)60664-5 [pii];10.2353/ajpath.2009.090295 [doi].
- Jaffe, E. A., J. T. Ruggiero, L. K. Leung, M. J. Doyle, P. J. McKeown-Longo, and D. F. Mosher. 1983. Cultured human fibroblasts synthesize and secrete thrombospondin and incorporate it into extracellular matrix. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 80:998-1002.
- Jager, E., M. Ringhoffer, J. Karbach, M. Arand, F. Oesch, and A. Knuth. 1996. Inverse relationship of melanocyte differentiation antigen expression in melanoma tissues and CD8+ cytotoxic-T-cell responses: evidence for immunoselection of antigen-loss variants in vivo. *Int.J.Cancer* 66:470-476. doi:10.1002/(SICI)1097-

- 0215(19960516)66:4<470::AID-IJC10>3.0.CO;2-C [pii];10.1002/(SICI)1097-0215(19960516)66:4<470::AID-IJC10>3.0.CO;2-C [doi].
- Jash, A., A. Sahoo, G. C. Kim, C. S. Chae, J. S. Hwang, J. E. Kim, and S. H. Im. 2012. Nuclear factor of activated T cells 1 (NFAT1)-induced permissive chromatin modification facilitates nuclear factor-kappaB (NF-kappaB)-mediated interleukin-9 (IL-9) transactivation. *J.Biol.Chem.* 287:15445-15457. doi:M112.340356 [pii];10.1074/jbc.M112.340356 [doi].
- Jechlinger, M., S. Grunert, I. H. Tamir, E. Janda, S. Ludemann, T. Waerner, P. Seither, A. Weith, H. Beug, and N. Kraut. 2003. Expression profiling of epithelial plasticity in tumor progression. *Oncogene* 22:7155-7169. doi:10.1038/sj.onc.1206887 [doi];1206887 [pii].
- Jenkins, S. J., G. Perona-Wright, A. G. Worsley, N. Ishii, and A. S. MacDonald. 2007. Dendritic cell expression of OX40 ligand acts as a costimulatory, not polarizing, signal for optimal Th2 priming and memory induction in vivo. *J.Immunol.* 179:3515-3523. doi:179/6/3515 [pii].
- JENSEN, F. C., A. J. GIRARDI, R. V. GILDEN, and H. KOPROWSKI. 1964. INFECTION OF HUMAN AND SIMIAN TISSUE CULTURES WITH ROUS SARCOMA VIRUS. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 52:53-59.
- Jensen, H. K., F. Donskov, M. Nordmark, N. Marcussen, and M. H. von der. 2009. Increased intratumoral FOXP3-positive regulatory immune cells during interleukin-2 treatment in metastatic renal cell carcinoma. *Clin.Cancer Res.* 15:1052-1058. doi:15/3/1052 [pii];10.1158/1078-0432.CCR-08-1296 [doi].
- Jian, H., X. Shen, I. Liu, M. Semenov, X. He, and X. F. Wang. 2006. Smad3-dependent nuclear translocation of beta-catenin is required for TGF-beta1-induced proliferation of bone marrow-derived adult human mesenchymal stem cells. *Genes Dev.* 20:666-674. doi:20/6/666 [pii];10.1101/gad.1388806 [doi].
- Jiang, G., G. Giannone, D. R. Critchley, E. Fukumoto, and M. P. Sheetz. 2003. Two-piconewton slip bond between fibronectin and the cytoskeleton depends on talin. *Nature* 424:334-337. doi:10.1038/nature01805 [doi];nature01805 [pii].
- Jing, Y., Z. Han, Y. Liu, K. Sun, S. Zhang, G. Jiang, R. Li, L. Gao, X. Zhao, D. Wu, X. Cai, M. Wu, and L. Wei. 2012. Mesenchymal stem cells in inflammation microenvironment accelerates hepatocellular carcinoma metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition. *PLoS.One.* 7:e43272. doi:10.1371/journal.pone.0043272 [doi];PONE-D-12-11563 [pii].
- Jinushi, M., S. Chiba, H. Yoshiyama, K. Masutomi, I. Kinoshita, H. Dosaka-Akita, H. Yagita, A. Takaoka, and H. Tahara. 2011. Tumor-associated macrophages regulate tumorigenicity and anticancer drug responses of cancer stem/initiating cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 108:12425-12430. doi:1106645108 [pii];10.1073/pnas.1106645108 [doi].
- Johnson, D. R. and J. S. Pober. 1990. Tumor necrosis factor and immune interferon synergistically increase transcription of HLA class I heavy- and light-chain genes in vascular endothelium. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87:5183-5187.
- JOKLIK, W. K. 1962. The purification fo four strains of poxvirus. *Virology* 18:9-18.
- Jones, J. I., A. Gockerman, W. H. Busby, Jr., C. Camacho-Hubner, and D. R. Clemmons. 1993. Extracellular matrix contains insulin-like growth factor binding protein-5: potentiation of the effects of IGF-I. *J.Cell Biol.* 121:679-687.
- Jones, P. L., J. Crack, and M. Rabinovitch. 1997. Regulation of tenascin-C, a vascular smooth muscle cell survival factor that interacts with the alpha v beta 3 integrin to promote epidermal growth factor receptor phosphorylation and growth. *J.Cell Biol.* 139:279-293.
- Jones, R. G. and C. B. Thompson. 2007. Revving the engine: signal transduction fuels T cell activation. *Immunity.* 27:173-178. doi:S1074-7613(07)00367-6 [pii];10.1016/j.immuni.2007.07.008 [doi].
- Jordan, M. S., A. Boesteanu, A. J. Reed, A. L. Petrone, A. E. Hohenbeck, M. A. Lerman, A. Naji, and A. J. Caton. 2001. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat.Immunol.* 2:301-306. doi:10.1038/86302 [doi].
- Josefowicz, S. Z., L. F. Lu, and A. Y. Rudensky. 2012. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu.Rev.Immunol.* 30:531-564. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623 [doi].
- Joshi, N. S., W. Cui, A. Chandele, H. K. Lee, D. R. Urso, J. Hagman, L. Gapin, and S. M. Kaeck. 2007. Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. *Immunity.* 27:281-295. doi:S1074-7613(07)00371-8 [pii];10.1016/j.immuni.2007.07.010 [doi].
- Jouanneau, J., J. Gavrilovic, D. Caruelle, M. Jaye, G. Moens, J. P. Caruelle, and J. P. Thiery. 1991. Secreted or nonsecreted forms of acidic fibroblast growth factor produced by transfected epithelial cells influence cell morphology, motility, and invasive potential. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88:2893-2897.
- Jung, Y., J. K. Kim, Y. Shiozawa, J. Wang, A. Mishra, J. Joseph, J. E. Berry, S. McGee, E. Lee, H. Sun, J. Wang, T. Jin, H. Zhang, J. Dai, P. H. Krebsbach, E. T. Keller, K. J. Pienta, and R. S. Taichman. 2013. Recruitment of mesenchymal stem cells into prostate tumours promotes metastasis. *Nat.Commun.* 4:1795. doi:ncomms2766 [pii];10.1038/ncomms2766 [doi].

- Kaech, S. M. and W. Cui. 2012. Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nat.Rev.Immunol.* 12:749-761. doi:nri3307 [pii];10.1038/nri3307 [doi].
- Kalinski, P. 2012. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *J.Immunol.* 188:21-28. doi:188/1/21 [pii];10.4049/jimmunol.1101029 [doi].
- Kallies, A., A. Xin, G. T. Belz, and S. L. Nutt. 2009. Blimp-1 transcription factor is required for the differentiation of effector CD8(+) T cells and memory responses. *Immunity.* 31:283-295. doi:S1074-7613(09)00321-5 [pii];10.1016/j.immuni.2009.06.021 [doi].
- Kamachi, F., N. Harada, Y. Usui, T. Sakanishi, N. Ishii, K. Okumura, S. Miyake, and H. Akiba. 2014. OX40 ligand regulates splenic CD8(-) dendritic cell-induced Th2 responses in vivo. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 444:235-240. doi:S0006-291X(14)00084-9 [pii];10.1016/j.bbrc.2014.01.060 [doi].
- Kanayama, S., Y. Yamada, R. Kawaguchi, Y. Tsuji, S. Haruta, and H. Kobayashi. 2008. Hepatocyte growth factor induces anoikis resistance by up-regulation of cyclooxygenase-2 expression in uterine endometrial cancer cells. *Oncol.Rep.* 19:117-122.
- Kantola, A. K., J. Keski-Oja, and K. Koli. 2008. Fibronectin and heparin binding domains of latent TGF-beta binding protein (LTBP)-4 mediate matrix targeting and cell adhesion. *Exp.Cell Res.* 314:2488-2500. doi:S0014-4827(08)00205-X [pii];10.1016/j.yexcr.2008.05.010 [doi].
- Kanzaki, T., A. Olofsson, A. Moren, C. Wernstedt, U. Hellman, K. Miyazono, L. Claesson-Welsh, and C. H. Heldin. 1990. TGF-beta 1 binding protein: a component of the large latent complex of TGF-beta 1 with multiple repeat sequences. *Cell* 61:1051-1061. doi:0092-8674(90)90069-Q [pii].
- Kao, C., K. J. Oestreich, M. A. Paley, A. Crawford, J. M. Angelosanto, M. A. Ali, A. M. Intlekofer, J. M. Boss, S. L. Reiner, A. S. Weinmann, and E. J. Wherry. 2011. Transcription factor T-bet represses expression of the inhibitory receptor PD-1 and sustains virus-specific CD8+ T cell responses during chronic infection. *Nat.Immunol.* 12:663-671. doi:ni.2046 [pii];10.1038/ni.2046 [doi].
- Kapp, J. A., K. Honjo, L. M. Kapp, X. Xu, A. Cozier, and R. P. Bucy. 2006. TCR transgenic CD8+ T cells activated in the presence of TGFbeta express FoxP3 and mediate linked suppression of primary immune responses and cardiac allograft rejection. *Int.Immunol.* 18:1549-1562. doi:dx1088 [pii];10.1093/intimm/dx1088 [doi].
- Karnoub, A. E., A. B. Dash, A. P. Vo, A. Sullivan, M. W. Brooks, G. W. Bell, A. L. Richardson, K. Polyak, R. Tubo, and R. A. Weinberg. 2007. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 449:557-563. doi:nature06188 [pii];10.1038/nature06188 [doi].
- Karpus, W. J., N. W. Lukacs, K. J. Kennedy, W. S. Smith, S. D. Hurst, and T. A. Barrett. 1997. Differential CC chemokine-induced enhancement of T helper cell cytokine production. *J.Immunol.* 158:4129-4136.
- Karumanchi, S. A., V. Jha, R. Ramchandran, A. Karihaloo, L. Tsiokas, B. Chan, M. Dhanabal, J. I. Hanai, G. Venkataraman, Z. Shriver, N. Keiser, R. Kalluri, H. Zeng, D. Mukhopadhyay, R. L. Chen, A. D. Lander, K. Hagihara, Y. Yamaguchi, R. Sasisekharan, L. Cantley, and V. P. Sukhatme. 2001. Cell surface glypicans are low-affinity endostatin receptors. *Mol.Cell* 7:811-822. doi:S1097-2765(01)00225-8 [pii].
- Kaupilla, S., F. Stenback, J. Risteli, A. Jukkola, and L. Risteli. 1998. Aberrant type I and type III collagen gene expression in human breast cancer in vivo. *J.Pathol.* 186:262-268. doi:10.1002/(SICI)1096-9896(1998110)186:3<262::AID-PATH191>3.0.CO;2-3 [pii];10.1002/(SICI)1096-9896(1998110)186:3<262::AID-PATH191>3.0.CO;2-3 [doi].
- Kebir, H., I. Ifergan, J. I. Alvarez, M. Bernard, J. Poirier, N. Arbour, P. Duquette, and A. Prat. 2009. Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis. *Ann.Neurol.* 66:390-402. doi:10.1002/ana.21748 [doi].
- Keir, M. E., M. J. Butte, G. J. Freeman, and A. H. Sharpe. 2008. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu.Rev.Immunol.* 26:677-704. doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331 [doi].
- Khong, H. T., Q. J. Wang, and S. A. Rosenberg. 2004. Identification of multiple antigens recognized by tumor-infiltrating lymphocytes from a single patient: tumor escape by antigen loss and loss of MHC expression. *J.Immunother.* 27:184-190. doi:00002371-200405000-00002 [pii].
- Kidd, S., E. Spaeth, K. Watson, J. Burks, H. Lu, A. Klopp, M. Andreeff, and F. C. Marini. 2012. Origins of the tumor microenvironment: quantitative assessment of adipose-derived and bone marrow-derived stroma. *PLoS.One.* 7:e30563. doi:10.1371/journal.pone.0030563 [doi];PONE-D-11-19617 [pii].
- Kiessling, R., E. Klein, H. Pross, and H. Wigzell. 1975. "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur.J.Immunol.* 5:117-121. doi:10.1002/eji.1830050209 [doi].
- Kikkawa, Y., K. Hozumi, F. Katagiri, M. Nomizu, H. K. Kleinman, and J. E. Koblinski. 2013. Laminin-111-derived peptides and cancer. *Cell Adh.Migr.* 7:150-256. doi:22827 [pii];10.4161/cam.22827 [doi].
- Kim, B. C., M. K. Ju, A. Dan-Chin-Yu, and P. Sommer. 2009. Quantitative detection of HIV-1 particles using HIV-1 neutralizing antibody-conjugated beads. *Anal.Chem.* 81:2388-2393. doi:10.1021/ac802267u [doi];10.1021/ac802267u [pii].

- Kim, H. S., W. J. Lee, S. W. Lee, H. W. Chae, D. H. Kim, and Y. Oh. 2010. Insulin-like growth factor binding protein-3 induces G1 cell cycle arrest with inhibition of cyclin-dependent kinase 2 and 4 in MCF-7 human breast cancer cells. *Horm.Metab Res.* 42:165-172. doi:10.1055/s-0029-1243190 [doi].
- Kim, H. S., S. R. Nagalla, Y. Oh, E. Wilson, C. T. Roberts, Jr., and R. G. Rosenfeld. 1997. Identification of a family of low-affinity insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs): characterization of connective tissue growth factor as a member of the IGFBP superfamily. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94:12981-12986.
- Kim, J. and P. Hematti. 2009. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages. *Exp.Hematol.* 37:1445-1453. doi:S0301-472X(09)00365-8 [pii];10.1016/j.exphem.2009.09.004 [doi].
- Kim, K. S., K. W. Kang, Y. B. Seu, S. H. Baek, and J. R. Kim. 2009. Interferon-gamma induces cellular senescence through p53-dependent DNA damage signaling in human endothelial cells. *Mech.Ageing Dev.* 130:179-188. doi:S0047-6374(08)00208-X [pii];10.1016/j.mad.2008.11.004 [doi].
- Kim, S., H. Takahashi, W. W. Lin, P. Descargues, S. Grivennikov, Y. Kim, J. L. Luo, and M. Karin. 2009. Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature* 457:102-106. doi:nature07623 [pii];10.1038/nature07623 [doi].
- Kim, Y. M., J. W. Jang, O. H. Lee, J. Yeon, E. Y. Choi, K. W. Kim, S. T. Lee, and Y. G. Kwon. 2000. Endostatin inhibits endothelial and tumor cellular invasion by blocking the activation and catalytic activity of matrix metalloproteinase. *Cancer Res.* 60:5410-5413.
- Kinnaird, T., E. Stabile, M. S. Burnett, C. W. Lee, S. Barr, S. Fuchs, and S. E. Epstein. 2004. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ.Res.* 94:678-685. doi:10.1161/01.RES.0000118601.37875.AC [doi];01.RES.0000118601.37875.AC [pii].
- Kishikawa, H., J. Sun, A. Choi, S. C. Miaw, and I. C. Ho. 2001. The cell type-specific expression of the murine IL-13 gene is regulated by GATA-3. *J.Immunol.* 167:4414-4420.
- Kitajima, M. and S. F. Ziegler. 2013. Cutting edge: identification of the thymic stromal lymphopoietin-responsive dendritic cell subset critical for initiation of type 2 contact hypersensitivity. *J.Immunol.* 191:4903-4907. doi:jimmunol.1302175 [pii];10.4049/jimmunol.1302175 [doi].
- Kitoh, A., M. Ono, Y. Naoe, N. Ohkura, T. Yamaguchi, H. Yaguchi, I. Kitabayashi, T. Tsukada, T. Nomura, Y. Miyachi, I. Taniuchi, and S. Sakaguchi. 2009. Indispensable role of the Runx1-Cbfbeta transcription complex for in vivo-suppressive function of FoxP3+ regulatory T cells. *Immunity.* 31:609-620. doi:S1074-7613(09)00407-5 [pii];10.1016/j.immuni.2009.09.003 [doi].
- Kiyokawa, E., Y. Hashimoto, S. Kobayashi, H. Sugimura, T. Kurata, and M. Matsuda. 1998. Activation of Rac1 by a Crk SH3-binding protein, DOCK180. *Genes Dev.* 12:3331-3336.
- Kobayashi, N., S. Miyoshi, T. Mikami, H. Koyama, M. Kitazawa, M. Takeoka, K. Sano, J. Amano, Z. Isogai, S. Niida, K. Oguri, M. Okayama, J. A. McDonald, K. Kimata, S. Taniguchi, and N. Itano. 2010. Hyaluronan deficiency in tumor stroma impairs macrophage trafficking and tumor neovascularization. *Cancer Res.* 70:7073-7083. doi:0008-5472.CAN-09-4687 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-09-4687 [doi].
- Koch, M. A., G. Tucker-Heard, N. R. Perdue, J. R. Killebrew, K. B. Urdahl, and D. J. Campbell. 2009. The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat.Immunol.* 10:595-602. doi:ni.1731 [pii];10.1038/ni.1731 [doi].
- Koebel, C. M., W. Vermi, J. B. Swann, N. Zerafa, S. J. Rodig, L. J. Old, M. J. Smyth, and R. D. Schreiber. 2007. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* 450:903-907. doi:nature06309 [pii];10.1038/nature06309 [doi].
- Koenen, H. J., R. L. Smeets, P. M. Vink, R. E. van, A. M. Boots, and I. Joosten. 2008. Human CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>pos</sup> regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells. *Blood* 112:2340-2352. doi:blood-2008-01-133967 [pii];10.1182/blood-2008-01-133967 [doi].
- Koide, N., A. Nishio, T. Sato, A. Sugiyama, and S. Miyagawa. 2004. Significance of macrophage chemoattractant protein-1 expression and macrophage infiltration in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Am.J.Gastroenterol.* 99:1667-1674. doi:10.1111/j.1572-0241.2004.30733.x [doi];AJG30733 [pii].
- Kojima, Y., A. Acar, E. N. Eaton, K. T. Mellody, C. Scheel, I. Ben-Porath, T. T. Onder, Z. C. Wang, A. L. Richardson, R. A. Weinberg, and A. Orimo. 2010. Autocrine TGF-beta and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 107:20009-20014. doi:1013805107 [pii];10.1073/pnas.1013805107 [doi].
- Koli, K., M. Hyytiainen, M. J. Ryyanen, and J. Keski-Oja. 2005. Sequential deposition of latent TGF-beta binding proteins (LTBPs) during formation of the extracellular matrix in human lung fibroblasts. *Exp.Cell Res.* 310:370-382. doi:S0014-4827(05)00362-9 [pii];10.1016/j.yexcr.2005.08.008 [doi].
- Koller, F. L., D. G. Hwang, E. A. Dozier, and B. Fingleton. 2010. Epithelial interleukin-4 receptor expression promotes colon tumor growth. *Carcinogenesis* 31:1010-1017. doi:bgq044 [pii];10.1093/carcin/bgq044 [doi].

- Komine, O., K. Hayashi, W. Natsume, T. Watanabe, Y. Seki, N. Seki, R. Yagi, W. Sukzuki, H. Tamauchi, K. Hozumi, S. Habu, M. Kubo, and M. Satake. 2003. The Runx1 transcription factor inhibits the differentiation of naive CD4<sup>+</sup> T cells into the Th2 lineage by repressing GATA3 expression. *J.Exp.Med.* 198:51-61. doi:10.1084/jem.20021200 [doi];jem.20021200 [pii].
- Kominsky, S., H. M. Johnson, G. Bryan, T. Tanabe, A. C. Hobeika, P. S. Subramaniam, and B. Torres. 1998. IFN $\gamma$  inhibition of cell growth in glioblastomas correlates with increased levels of the cyclin dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1. *Oncogene* 17:2973-2979. doi:10.1038/sj.onc.1202217 [doi].
- Komori, J., H. Marusawa, T. Machimoto, Y. Endo, K. Kinoshita, T. Kou, H. Haga, I. Ikai, S. Uemoto, and T. Chiba. 2008. Activation-induced cytidine deaminase links bile duct inflammation to human cholangiocarcinoma. *Hepatology* 47:888-896. doi:10.1002/hep.22125 [doi].
- Korn, T., E. Bettelli, M. Oukka, and V. K. Kuchroo. 2009. IL-17 and Th17 Cells. *Annu.Rev.Immunol.* 27:485-517. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132710 [doi];10.1146/annurev.immunol.021908.132710 [pii].
- Koshikawa, N., G. Giannelli, V. Cirulli, K. Miyazaki, and V. Quaranta. 2000. Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5. *J.Cell Biol.* 148:615-624.
- Koshikawa, N., T. Minegishi, A. Sharabi, V. Quaranta, and M. Seiki. 2005. Membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) is a processing enzyme for human laminin gamma 2 chain. *J.Biol.Chem.* 280:88-93. doi:M411824200 [pii];10.1074/jbc.M411824200 [doi].
- Kowalczyk, A., C. A. D'Souza, and L. Zhang. 2014. Cell-extrinsic CTLA4-mediated regulation of dendritic cell maturation depends on STAT3. *Eur.J.Immunol.* 44:1143-1155. doi:10.1002/eji.201343601 [doi].
- Krause, P., M. Bruckner, C. Uermsi, E. Singer, M. Groettrup, and D. F. Legler. 2009. Prostaglandin E(2) enhances T-cell proliferation by inducing the costimulatory molecules OX40L, CD70, and 4-1BBL on dendritic cells. *Blood* 113:2451-2460. doi:blood-2008-05-157123 [pii];10.1182/blood-2008-05-157123 [doi].
- Krausgruber, T., K. Blazek, T. Smallie, S. Alzabin, H. Lockstone, N. Sahgal, T. Hussell, M. Feldmann, and I. A. Udalova. 2011. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nat.Immunol.* 12:231-238. doi:ni.1990 [pii];10.1038/ni.1990 [doi].
- Kren, L., K. Muckova, E. Lzicarova, M. Sova, V. Vybihal, T. Svoboda, P. Fadrus, M. Smrcka, O. Slaby, R. Lakomy, P. Vanhara, Z. Krenova, and J. Michalek. 2010. Production of immune-modulatory nonclassical molecules HLA-G and HLA-E by tumor infiltrating ameboid microglia/macrophages in glioblastomas: a role in innate immunity? *J.Neuroimmunol.* 220:131-135. doi:S0165-5728(10)00035-4 [pii];10.1016/j.jneuroim.2010.01.014 [doi].
- Kretschmer, K., I. Apostolou, D. Hawiger, K. Khazaie, M. C. Nussenzweig, and B. H. von. 2005. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat.Immunol.* 6:1219-1227. doi:ni1265 [pii];10.1038/ni1265 [doi].
- Krettek, A., G. Ostergren-Lunden, G. Fager, C. Rosmond, G. Bondjers, and F. Lustig. 2001. Expression of PDGF receptors and ligand-induced migration of partially differentiated human monocyte-derived macrophages. Influence of IFN- $\gamma$  and TGF- $\beta$ . *Atherosclerosis* 156:267-275. doi:S0021-9150(00)00644-4 [pii].
- Kroemker, M., A. H. Rudiger, B. M. Jockusch, and M. Rudiger. 1994. Intramolecular interactions in vinculin control alpha-actinin binding to the vinculin head. *FEBS Lett.* 355:259-262. doi:0014-5793(94)01216-4 [pii].
- Kryczek, I., M. Banerjee, P. Cheng, L. Vatan, W. Szeliga, S. Wei, E. Huang, E. Finlayson, D. Simeone, T. H. Welling, A. Chang, G. Coukos, R. Liu, and W. Zou. 2009. Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood* 114:1141-1149. doi:blood-2009-03-208249 [pii];10.1182/blood-2009-03-208249 [doi].
- Kryczek, I., E. Zhao, Y. Liu, Y. Wang, L. Vatan, W. Szeliga, J. Moyer, A. Klimczak, A. Lange, and W. Zou. 2011. Human TH17 cells are long-lived effector memory cells. *Sci.Transl.Med.* 3:104ra100. doi:3/104/104ra100 [pii];10.1126/scitranslmed.3002949 [doi].
- Kryczek, I., L. Zou, P. Rodriguez, G. Zhu, S. Wei, P. Mottram, M. Brumlik, P. Cheng, T. Curiel, L. Myers, A. Lackner, X. Alvarez, A. Ochoa, L. Chen, and W. Zou. 2006. B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma. *J.Exp.Med.* 203:871-881. doi:jem.20050930 [pii];10.1084/jem.20050930 [doi].
- Kuang, D. M., Q. Zhao, C. Peng, J. Xu, J. P. Zhang, C. Wu, and L. Zheng. 2009. Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1. *J.Exp.Med.* 206:1327-1337. doi:jem.20082173 [pii];10.1084/jem.20082173 [doi].
- Kudo-Saito, C., H. Shirako, M. Ohike, N. Tsukamoto, and Y. Kawakami. 2013. CCL2 is critical for immunosuppression to promote cancer metastasis. *Clin.Exp.Metastasis* 30:393-405. doi:10.1007/s10585-012-9545-6 [doi].
- Kuemmerle, J. F. 2006. Occupation of alphavbeta3-integrin by endogenous ligands modulates IGF-I receptor activation and proliferation of human intestinal smooth muscle. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 290:G1194-G1202. doi:00345.2005 [pii];10.1152/ajpgi.00345.2005 [doi].

- Kumagai, Y., O. Takeuchi, and S. Akira. 2008. TLR9 as a key receptor for the recognition of DNA. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60:795-804. doi:S0169-409X(07)00382-1 [pii];10.1016/j.addr.2007.12.004 [doi].
- Kumar, V. and D. I. Gabrilovich. 2014. Hypoxia-inducible factors in regulation of immune responses in tumour microenvironment. *Immunology* 143:512-519. doi:10.1111/imm.12380 [doi].
- Kumar, V. and A. Sharma. 2009. Adenosine: an endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential. *Eur. J. Pharmacol.* 616:7-15. doi:S0014-2999(09)00468-3 [pii];10.1016/j.ejphar.2009.05.005 [doi].
- Kuno, K., N. Kanada, E. Nakashima, F. Fujiki, F. Ichimura, and K. Matsushima. 1997. Molecular cloning of a gene encoding a new type of metalloproteinase-disintegrin family protein with thrombospondin motifs as an inflammation associated gene. *J. Biol. Chem.* 272:556-562.
- Kurata, H., H. J. Lee, T. McClanahan, R. L. Coffman, A. O'Garra, and N. Arai. 2002. Friend of GATA is expressed in naive Th cells and functions as a repressor of GATA-3-mediated Th2 cell development. *J. Immunol.* 168:4538-4545.
- Kusuda, T., K. Shigemasa, K. Arihiro, T. Fujii, N. Nagai, and K. Ohama. 2005. Relative expression levels of Th1 and Th2 cytokine mRNA are independent prognostic factors in patients with ovarian cancer. *Oncol. Rep.* 13:1153-1158.
- Kusuma, N., R. L. Anderson, and N. Pouliot. 2011. Laminin alpha5-derived peptides modulate the properties of metastatic breast tumour cells. *Clin. Exp. Metastasis* 28:909-921. doi:10.1007/s10585-011-9422-8 [doi].
- Kutinova, L., V. Ludvikova, V. Simonova, M. Otavova, J. Krystofova, P. Hainz, M. Press, D. Kunke, and V. Vonka. 1995. Search for optimal parent for recombinant vaccinia virus vaccines. Study of three vaccinia virus vaccinal strains and several virus lines derived from them. *Vaccine* 13:487-493. doi:0264410X9400019J [pii].
- Kutinova, L., S. Nemeckova, E. Hamsikova, H. Zavadova, V. Ludvikova, J. Broucek, D. Kunke, J. Konig, L. G. Zakharova, G. V. Pashvykina, and . 1994. Hepatitis B virus proteins expressed by recombinant vaccinia viruses: influence of preS2 sequence on expression surface and nucleocapsid proteins in human diploid cells. *Arch. Virol.* 134:1-15.
- Lal, A., L. Chan, S. Devries, K. Chin, G. K. Scott, C. C. Benz, Y. Y. Chen, F. M. Waldman, and E. S. Hwang. 2013. FOXP3-positive regulatory T lymphocytes and epithelial FOXP3 expression in synchronous normal, ductal carcinoma in situ, and invasive cancer of the breast. *Breast Cancer Res. Treat.* 139:381-390. doi:10.1007/s10549-013-2556-4 [doi].
- Landowski, M., J. Dabundo, Q. Liu, A. V. Nicola, and H. C. Aguilar. 2014. Nipah virion entry kinetics, composition, and conformational changes determined by enzymatic virus-like particles and new flow virometry tools. *J. Virol.* 88:14197-14206. doi:JVI.01632-14 [pii];10.1128/JVI.01632-14 [doi].
- Laouar, Y., F. S. Sutterwala, L. Gorelik, and R. A. Flavell. 2005. Transforming growth factor-beta controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon-gamma. *Nat. Immunol.* 6:600-607. doi:ni1197 [pii];10.1038/ni1197 [doi].
- Laoui, D., O. E. Van, C. G. Di, C. Aldeni, J. Keirsse, Y. Morias, K. Movahedi, I. Houbracken, E. Schouppe, Y. Elkrim, O. Karroum, B. Jordan, P. Carmeliet, C. Gysemans, B. P. De, M. Mazzone, and J. A. Van Ginderachter. 2014. Tumor hypoxia does not drive differentiation of tumor-associated macrophages but rather fine-tunes the M2-like macrophage population. *Cancer Res.* 74:24-30. doi:0008-5472.CAN-13-1196 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-13-1196 [doi].
- Larbi, A., G. Levesque, L. Robert, D. Gagne, N. Douziech, and T. Fulop, Jr. 2005. Presence and active synthesis of the 67 kDa elastin-receptor in human circulating white blood cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332:787-792. doi:S0006-291X(05)00991-5 [pii];10.1016/j.bbrc.2005.05.021 [doi].
- Lathrop, S. K., S. M. Bloom, S. M. Rao, K. Nutsch, C. W. Lio, N. Santacruz, D. A. Peterson, T. S. Stappenbeck, and C. S. Hsieh. 2011. Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota. *Nature* 478:250-254. doi:nature10434 [pii];10.1038/nature10434 [doi].
- Lawson, C., S. T. Lim, S. Uryu, X. L. Chen, D. A. Calderwood, and D. D. Schlaepfer. 2012. FAK promotes recruitment of talin to nascent adhesions to control cell motility. *J. Cell Biol.* 196:223-232. doi:jcb.201108078 [pii];10.1083/jcb.201108078 [doi].
- Lazard, D., X. Sastre, M. G. Frid, M. A. Glukhova, J. P. Thiery, and V. E. Koteliansky. 1993. Expression of smooth muscle-specific proteins in myoepithelium and stromal myofibroblasts of normal and malignant human breast tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 90:999-1003.
- Lazarevic, V., X. Chen, J. H. Shim, E. S. Hwang, E. Jang, A. N. Bolm, M. Oukka, V. K. Kuchroo, and L. H. Glimcher. 2011. T-bet represses T(H)17 differentiation by preventing Runx1-mediated activation of the gene encoding RORgammat. *Nat. Immunol.* 12:96-104. doi:ni.1969 [pii];10.1038/ni.1969 [doi].
- Lebbink, R. J., R. T. de, J. Adelmeijer, A. B. Brenkman, J. M. van Helvoort, M. Koch, R. W. Farndale, T. Lisman, A. Sonnenberg, P. J. Lenting, and L. Meyaard. 2006. Collagens are functional, high affinity ligands for the inhibitory immune receptor LAIR-1. *J. Exp. Med.* 203:1419-1425. doi:jem.20052554 [pii];10.1084/jem.20052554 [doi].

- Lederle, W., B. Hartenstein, A. Meides, H. Kunzelmann, Z. Werb, P. Angel, and M. M. Mueller. 2010. MMP13 as a stromal mediator in controlling persistent angiogenesis in skin carcinoma. *Carcinogenesis* 31:1175-1184. doi:10.1093/carcin/bgp248 [pii];10.1093/carcin/bgp248 [doi].
- Lee, B. Y., P. Timpson, L. G. Horvath, and R. J. Daly. 2014. FAK Signaling in Human Cancer as a Target for Therapeutics. *Pharmacol. Ther.* doi:S0163-7258(14)00187-9 [pii];10.1016/j.pharmthera.2014.10.001 [doi].
- Lee, D. F., H. P. Kuo, C. T. Chen, J. M. Hsu, C. K. Chou, Y. Wei, H. L. Sun, L. Y. Li, B. Ping, W. C. Huang, X. He, J. Y. Hung, C. C. Lai, Q. Ding, J. L. Su, J. Y. Yang, A. A. Sahin, G. N. Hortobagyi, F. J. Tsai, C. H. Tsai, and M. C. Hung. 2007. IKK beta suppression of TSC1 links inflammation and tumor angiogenesis via the mTOR pathway. *Cell* 130:440-455. doi:S0092-8674(07)00762-3 [pii];10.1016/j.cell.2007.05.058 [doi].
- Lee, G. K., H. J. Park, M. Macleod, P. Chandler, D. H. Munn, and A. L. Mellor. 2002. Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division. *Immunology* 107:452-460. doi:1526 [pii].
- Lee, G. R. 2014. Transcriptional regulation of T helper type 2 differentiation. *Immunology* 141:498-505. doi:10.1111/imm.12216 [doi].
- Lee, H., A. Herrmann, J. H. Deng, M. Kujawski, G. Niu, Z. Li, S. Forman, R. Jove, D. M. Pardoll, and H. Yu. 2009. Persistently activated Stat3 maintains constitutive NF-kappaB activity in tumors. *Cancer Cell* 15:283-293. doi:S1535-6108(09)00071-3 [pii];10.1016/j.ccr.2009.02.015 [doi].
- Lee, H. O., S. R. Mullins, J. Franco-Barraza, M. Valianou, E. Cukierman, and J. D. Cheng. 2011. FAP-overexpressing fibroblasts produce an extracellular matrix that enhances invasive velocity and directionality of pancreatic cancer cells. *BMC.Cancer* 11:245. doi:1471-2407-11-245 [pii];10.1186/1471-2407-11-245 [doi].
- Lee, J. J., Y. L. Chang, W. L. Lai, J. Y. Ko, M. Y. Kuo, C. P. Chiang, M. Azuma, C. W. Chen, and J. S. Chia. 2011. Increased prevalence of interleukin-17-producing CD4(+) tumor infiltrating lymphocytes in human oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* 33:1301-1308. doi:10.1002/hed.21607 [doi].
- Lee, K. W., L. Ma, X. Yan, B. Liu, X. K. Zhang, and P. Cohen. 2005. Rapid apoptosis induction by IGFBP-3 involves an insulin-like growth factor-independent nucleomitochondrial translocation of RXRalpha/Nur77. *J.Biol.Chem.* 280:16942-16948. doi:M412757200 [pii];10.1074/jbc.M412757200 [doi].
- Lee, S., S. M. Jilani, G. V. Nikolova, D. Carpizo, and M. L. Iruela-Arispe. 2005. Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. *J.Cell Biol.* 169:681-691. doi:jcb.200409115 [pii];10.1083/jcb.200409115 [doi].
- Lee, S. E., R. D. Kamm, and M. R. Mofrad. 2007. Force-induced activation of talin and its possible role in focal adhesion mechanotransduction. *J.Biomech.* 40:2096-2106. doi:S0021-9290(07)00164-9 [pii];10.1016/j.jbiomech.2007.04.006 [doi].
- Lee, S. J., E. J. Lee, S. K. Kim, P. Jeong, Y. H. Cho, S. J. Yun, S. Kim, G. Y. Kim, Y. H. Choi, E. J. Cha, W. J. Kim, and S. K. Moon. 2012. Identification of pro-inflammatory cytokines associated with muscle invasive bladder cancer; the roles of IL-5, IL-20, and IL-28A. *PLoS.One.* 7:e40267. doi:10.1371/journal.pone.0040267 [doi];PONE-D-12-03305 [pii].
- Lee, Y., A. Awasthi, N. Yosef, F. J. Quintana, S. Xiao, A. Peters, C. Wu, M. Kleinewietfeld, S. Kunder, D. A. Hafler, R. A. Sobel, A. Regev, and V. K. Kuchroo. 2012. Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nat.Immunol.* 13:991-999. doi:ni.2416 [pii];10.1038/ni.2416 [doi].
- Lee, Y. C., S. Jogie-Brahim, D. Y. Lee, J. Han, A. Harada, L. J. Murphy, and Y. Oh. 2011. Insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3) blocks the effects of asthma by negatively regulating NF-kappaB signaling through IGFBP-3R-mediated activation of caspases. *J.Biol.Chem.* 286:17898-17909. doi:M111.231035 [pii];10.1074/jbc.M111.231035 [doi].
- Lee, Y. J., Y. Han, H. T. Lu, V. Nguyen, H. Qin, P. H. Howe, B. A. Hocevar, J. M. Boss, R. M. Ransohoff, and E. N. Benveniste. 1997. TGF-beta suppresses IFN-gamma induction of class II MHC gene expression by inhibiting class II transactivator messenger RNA expression. *J.Immunol.* 158:2065-2075.
- Lee, Y. K., H. Turner, C. L. Maynard, J. R. Oliver, D. Chen, C. O. Elson, and C. T. Weaver. 2009. Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. *Immunity* 30:92-107. doi:S1074-7613(08)00546-3 [pii];10.1016/j.immuni.2008.11.005 [doi].
- Lehe, C., H. Ghebeh, A. Al-Sulaiman, Q. G. Al, K. Al-Hussein, F. Almohareb, N. Chaudhri, F. Alsharif, H. Al-Zahrani, A. Tbakhi, M. Aljurf, and S. Dermime. 2008. The Wilms' tumor antigen is a novel target for human CD4+ regulatory T cells: implications for immunotherapy. *Cancer Res.* 68:6350-6359. doi:68/15/6350 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-08-0050 [doi].
- Leight, J. L., M. A. Wozniak, S. Chen, M. L. Lynch, and C. S. Chen. 2012. Matrix rigidity regulates a switch between TGF-beta1-induced apoptosis and epithelial-mesenchymal transition. *Mol.Biol.Cell* 23:781-791. doi:mbc.E11-06-0537 [pii];10.1091/mbc.E11-06-0537 [doi].
- Lemjabbar-Alaoui, H., Z. A. van, M. S. Singer, Q. Xue, Y. Q. Wang, D. Tsay, B. He, D. M. Jablons, and S. D. Rosen. 2010. Sulf-2, a heparan sulfate endosulfatase, promotes human lung carcinogenesis. *Oncogene* 29:635-646. doi:onc2009365 [pii];10.1038/onc.2009.365 [doi].

- Lesina, M., M. U. Kurkowski, K. Ludes, S. Rose-John, M. Treiber, G. Kloppel, A. Yoshimura, W. Reindl, B. Sipos, S. Akira, R. M. Schmid, and H. Algul. 2011. Stat3/Socs3 activation by IL-6 transsignaling promotes progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic cancer. *Cancer Cell* 19:456-469. doi:S1535-6108(11)00119-X [pii];10.1016/j.ccr.2011.03.009 [doi].
- Levental, K. R., H. Yu, L. Kass, J. N. Lakins, M. Egeblad, J. T. Erler, S. F. Fong, K. Csiszar, A. Giaccia, W. Weninger, M. Yamauchi, D. L. Gasser, and V. M. Weaver. 2009. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* 139:891-906. doi:S0092-8674(09)01353-1 [pii];10.1016/j.cell.2009.10.027 [doi].
- Levy, L. and C. S. Hill. 2006. Alterations in components of the TGF-beta superfamily signaling pathways in human cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 17:41-58. doi:S1359-6101(05)00113-9 [pii];10.1016/j.cytogfr.2005.09.009 [doi].
- Lewen, S., H. Zhou, H. D. Hu, T. Cheng, D. Markowitz, R. A. Reisfeld, R. Xiang, and Y. Luo. 2008. A Legumain-based minigene vaccine targets the tumor stroma and suppresses breast cancer growth and angiogenesis. *Cancer Immunol.Immunother.* 57:507-515. doi:10.1007/s00262-007-0389-x [doi].
- Lewis, C. E. and J. W. Pollard. 2006. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res.* 66:605-612. doi:66/2/605 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-05-4005 [doi].
- Li, G., J. A. Harton, X. Zhu, and J. P. Ting. 2001. Downregulation of CIITA function by protein kinase a (PKA)-mediated phosphorylation: mechanism of prostaglandin E, cyclic AMP, and PKA inhibition of class II major histocompatibility complex expression in monocytic lines. *Mol.Cell Biol.* 21:4626-4635. doi:10.1128/MCB.21.14.4626-4635.2001 [doi].
- Li, H. J., F. Reinhardt, H. R. Herschman, and R. A. Weinberg. 2012. Cancer-stimulated mesenchymal stem cells create a carcinoma stem cell niche via prostaglandin E2 signaling. *Cancer Discov.* 2:840-855. doi:2159-8290.CD-12-0101 [pii];10.1158/2159-8290.CD-12-0101 [doi].
- Li, Q., P. W. Park, C. L. Wilson, and W. C. Parks. 2002. Matrilysin shedding of syndecan-1 regulates chemokine mobilization and transepithelial efflux of neutrophils in acute lung injury. *Cell* 111:635-646. doi:S0092867402010796 [pii].
- Li, Z., M. J. Calzada, J. M. Sipes, J. A. Cashel, H. C. Krutzsch, D. S. Annis, D. F. Mosher, and D. D. Roberts. 2002. Interactions of thrombospondins with alpha4beta1 integrin and CD47 differentially modulate T cell behavior. *J.Cell Biol.* 157:509-519. doi:10.1083/jcb.200109098 [doi];jcb.200109098 [pii].
- Li, Z., L. He, K. Wilson, and D. Roberts. 2001. Thrombospondin-1 inhibits TCR-mediated T lymphocyte early activation. *J.Immunol.* 166:2427-2436.
- Liang, B., C. Workman, J. Lee, C. Chew, B. M. Dale, L. Colonna, M. Flores, N. Li, E. Schweighoffer, S. Greenberg, V. Tybulewicz, D. Vignali, and R. Clynes. 2008. Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J.Immunol.* 180:5916-5926. doi:180/9/5916 [pii].
- Liao, D., Y. Luo, D. Markowitz, R. Xiang, and R. A. Reisfeld. 2009. Cancer associated fibroblasts promote tumor growth and metastasis by modulating the tumor immune microenvironment in a 4T1 murine breast cancer model. *PLoS.One.* 4:e7965. doi:10.1371/journal.pone.0007965 [doi].
- Liao, W., D. E. Schones, J. Oh, Y. Cui, K. Cui, T. Y. Roh, K. Zhao, and W. J. Leonard. 2008. Priming for T helper type 2 differentiation by interleukin 2-mediated induction of interleukin 4 receptor alpha-chain expression. *Nat.Immunol.* 9:1288-1296. doi:ni.1656 [pii];10.1038/ni.1656 [doi].
- Liao, X., N. Sharma, F. Kapadia, G. Zhou, Y. Lu, H. Hong, K. Paruchuri, G. H. Mahabeleshwar, E. Dalmás, N. Venter, C. A. Flask, J. Kim, B. W. Doreian, K. Q. Lu, K. H. Kaestner, A. Hamik, K. Clement, and M. K. Jain. 2011. Kruppel-like factor 4 regulates macrophage polarization. *J.Clin.Invest* 121:2736-2749. doi:45444 [pii];10.1172/JCI45444 [doi].
- Lighvani, A. A., D. M. Frucht, D. Jankovic, H. Yamane, J. Aliberti, B. D. Hissong, B. V. Nguyen, M. Gadina, A. Sher, W. E. Paul, and J. J. O'Shea. 2001. T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98:15137-15142. doi:10.1073/pnas.261570598 [doi];98/26/15137 [pii].
- Lin, E. Y., A. V. Nguyen, R. G. Russell, and J. W. Pollard. 2001. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J.Exp.Med.* 193:727-740.
- Lin, J. T., N. B. Lineberry, M. G. Kattah, L. L. Su, P. J. Utz, C. G. Fathman, and L. Wu. 2009. Naive CD4 t cell proliferation is controlled by mammalian target of rapamycin regulation of GRAIL expression. *J.Immunol.* 182:5919-5928. doi:182/10/5919 [pii];10.4049/jimmunol.0803986 [doi].
- Lin, K. Y., F. G. Guarnieri, K. F. Staveley-O'Carroll, H. I. Levitsky, J. T. August, D. M. Pardoll, and T. C. Wu. 1996. Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Cancer Res.* 56:21-26.
- Lin, L., A. S. Ibrahim, X. Xu, J. M. Farber, V. Avanesian, B. Baquir, Y. Fu, S. W. French, J. E. Edwards, Jr., and B. Spellberg. 2009. Th1-Th17 cells mediate protective adaptive immunity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* infection in mice. *PLoS.Pathog.* 5:e1000703. doi:10.1371/journal.ppat.1000703 [doi].

- Lin, P. Y., H. Y. Jen, B. L. Chiang, F. Sheu, and Y. H. Chuang. 2014. Interleukin-21 suppresses the differentiation and functions of T helper 2 cells. *Immunology*. doi:10.1111/imm.12419 [doi].
- Lin, X., M. Chen, Y. Liu, Z. Guo, X. He, D. Brand, and S. G. Zheng. 2013. Advances in distinguishing natural from induced Foxp3(+) regulatory T cells. *Int.J.Clin.Exp.Pathol.* 6:116-123.
- Linder, S. and M. Aepfelbacher. 2003. Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. *Trends Cell Biol.* 13:376-385. doi:S0962892403001284 [pii].
- Lipfert, L., B. Haimovich, M. D. Schaller, B. S. Cobb, J. T. Parsons, and J. S. Brugge. 1992. Integrin-dependent phosphorylation and activation of the protein tyrosine kinase pp125FAK in platelets. *J.Cell Biol.* 119:905-912.
- Liskova, J., J. Knitlova, R. Honner, and Z. Melkova. 2011. Apoptosis and necrosis in vaccinia virus-infected HeLa G and BSC-40 cells. *Virus Res.* 160:40-50. doi:S0168-1702(11)00172-9 [pii];10.1016/j.virusres.2011.05.005 [doi].
- Liu, C., C. Sun, H. Huang, K. Janda, and T. Edgington. 2003. Overexpression of legumain in tumors is significant for invasion/metastasis and a candidate enzymatic target for prodrug therapy. *Cancer Res.* 63:2957-2964.
- Liu, F., X. Hu, M. Zimmerman, J. L. Waller, P. Wu, A. Hayes-Jordan, D. Lev, and K. Liu. 2011. TNFalpha cooperates with IFN-gamma to repress Bcl-xL expression to sensitize metastatic colon carcinoma cells to TRAIL-mediated apoptosis. *PLoS.One.* 6:e16241. doi:10.1371/journal.pone.0016241 [doi].
- Liu, G., C. L. Atteridge, X. Wang, A. D. Lundgren, and J. D. Wu. 2010. The membrane type matrix metalloproteinase MMP14 mediates constitutive shedding of MHC class I chain-related molecule A independent of A disintegrin and metalloproteinases. *J.Immunol.* 184:3346-3350. doi:jimmunol.0903789 [pii];10.4049/jimmunol.0903789 [doi].
- Liu, J., Y. Duan, X. Cheng, X. Chen, W. Xie, H. Long, Z. Lin, and B. Zhu. 2011. IL-17 is associated with poor prognosis and promotes angiogenesis via stimulating VEGF production of cancer cells in colorectal carcinoma. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 407:348-354. doi:S0006-291X(11)00393-7 [pii];10.1016/j.bbrc.2011.03.021 [doi].
- Liu, J., N. Zhang, Q. Li, W. Zhang, F. Ke, Q. Leng, H. Wang, J. Chen, and H. Wang. 2011. Tumor-associated macrophages recruit CCR6+ regulatory T cells and promote the development of colorectal cancer via enhancing CCL20 production in mice. *PLoS.One.* 6:e19495. doi:10.1371/journal.pone.0019495 [doi];PONE-D-10-04249 [pii].
- Liu, L., B. E. Rich, J. Inobe, W. Chen, and H. L. Weiner. 1998. Induction of Th2 cell differentiation in the primary immune response: dendritic cells isolated from adherent cell culture treated with IL-10 prime naive CD4+ T cells to secrete IL-4. *Int.Immunol.* 10:1017-1026.
- Liu, S., C. Ginestier, S. J. Ou, S. G. Clouthier, S. H. Patel, F. Monville, H. Korkaya, A. Heath, J. Dutcher, C. G. Kleer, Y. Jung, G. Dontu, R. Taichman, and M. S. Wicha. 2011. Breast cancer stem cells are regulated by mesenchymal stem cells through cytokine networks. *Cancer Res.* 71:614-624. doi:0008-5472.CAN-10-0538 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-10-0538 [doi].
- Liu, V. C., L. Y. Wong, T. Jang, A. H. Shah, I. Park, X. Yang, Q. Zhang, S. Lonning, B. A. Teicher, and C. Lee. 2007. Tumor evasion of the immune system by converting CD4+. *J.Immunol.* 178:2883-2892. doi:178/5/2883 [pii].
- Liu, W., A. L. Putnam, Z. Xu-Yu, G. L. Szot, M. R. Lee, S. Zhu, P. A. Gottlieb, P. Kapranov, T. R. Gingeras, G. B. Fazekas de St, C. Clayberger, D. M. Soper, S. F. Ziegler, and J. A. Bluestone. 2006. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J.Exp.Med.* 203:1701-1711. doi:jem.20060772 [pii];10.1084/jem.20060772 [doi].
- Liu, W. H. and M. Z. Lai. 2005. Deltex regulates T-cell activation by targeted degradation of active MEKK1. *Mol.Cell Biol.* 25:1367-1378. doi:25/4/1367 [pii];10.1128/MCB.25.4.1367-1378.2005 [doi].
- Liu, Y., K. M. Bajjuri, C. Liu, and S. C. Sinha. 2012. Targeting cell surface alpha(v)beta(3) integrin increases therapeutic efficacies of a legumain protease-activated auristatin prodrug. *Mol.Pharm.* 9:168-175. doi:10.1021/mp200434n [doi].
- Liu, Y., Z. P. Han, S. S. Zhang, Y. Y. Jing, X. X. Bu, C. Y. Wang, K. Sun, G. C. Jiang, X. Zhao, R. Li, L. Gao, Q. D. Zhao, M. C. Wu, and L. X. Wei. 2011. Effects of inflammatory factors on mesenchymal stem cells and their role in the promotion of tumor angiogenesis in colon cancer. *J.Biol.Chem.* 286:25007-25015. doi:M110.213108 [pii];10.1074/jbc.M110.213108 [doi].
- Liu, Y., Z. Yin, R. Zhang, K. Yan, L. Chen, F. Chen, W. Huang, B. Lv, C. Sun, and X. Jiang. 2014. MSCs inhibit bone marrow-derived DC maturation and function through the release of TSG-6. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 450:1409-1415. doi:S0006-291X(14)01215-7 [pii];10.1016/j.bbrc.2014.07.001 [doi].
- Lochner, M., L. Peduto, M. Cherrier, S. Sawa, F. Langa, R. Varona, D. Riethmacher, M. Si-Tahar, J. P. Di Santo, and G. Eberl. 2008. In vivo equilibrium of proinflammatory IL-17+ and regulatory IL-10+ Foxp3+ RORgamma t+ T cells. *J.Exp.Med.* 205:1381-1393. doi:jem.20080034 [pii];10.1084/jem.20080034 [doi].
- Loechel, F., J. W. Fox, G. Murphy, R. Albrechtsen, and U. M. Wewer. 2000. ADAM 12-S cleaves IGFBP-3 and IGFBP-5 and is inhibited by TIMP-3. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 278:511-515. doi:10.1006/bbrc.2000.3835 [doi];S0006-291X(00)93835-X [pii].

- Loike, J. D., L. Cao, S. Budhu, S. Hoffman, and S. C. Silverstein. 2001. Blockade of alpha 5 beta 1 integrins reverses the inhibitory effect of tenascin on chemotaxis of human monocytes and polymorphonuclear leukocytes through three-dimensional gels of extracellular matrix proteins. *J.Immunol.* 166:7534-7542.
- Lokshin, A., T. Raskovalova, X. Huang, L. C. Zacharia, E. K. Jackson, and E. Gorelik. 2006. Adenosine-mediated inhibition of the cytotoxic activity and cytokine production by activated natural killer cells. *Cancer Res.* 66:7758-7765. doi:66/15/7758 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-06-0478 [doi].
- Long, M., S. G. Park, I. Strickland, M. S. Hayden, and S. Ghosh. 2009. Nuclear factor-kappaB modulates regulatory T cell development by directly regulating expression of Foxp3 transcription factor. *Immunity.* 31:921-931. doi:S1074-7613(09)00500-7 [pii];10.1016/j.immuni.2009.09.022 [doi].
- Lopez-Moratalla, N., C. M. del Mar, M. J. Lopez-Zabalza, L. A. Perez-Mediavilla, M. L. subira, and E. Santiago. 1995. Activation of human lymphomononuclear cells by peptides derived from extracellular matrix proteins. *Biochim.Biophys.Acta* 1265:181-188.
- Lortat-Jacob, H. and J. A. Grimaud. 1991. Interferon-gamma binds to heparan sulfate by a cluster of amino acids located in the C-terminal part of the molecule. *FEBS Lett.* 280:152-154. doi:0014-5793(91)80225-R [pii].
- Lu, P., V. M. Weaver, and Z. Werb. 2012. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J.Cell Biol.* 196:395-406. doi:jcb.201102147 [pii];10.1083/jcb.201102147 [doi].
- Lu, X. F., X. G. Jiang, Y. B. Lu, J. H. Bai, and Z. B. Mao. 2005. Characterization of a novel positive transcription regulatory element that differentially regulates the insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) gene in senescent cells. *J.Biol.Chem.* 280:22606-22615. doi:M412073200 [pii];10.1074/jbc.M412073200 [doi].
- Lu, Y., S. Hong, H. Li, J. Park, B. Hong, L. Wang, Y. Zheng, Z. Liu, J. Xu, J. He, J. Yang, J. Qian, and Q. Yi. 2012. Th9 cells promote antitumor immune responses in vivo. *J.Clin.Invest* 122:4160-4171. doi:65459 [pii];10.1172/JCI65459 [doi].
- Luo, C. T. and M. O. Li. 2013. Transcriptional control of regulatory T cell development and function. *Trends Immunol.* 34:531-539. doi:S1471-4906(13)00129-4 [pii];10.1016/j.it.2013.08.003 [doi].
- Luo, Y., L. Lan, Y. G. Jiang, J. H. Zhao, M. C. Li, N. B. Wei, and Y. H. Lin. 2013. Epithelial-mesenchymal transition and migration of prostate cancer stem cells is driven by cancer-associated fibroblasts in an HIF-1alpha/beta-catenin-dependent pathway. *Mol.Cells* 36:138-144. doi:10.1007/s10059-013-0096-8 [doi].
- Luo, Y., H. Zhou, J. Krueger, C. Kaplan, S. H. Lee, C. Dolman, D. Markowitz, W. Wu, C. Liu, R. A. Reisfeld, and R. Xiang. 2006. Targeting tumor-associated macrophages as a novel strategy against breast cancer. *J.Clin.Invest* 116:2132-2141. doi:10.1172/JCI27648 [doi].
- Lusson, J., S. Benjannet, J. Hamelin, D. Savaria, M. Chretien, and N. G. Seidah. 1997. The integrity of the RRGDL sequence of the proprotein convertase PC1 is critical for its zymogen and C-terminal processing and for its cellular trafficking. *Biochem.J.* 326 ( Pt 3):737-744.
- Luz-Crawford, P., M. Kurte, J. Bravo-Alegria, R. Contreras, E. Nova-Lamperti, G. Tejedor, D. Noel, C. Jorgensen, F. Figueroa, F. Djouad, and F. Carrion. 2013. Mesenchymal stem cells generate a CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cell population during the differentiation process of Th1 and Th17 cells. *Stem Cell Res.Ther.* 4:65. doi:srct216 [pii];10.1186/srct216 [doi].
- Lv, L., K. Pan, X. D. Li, K. L. She, J. J. Zhao, W. Wang, J. G. Chen, Y. B. Chen, J. P. Yun, and J. C. Xia. 2011. The accumulation and prognosis value of tumor infiltrating IL-17 producing cells in esophageal squamous cell carcinoma. *PLoS.One.* 6:e18219. doi:10.1371/journal.pone.0018219 [doi].
- Lyon, M., G. Rushton, and J. T. Gallagher. 1997. The interaction of the transforming growth factor-betas with heparin/heparan sulfate is isoform-specific. *J.Biol.Chem.* 272:18000-18006.
- Ma, Y., G. V. Shurin, D. W. Gutkin, and M. R. Shurin. 2012. Tumor associated regulatory dendritic cells. *Semin.Cancer Biol.* 22:298-306. doi:S1044-579X(12)00046-6 [pii];10.1016/j.semcancer.2012.02.010 [doi].
- Mackova, J., L. Kutinova, P. Hainz, J. Krystofova, V. Sroller, P. Otahal, P. Gabriel, and S. Nemeckova. 2004. Adjuvant effect of dendritic cells transduced with recombinant vaccinia virus expressing HPV16-E7 is inhibited by co-expression of IL12. *Int.J.Oncol.* 24:1581-1588.
- Maeda, S., D. D. Dean, R. Gomez, Z. Schwartz, and B. D. Boyan. 2002. The first stage of transforming growth factor beta1 activation is release of the large latent complex from the extracellular matrix of growth plate chondrocytes by matrix vesicle stromelysin-1 (MMP-3). *Calcif.Tissue Int.* 70:54-65. doi:10.1007/s002230010032 [doi].
- Maggini, J., G. Mirkin, I. Bognanni, J. Holmberg, I. M. Piazzon, I. Nepomnaschy, H. Costa, C. Canones, S. Raiden, M. Vermeulen, and J. R. Geffner. 2010. Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile. *PLoS.One.* 5:e9252. doi:10.1371/journal.pone.0009252 [doi].
- Mahabeleshwar, G. H., D. Kawanami, N. Sharma, Y. Takami, G. Zhou, H. Shi, L. Nayak, D. Jeyaraj, R. Greal, M. White, R. McManus, T. Ryan, P. Leahy, Z. Lin, S. M. Haldar, G. B. Atkins, H. R. Wong, J. B. Lingrel, and M. K. Jain. 2011. The myeloid transcription factor KLF2 regulates the host response to polymicrobial infection and endotoxic shock. *Immunity.* 34:715-728. doi:S1074-7613(11)00177-4 [pii];10.1016/j.immuni.2011.04.014 [doi].

- Mahic, M., S. Yaqub, C. C. Johansson, K. Tasken, and E. M. Aandahl. 2006. FOXP3+CD4+CD25+ adaptive regulatory T cells express cyclooxygenase-2 and suppress effector T cells by a prostaglandin E2-dependent mechanism. *J.Immunol.* 177:246-254. doi:177/1/246 [pii].
- Mahmoud, S. M., A. H. Lee, E. C. Paish, R. D. Macmillan, I. O. Ellis, and A. R. Green. 2012. Tumour-infiltrating macrophages and clinical outcome in breast cancer. *J.Clin.Pathol.* 65:159-163. doi:jclinpath-2011-200355 [pii];10.1136/jclinpath-2011-200355 [doi].
- Mahmoud, S. M., E. C. Paish, D. G. Powe, R. D. Macmillan, M. J. Grainge, A. H. Lee, I. O. Ellis, and A. R. Green. 2011. Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J.Clin.Oncol.* 29:1949-1955. doi:JCO.2010.30.5037 [pii];10.1200/JCO.2010.30.5037 [doi].
- Mahnke, K., Y. Qian, J. Knop, and A. H. Enk. 2003. Induction of CD4+/CD25+ regulatory T cells by targeting of antigens to immature dendritic cells. *Blood* 101:4862-4869. doi:10.1182/blood-2002-10-3229 [doi];2002-10-3229 [pii].
- Maier, H. J., U. Schmidt-Strassburger, M. A. Huber, E. M. Wiedemann, H. Beug, and T. Wirth. 2010. NF-kappaB promotes epithelial-mesenchymal transition, migration and invasion of pancreatic carcinoma cells. *Cancer Lett.* 295:214-228. doi:S0304-3835(10)00140-0 [pii];10.1016/j.canlet.2010.03.003 [doi].
- Makitie, T., P. Summanen, A. Tarkkanen, and T. Kivela. 2001. Tumor-infiltrating macrophages (CD68(+) cells) and prognosis in malignant uveal melanoma. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 42:1414-1421.
- Malanchi, I., A. Santamaria-Martinez, E. Susanto, H. Peng, H. A. Lehr, J. F. Delaloye, and J. Huelsken. 2012. Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. *Nature* 481:85-89. doi:nature10694 [pii];10.1038/nature10694 [doi].
- Mandal, M., D. Bandyopadhyay, T. M. Goepfert, and R. Kumar. 1998. Interferon-induces expression of cyclin-dependent kinase-inhibitors p21WAF1 and p27Kip1 that prevent activation of cyclin-dependent kinase by CDK-activating kinase (CAK). *Oncogene* 16:217-225. doi:10.1038/sj.onc.1201529 [doi].
- Mandapathil, M., B. Hilldorfer, M. J. Szczepanski, M. Czystowska, M. Szajnik, J. Ren, S. Lang, E. K. Jackson, E. Gorelik, and T. L. Whiteside. 2010. Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *J.Biol.Chem.* 285:7176-7186. doi:M109.047423 [pii];10.1074/jbc.M109.047423 [doi].
- Mandapathil, M., M. J. Szczepanski, M. Szajnik, J. Ren, D. E. Lenzner, E. K. Jackson, E. Gorelik, S. Lang, J. T. Johnson, and T. L. Whiteside. 2009. Increased ectonucleotidase expression and activity in regulatory T cells of patients with head and neck cancer. *Clin.Cancer Res.* 15:6348-6357. doi:1078-0432.CCR-09-1143 [pii];10.1158/1078-0432.CCR-09-1143 [doi].
- Manes, S., M. Llorente, R. A. Lacalle, C. Gomez-Mouton, L. Kremer, E. Mira, and A. Martinez. 1999. The matrix metalloproteinase-9 regulates the insulin-like growth factor-triggered autocrine response in DU-145 carcinoma cells. *J.Biol.Chem.* 274:6935-6945.
- Manes, S., E. Mira, M. M. Barbacid, A. Cipres, P. Fernandez-Resa, J. M. Buesa, I. Merida, M. Aracil, G. Marquez, and A. Martinez. 1997. Identification of insulin-like growth factor-binding protein-1 as a potential physiological substrate for human stromelysin-3. *J.Biol.Chem.* 272:25706-25712.
- Manetti, R., P. Parronchi, M. G. Giudizi, M. P. Piccinini, E. Maggi, G. Trinchieri, and S. Romagnani. 1993. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J.Exp.Med.* 177:1199-1204.
- Mangan, P. R., L. E. Harrington, D. B. O'Quinn, W. S. Helms, D. C. Bullard, C. O. Elson, R. D. Hatton, S. M. Wahl, T. R. Schoeb, and C. T. Weaver. 2006. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 441:231-234. doi:nature04754 [pii];10.1038/nature04754 [doi].
- Mani, S. A., W. Guo, M. J. Liao, E. N. Eaton, A. Ayyanan, A. Y. Zhou, M. Brooks, F. Reinhard, C. C. Zhang, M. Shipitsin, L. L. Campbell, K. Polyak, C. Briskin, J. Yang, and R. A. Weinberg. 2008. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133:704-715. doi:S0092-8674(08)00444-3 [pii];10.1016/j.cell.2008.03.027 [doi].
- Mansfield, P. J. and S. J. Suchard. 1994. Thrombospondin promotes chemotaxis and haptotaxis of human peripheral blood monocytes. *J.Immunol.* 153:4219-4229.
- Mantovani, A., A. Sica, and M. Locati. 2005. Macrophage polarization comes of age. *Immunity.* 23:344-346. doi:S1074-7613(05)00313-4 [pii];10.1016/j.immuni.2005.10.001 [doi].
- Mantovani, A., A. Sica, S. Sozzani, P. Allavena, A. Vecchi, and M. Locati. 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25:677-686. doi:S1471-4906(04)00295-9 [pii];10.1016/j.it.2004.09.015 [doi].
- Marcoe, J. P., J. R. Lim, K. L. Schaubert, N. Fodil-Cornu, M. Matka, A. L. McCubbrey, A. R. Farr, S. M. Vidal, and Y. Laouar. 2012. TGF-beta is responsible for NK cell immaturity during ontogeny and increased susceptibility to infection during mouse infancy. *Nat.Immunol.* 13:843-850. doi:ni.2388 [pii];10.1038/ni.2388 [doi].

- Marom, B., M. A. Rahat, N. Lahat, L. Weiss-Cerem, A. Kinarty, and H. Bitterman. 2007. Native and fragmented fibronectin oppositely modulate monocyte secretion of MMP-9. *J.Leukoc.Biol.* 81:1466-1476. doi:jlb.0506328 [pii];10.1189/jlb.0506328 [doi].
- Marotta, L. L., V. Almendro, A. Marusyk, M. Shipitsin, J. Schemme, S. R. Walker, N. Bloushtain-Qimron, J. J. Kim, S. A. Choudhury, R. Maruyama, Z. Wu, M. Gonen, L. A. Mulvey, M. O. Bessarabova, S. J. Huh, S. J. Silver, S. Y. Kim, S. Y. Park, H. E. Lee, K. S. Anderson, A. L. Richardson, T. Nikolskaya, Y. Nikolsky, X. S. Liu, D. E. Root, W. C. Hahn, D. A. Frank, and K. Polyak. 2011. The JAK2/STAT3 signaling pathway is required for growth of CD44(+)CD24(-) stem cell-like breast cancer cells in human tumors. *J.Clin.Invest* 121:2723-2735. doi:44745 [pii];10.1172/JCI44745 [doi].
- Marth, C., H. Fiegl, A. G. Zeimet, E. Muller-Holzner, M. Deibl, W. Doppler, and G. Daxenbichler. 2004. Interferon-gamma expression is an independent prognostic factor in ovarian cancer. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 191:1598-1605. doi:S0002937804004764 [pii];10.1016/j.ajog.2004.05.007 [doi].
- Martin-Fontecha, A., L. L. Thomsen, S. Brett, C. Gerard, M. Lipp, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2004. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat.Immunol.* 5:1260-1265. doi:ni1138 [pii];10.1038/ni1138 [doi].
- Martin-Orozco, N., P. Muranski, Y. Chung, X. O. Yang, T. Yamazaki, S. Lu, P. Hwu, N. P. Restifo, W. W. Overwijk, and C. Dong. 2009. T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. *Immunity.* 31:787-798. doi:S1074-7613(09)00451-8 [pii];10.1016/j.immuni.2009.09.014 [doi].
- Martinez-Outschoorn, U. E., F. Sotgia, and M. P. Lisanti. 2012. Power surge: supporting cells "fuel" cancer cell mitochondria. *Cell Metab* 15:4-5. doi:S1550-4131(11)00470-0 [pii];10.1016/j.cmet.2011.12.011 [doi].
- Masson, F., M. Minnich, M. Olshansky, I. Bilic, A. M. Mount, A. Kallies, T. P. Speed, M. Busslinger, S. L. Nutt, and G. T. Belz. 2013. Id2-mediated inhibition of E2A represses memory CD8+ T cell differentiation. *J.Immunol.* 190:4585-4594. doi:jimmunol.1300099 [pii];10.4049/jimmunol.1300099 [doi].
- Matloubian, M., R. J. Concepcion, and R. Ahmed. 1994. CD4+ T cells are required to sustain CD8+ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection. *J.Virol.* 68:8056-8063.
- Matsumoto, K., K. Matsumoto, T. Nakamura, and R. H. Kramer. 1994. Hepatocyte growth factor/scatter factor induces tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase (p125FAK) and promotes migration and invasion by oral squamous cell carcinoma cells. *J.Biol.Chem.* 269:31807-31813.
- Matsuzaki, J., S. Gnjatic, P. Mhawech-Fauceglia, A. Beck, A. Miller, T. Tsuji, C. Eppolito, F. Qian, S. Lele, P. Shrikant, L. J. Old, and K. Odunsi. 2010. Tumor-infiltrating NY-ESO-1-specific CD8+ T cells are negatively regulated by LAG-3 and PD-1 in human ovarian cancer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 107:7875-7880. doi:1003345107 [pii];10.1073/pnas.1003345107 [doi].
- McCaffrey, T. A., D. J. Falcone, and B. Du. 1992. Transforming growth factor-beta 1 is a heparin-binding protein: identification of putative heparin-binding regions and isolation of heparins with varying affinity for TGF-beta 1. *J.Cell Physiol* 152:430-440. doi:10.1002/jcp.1041520226 [doi].
- McDonald, P. C., A. Oloumi, J. Mills, I. Dobрева, M. Maidan, V. Gray, E. D. Wederell, M. B. Bally, L. J. Foster, and S. Dedhar. 2008. Rictor and integrin-linked kinase interact and regulate Akt phosphorylation and cancer cell survival. *Cancer Res.* 68:1618-1624. doi:68/6/1618 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-07-5869 [doi].
- McGeachy, M. J., K. S. Bak-Jensen, Y. Chen, C. M. Tato, W. Blumenschein, T. McClanahan, and D. J. Cua. 2007. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat.Immunol.* 8:1390-1397. doi:ni1539 [pii];10.1038/ni1539 [doi].
- McGeachy, M. J., Y. Chen, C. M. Tato, A. Laurence, B. Joyce-Shaikh, W. M. Blumenschein, T. K. McClanahan, J. J. O'Shea, and D. J. Cua. 2009. The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nat.Immunol.* 10:314-324. doi:ni.1698 [pii];10.1038/ni.1698 [doi].
- McKee, C. M., M. B. Penno, M. Cowman, M. D. Burdick, R. M. Strieter, C. Bao, and P. W. Noble. 1996. Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44. *J.Clin.Invest* 98:2403-2413. doi:10.1172/JCI119054 [doi].
- McQuibban, G. A., G. S. Butler, J. H. Gong, L. Bendall, C. Power, I. Clark-Lewis, and C. M. Overall. 2001. Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1. *J.Biol.Chem.* 276:43503-43508. doi:10.1074/jbc.M107736200 [doi];M107736200 [pii].
- McQuibban, G. A., J. H. Gong, E. M. Tam, C. A. McCulloch, I. Clark-Lewis, and C. M. Overall. 2000. Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. *Science* 289:1202-1206. doi:8738 [pii].
- McQuibban, G. A., J. H. Gong, J. P. Wong, J. L. Wallace, I. Clark-Lewis, and C. M. Overall. 2002. Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo. *Blood* 100:1160-1167.
- Meinbach, D. S. and B. L. Lokeshwar. 2006. Insulin-like growth factors and their binding proteins in prostate cancer: cause or consequence? *Urol.Oncol.* 24:294-306. doi:S1078-1439(06)00014-7 [pii];10.1016/j.urolonc.2005.12.004 [doi].

- Mellor, A. L., B. Baban, P. R. Chandler, A. Manlapat, D. J. Kahler, and D. H. Munn. 2005. Cutting edge: CpG oligonucleotides induce splenic CD19<sup>+</sup> dendritic cells to acquire potent indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent T cell regulatory functions via IFN Type 1 signaling. *J.Immunol.* 175:5601-5605. doi:175/9/5601 [pii].
- Mendez-Ferrer, S., T. V. Michurina, F. Ferraro, A. R. Mazloom, B. D. Macarthur, S. A. Lira, D. T. Scadden, A. Ma'ayan, G. N. Enikolopov, and P. S. Frenette. 2010. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 466:829-834. doi:nature09262 [pii];10.1038/nature09262 [doi].
- Menon, S. and K. A. Beningo. 2011. Cancer cell invasion is enhanced by applied mechanical stimulation. *PLoS.One.* 6:e17277. doi:10.1371/journal.pone.0017277 [doi].
- Mercer, J. and A. Helenius. 2008. Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science* 320:531-535. doi:320/5875/531 [pii];10.1126/science.1155164 [doi].
- Mercer, J. and A. Helenius. 2010. Apoptotic mimicry: phosphatidylserine-mediated macropinocytosis of vaccinia virus. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1209:49-55. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05772.x [doi].
- Mercer, J., S. Knebel, F. I. Schmidt, J. Crouse, C. Burkard, and A. Helenius. 2010. Vaccinia virus strains use distinct forms of macropinocytosis for host-cell entry. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 107:9346-9351. doi:1004618107 [pii];10.1073/pnas.1004618107 [doi].
- Merkenschlager, M. and B. H. von. 2010. PI3 kinase signalling blocks Foxp3 expression by sequestering Foxo factors. *J.Exp.Med.* 207:1347-1350. doi:jem.20101156 [pii];10.1084/jem.20101156 [doi].
- Merlo, A., C. Tenca, F. Fais, L. Battini, E. Ciccone, C. E. Grossi, and D. Saverino. 2005. Inhibitory receptors CD85j, LAIR-1, and CD152 down-regulate immunoglobulin and cytokine production by human B lymphocytes. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* 12:705-712. doi:12/6/705 [pii];10.1128/CDLI.12.6.705-712.2005 [doi].
- Meyaard, L., G. J. Adema, C. Chang, E. Woollatt, G. R. Sutherland, L. L. Lanier, and J. H. Phillips. 1997. LAIR-1, a novel inhibitory receptor expressed on human mononuclear leukocytes. *Immunity.* 7:283-290. doi:S1074-7613(00)80530-0 [pii].
- Meyaard, L., J. Hurenkamp, H. Clevers, L. L. Lanier, and J. H. Phillips. 1999. Leukocyte-associated Ig-like receptor-1 functions as an inhibitory receptor on cytotoxic T cells. *J.Immunol.* 162:5800-5804.
- Micutkova, L., M. Hermann, M. Offterdinger, M. W. Hess, A. Matscheski, H. Pircher, C. Muck, H. L. Ebner, A. Laich, E. Ferrando-May, W. Zwerschke, L. A. Huber, and P. Jansen-Durr. 2012. Analysis of the cellular uptake and nuclear delivery of insulin-like growth factor binding protein-3 in human osteosarcoma cells. *Int.J.Cancer* 130:1544-1557. doi:10.1002/ijc.26149 [doi].
- Mikyskova, R., J. Bubenik, L. Mendoza, V. Vonka, M. Smahel, J. Simova, and T. Jandlova. 2000. Local cytokine treatment of HPV16-associated tumours results in inhibition of their lung metastases. *Clin.Exp.Metastasis* 18:581-587.
- Mimura, K., K. Kono, A. Takahashi, Y. Kawaguchi, and H. Fujii. 2007. Vascular endothelial growth factor inhibits the function of human mature dendritic cells mediated by VEGF receptor-2. *Cancer Immunol.Immunother.* 56:761-770. doi:10.1007/s00262-006-0234-7 [doi].
- Minuto, F., M. P. Del, A. Barreca, P. Fortini, G. Cariola, G. Catrambone, and G. Giordano. 1986. Evidence for an increased somatomedin-C/insulin-like growth factor I content in primary human lung tumors. *Cancer Res.* 46:985-988.
- Miracco, C., V. Mourmouras, M. Biagioli, P. Rubegni, S. Mannucci, I. Monciatti, E. Cosci, P. Tosi, and P. Luzi. 2007. Utility of tumour-infiltrating CD25+FOXP3+ regulatory T cell evaluation in predicting local recurrence in vertical growth phase cutaneous melanoma. *Oncol.Rep.* 18:1115-1122.
- Mirshahi, F., J. Pourtau, H. Li, M. Muraine, V. Trochon, E. Legrand, J. Vannier, J. Soria, M. Vasse, and C. Soria. 2000. SDF-1 activity on microvascular endothelial cells: consequences on angiogenesis in in vitro and in vivo models. *Thromb.Res.* 99:587-594. doi:S0049384800002929 [pii].
- Mitchem, J. B., D. J. Brennan, B. L. Knolhoff, B. A. Belt, Y. Zhu, D. E. Sanford, L. Belaygorod, D. Carpenter, L. Collins, D. Piwnica-Worms, S. Hewitt, G. M. Udupi, W. M. Gallagher, C. Wegner, B. L. West, A. Wang-Gillam, P. Goedegebuure, D. C. Linehan, and D. G. DeNardo. 2013. Targeting tumor-infiltrating macrophages decreases tumor-initiating cells, relieves immunosuppression, and improves chemotherapeutic responses. *Cancer Res.* 73:1128-1141. doi:0008-5472.CAN-12-2731 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-12-2731 [doi].
- Mitsui, Y., S. Mochizuki, T. Kodama, M. Shimoda, T. Ohtsuka, T. Shiomi, M. Chijiwa, T. Ikeda, M. Kitajima, and Y. Okada. 2006. ADAM28 is overexpressed in human breast carcinomas: implications for carcinoma cell proliferation through cleavage of insulin-like growth factor binding protein-3. *Cancer Res.* 66:9913-9920. doi:66/20/9913 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-06-0377 [doi].
- Mittal, S. K. and P. A. Roche. 2015. Suppression of antigen presentation by IL-10. *Curr.Opin.Immunol.* 34C:22-27. doi:S0952-7915(14)00157-5 [pii];10.1016/j.coi.2014.12.009 [doi].
- Miyamoto, S., H. Teramoto, J. S. Gutkind, and K. M. Yamada. 1996. Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. *J.Cell Biol.* 135:1633-1642.

- Miyamoto, S., K. Yano, S. Sugimoto, G. Ishii, T. Hasebe, Y. Endoh, K. Kodama, M. Goya, T. Chiba, and A. Ochiai. 2004. Matrix metalloproteinase-7 facilitates insulin-like growth factor bioavailability through its proteinase activity on insulin-like growth factor binding protein 3. *Cancer Res.* 64:665-671.
- Miyara, M., Y. Yoshioka, A. Kitoh, T. Shima, K. Wing, A. Niwa, C. Parizot, C. Taflin, T. Heike, D. Valeyre, A. Mathian, T. Nakahata, T. Yamaguchi, T. Nomura, M. Ono, Z. Amoura, G. Gorochov, and S. Sakaguchi. 2009. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4<sup>+</sup> T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity.* 30:899-911. doi:S1074-7613(09)00202-7 [pii];10.1016/j.immuni.2009.03.019 [doi].
- Miyazono, K., U. Hellman, C. Wernstedt, and C. H. Heldin. 1988. Latent high molecular weight complex of transforming growth factor beta 1. Purification from human platelets and structural characterization. *J.Biol.Chem.* 263:6407-6415.
- Mizukami, Y., K. Kono, Y. Kawaguchi, H. Akaike, K. Kamimura, H. Sugai, and H. Fujii. 2008. CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to accumulation of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in gastric cancer. *Int.J.Cancer* 122:2286-2293. doi:10.1002/ijc.23392 [doi].
- Mizuno, K., H. Inoue, M. Hagiya, S. Shimizu, T. Nose, Y. Shimohigashi, and T. Nakamura. 1994. Hairpin loop and second kringle domain are essential sites for heparin binding and biological activity of hepatocyte growth factor. *J.Biol.Chem.* 269:1131-1136.
- Mlecnik, B., M. Tosolini, A. Kirilovsky, A. Berger, G. Bindea, T. Meatchi, P. Bruneval, Z. Trajanoski, W. H. Fridman, F. Pages, and J. Galon. 2011. Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J.Clin.Oncol.* 29:610-618. doi:JCO.2010.30.5425 [pii];10.1200/JCO.2010.30.5425 [doi].
- Mochizuki, M., J. Bartels, A. I. Mallet, E. Christophers, and J. M. Schroder. 1998. IL-4 induces eotaxin: a possible mechanism of selective eosinophil recruitment in helminth infection and atopy. *J.Immunol.* 160:60-68.
- Mochizuki, M., J. Schroder, E. Christophers, and S. Yamamoto. 1999. IL-4 induces eotaxin in human dermal fibroblasts. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 120 Suppl 1:19-23. doi:53587 [pii];53587 [doi].
- Mochizuki, S., M. Shimoda, T. Shiomi, Y. Fujii, and Y. Okada. 2004. ADAM28 is activated by MMP-7 (matrilysin-1) and cleaves insulin-like growth factor binding protein-3. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 315:79-84. doi:10.1016/j.bbrc.2004.01.022 [doi];S0006291X0400052X [pii].
- Modur, V., Y. Li, G. A. Zimmerman, S. M. Prescott, and T. M. McIntyre. 1997. Retrograde inflammatory signaling from neutrophils to endothelial cells by soluble interleukin-6 receptor alpha. *J.Clin.Invest* 100:2752-2756. doi:10.1172/JCI119821 [doi].
- Mohan, S., G. R. Thompson, Y. G. Ameer, G. Hathaway, H. Tschesche, and D. J. Baylink. 2002. ADAM-9 is an insulin-like growth factor binding protein-5 protease produced and secreted by human osteoblasts. *Biochemistry* 41:15394-15403. doi:bi026458q [pii].
- Mongiati, M., S. M. Sweeney, J. D. San Antonio, J. Fu, and R. V. Iozzo. 2003. Endorepellin, a novel inhibitor of angiogenesis derived from the C terminus of perlecan. *J.Biol.Chem.* 278:4238-4249. doi:10.1074/jbc.M210445200 [doi];M210445200 [pii].
- Montgomery, R. B., E. Makary, K. Schiffman, V. Goodell, and M. L. Disis. 2005. Endogenous anti-HER2 antibodies block HER2 phosphorylation and signaling through extracellular signal-regulated kinase. *Cancer Res.* 65:650-656. doi:65/2/650 [pii].
- Morandi, F., I. Levreri, P. Bocca, B. Galleni, L. Raffaghello, S. Ferrone, I. Prigione, and V. Pistoia. 2007. Human neuroblastoma cells trigger an immunosuppressive program in monocytes by stimulating soluble HLA-G release. *Cancer Res.* 67:6433-6441. doi:67/13/6433 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-06-4588 [doi].
- Moren, A., A. Olofsson, G. Stenman, P. Sahlin, T. Kanzaki, L. Claesson-Welsh, D. P. ten, K. Miyazono, and C. H. Heldin. 1994. Identification and characterization of LTBP-2, a novel latent transforming growth factor-beta-binding protein. *J.Biol.Chem.* 269:32469-32478.
- Morgan, M. E., J. H. van Bilsen, A. M. Bakker, B. Heemskerk, M. W. Schilham, F. C. Hartgers, B. G. Elferink, L. van der Zanden, R. R. de Vries, T. W. Huizinga, T. H. Ottenhoff, and R. E. Toes. 2005. Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells in humans. *Hum.Immunol.* 66:13-20. doi:S0198-8859(04)00647-0 [pii];10.1016/j.humimm.2004.05.016 [doi].
- Moriggl, R., D. J. Topham, S. Teglund, V. Sexl, C. McKay, D. Wang, A. Hoffmeyer, D. J. van, M. Y. Sangster, K. D. Bunting, G. C. Grosveld, and J. N. Ihle. 1999. Stat5 is required for IL-2-induced cell cycle progression of peripheral T cells. *Immunity.* 10:249-259. doi:S1074-7613(00)80025-4 [pii].
- Morimoto-Tomita, M., K. Uchimura, A. Bistrup, D. H. Lum, M. Egeblad, N. Boudreau, Z. Werb, and S. D. Rosen. 2005. Sulf-2, a proangiogenic heparan sulfate endosulfatase, is upregulated in breast cancer. *Neoplasia.* 7:1001-1010.
- Morita, Y., H. Araki, T. Sugimoto, K. Takeuchi, T. Yamane, T. Maeda, Y. Yamamoto, K. Nishi, M. Asano, K. Shirahama-Noda, M. Nishimura, T. Uzu, I. Hara-Nishimura, D. Koya, A. Kashiwagi, and I. Ohkubo. 2007. Legumain/asparaginyl endopeptidase controls extracellular matrix remodeling through the degradation of fibronectin in mouse renal proximal tubular cells. *FEBS Lett.* 581:1417-1424. doi:S0014-5793(07)00230-X [pii];10.1016/j.febslet.2007.02.064 [doi].

- Moro, L., L. Dolce, S. Cabodi, E. Bergatto, E. E. Boeri, M. Smeriglio, E. Turco, S. F. Retta, M. G. Giuffrida, M. Venturino, J. Godovac-Zimmermann, A. Conti, E. Schaefer, L. Beguinot, C. Tacchetti, P. Gaggini, L. Silengo, G. Tarone, and P. Defilippi. 2002. Integrin-induced epidermal growth factor (EGF) receptor activation requires c-Src and p130Cas and leads to phosphorylation of specific EGF receptor tyrosines. *J.Biol.Chem.* 277:9405-9414. doi:10.1074/jbc.M109101200 [doi];M109101200 [pii].
- Moro, L., M. Venturino, C. Bozzo, L. Silengo, F. Altruda, L. Beguinot, G. Tarone, and P. Defilippi. 1998. Integrins induce activation of EGF receptor: role in MAP kinase induction and adhesion-dependent cell survival. *EMBO J.* 17:6622-6632. doi:10.1093/emboj/17.22.6622 [doi].
- Mortier, E., J. Bernard, A. Plet, and Y. Jacques. 2004. Natural, proteolytic release of a soluble form of human IL-15 receptor alpha-chain that behaves as a specific, high affinity IL-15 antagonist. *J.Immunol.* 173:1681-1688. doi:173/3/1681 [pii].
- Moss, M. L., S. L. Jin, M. E. Milla, D. M. Bickett, W. Burkhart, H. L. Carter, W. J. Chen, W. C. Clay, J. R. Didsbury, D. Hassler, C. R. Hoffman, T. A. Kost, M. H. Lambert, M. A. Leesnitzer, P. McCauley, G. McGeehan, J. Mitchell, M. Moyer, G. Pahl, W. Rocque, L. K. Overton, F. Schoenen, T. Seaton, J. L. Su, J. D. Becherer, and . 1997. Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature* 385:733-736. doi:10.1038/385733a0 [doi].
- Mougiakakos, D., C. C. Johansson, E. Trocme, C. All-Ericsson, M. A. Economou, O. Larsson, S. Seregard, and R. Kiessling. 2010. Intratumoral forkhead box P3-positive regulatory T cells predict poor survival in cyclooxygenase-2-positive uveal melanoma. *Cancer* 116:2224-2233. doi:10.1002/cncr.24999 [doi].
- Mu, D., S. Cambier, L. Fjellbirkeland, J. L. Baron, J. S. Munger, H. Kawakatsu, D. Sheppard, V. C. Broaddus, and S. L. Nishimura. 2002. The integrin alpha(v)beta8 mediates epithelial homeostasis through MT1-MMP-dependent activation of TGF-beta1. *J.Cell Biol.* 157:493-507. doi:10.1083/jcb.200109100 [doi];jcb.200109100 [pii].
- Mucida, D., N. Kutchukhidze, A. Erazo, M. Russo, J. J. Lafaille, and M. A. Curotto de Lafaille. 2005. Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. *J.Clin.Invest* 115:1923-1933. doi:10.1172/JCI24487 [doi].
- Muerkoster, S., K. Wegehenkel, A. Arlt, M. Witt, B. Sipos, M. L. Kruse, T. Sebens, G. Kloppel, H. Kalthoff, U. R. Folsch, and H. Schafer. 2004. Tumor stroma interactions induce chemoresistance in pancreatic ductal carcinoma cells involving increased secretion and paracrine effects of nitric oxide and interleukin-1beta. *Cancer Res.* 64:1331-1337.
- Muguruma, M., S. Matsumura, and T. Fukazawa. 1990. Direct interactions between talin and actin. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 171:1217-1223. doi:0006-291X(90)90815-5 [pii].
- Munn, D. H., M. D. Sharma, B. Baban, H. P. Harding, Y. Zhang, D. Ron, and A. L. Mellor. 2005. GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunity.* 22:633-642. doi:S1074-7613(05)00108-1 [pii];10.1016/j.immuni.2005.03.013 [doi].
- Munn, D. H., M. D. Sharma, and A. L. Mellor. 2004. Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4+ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells. *J.Immunol.* 172:4100-4110.
- Muranski, P., A. Boni, P. A. Antony, L. Cassard, K. R. Irvine, A. Kaiser, C. M. Paulos, D. C. Palmer, C. E. Touloukian, K. Ptak, L. Gattinoni, C. Wrzesinski, C. S. Hinrichs, K. W. Kerstann, L. Feigenbaum, C. C. Chan, and N. P. Restifo. 2008. Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood* 112:362-373. doi:10.1182/blood-2007-11-120998 [pii];10.1182/blood-2007-11-120998 [doi].
- Muranski, P., Z. A. Borman, S. P. Kerkar, C. A. Klebanoff, Y. Ji, L. Sanchez-Perez, M. Sukumar, R. N. Reger, Z. Yu, S. J. Kern, R. Roychoudhuri, G. A. Ferreyra, W. Shen, S. K. Durum, L. Feigenbaum, D. C. Palmer, P. A. Antony, C. C. Chan, A. Laurence, R. L. Danner, L. Gattinoni, and N. P. Restifo. 2011. Th17 cells are long lived and retain a stem cell-like molecular signature. *Immunity.* 35:972-985. doi:S1074-7613(11)00504-8 [pii];10.1016/j.immuni.2011.09.019 [doi].
- Murray, P. J. and T. A. Wynn. 2011. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat.Rev.Immunol.* 11:723-737. doi:nri3073 [pii];10.1038/nri3073 [doi].
- Murthy, R. V., G. Arberman, J. Gao, G. D. Roodman, and X. F. Sun. 2005. Legumain expression in relation to clinicopathologic and biological variables in colorectal cancer. *Clin.Cancer Res.* 11:2293-2299. doi:11/6/2293 [pii];10.1158/1078-0432.CCR-04-1642 [doi].
- Mydel, P., J. M. Shipley, T. L. Adair-Kirk, D. G. Kelley, T. J. Broekelmann, R. P. Mecham, and R. M. Senior. 2008. Neutrophil elastase cleaves laminin-332 (laminin-5) generating peptides that are chemotactic for neutrophils. *J.Biol.Chem.* 283:9513-9522. doi:M706239200 [pii];10.1074/jbc.M706239200 [doi].
- Nagase, H., R. Visse, and G. Murphy. 2006. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc.Res.* 69:562-573. doi:S0008-6363(05)00565-1 [pii];10.1016/j.cardiores.2005.12.002 [doi].
- Najjam, S., B. Mulloy, J. Theze, M. Gordon, R. Gibbs, and C. C. Rider. 1998. Further characterization of the binding of human recombinant interleukin 2 to heparin and identification of putative binding sites. *Glycobiology* 8:509-516.
- Nakamizo, A., F. Marini, T. Amano, A. Khan, M. Studeny, J. Gumin, J. Chen, S. Hentschel, G. Vecil, J. Dembinski, M. Andreeff, and F. F. Lang. 2005. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res.* 65:3307-3318. doi:65/8/3307 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-04-1874 [doi].

- Nakamura, K., A. Hongo, J. Kodama, Y. Miyagi, M. Yoshinouchi, and T. Kudo. 2000. Down-regulation of the insulin-like growth factor I receptor by antisense RNA can reverse the transformed phenotype of human cervical cancer cell lines. *Cancer Res.* 60:760-765.
- Nakamura, K., S. Yokohama, M. Yoneda, S. Okamoto, Y. Tamaki, T. Ito, M. Okada, K. Aso, and I. Makino. 2004. High, but not low, molecular weight hyaluronan prevents T-cell-mediated liver injury by reducing proinflammatory cytokines in mice. *J.Gastroenterol.* 39:346-354. doi:10.1007/s00535-003-1301-x [doi].
- Nakamura, M., S. Miyamoto, H. Maeda, G. Ishii, T. Hasebe, T. Chiba, M. Asaka, and A. Ochiai. 2005. Matrix metalloproteinase-7 degrades all insulin-like growth factor binding proteins and facilitates insulin-like growth factor bioavailability. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 333:1011-1016. doi:S0006-291X(05)01211-8 [pii];10.1016/j.bbrc.2005.06.010 [doi].
- Nakanishi, Y., B. Lu, C. Gerard, and A. Iwasaki. 2009. CD8(+) T lymphocyte mobilization to virus-infected tissue requires CD4(+) T-cell help. *Nature* 462:510-513. doi:nature08511 [pii];10.1038/nature08511 [doi].
- Nakano, O., M. Sato, Y. Naito, K. Suzuki, S. Orikasa, M. Aizawa, Y. Suzuki, I. Shintaku, H. Nagura, and H. Ohtani. 2001. Proliferative activity of intratumoral CD8(+) T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity. *Cancer Res.* 61:5132-5136.
- Nandi, D., H. Jiang, and J. J. Monaco. 1996. Identification of MECL-1 (LMP-10) as the third IFN-gamma-inducible proteasome subunit. *J.Immunol.* 156:2361-2364.
- Nascimento, C. F., A. S. de Siqueira, J. J. Pinheiro, V. M. Freitas, and R. G. Jaeger. 2011. Laminin-111 derived peptides AG73 and C16 regulate invadopodia activity of a human adenoid cystic carcinoma cell line. *Exp.Cell Res.* 317:2562-2572. doi:S0014-4827(11)00345-4 [pii];10.1016/j.yexcr.2011.08.022 [doi].
- Navarro, S., J. Aleu, M. Jimenez, E. Boix, C. M. Cuchillo, and M. V. Nogues. 2008. The cytotoxicity of eosinophil cationic protein/ribonuclease 3 on eukaryotic cell lines takes place through its aggregation on the cell membrane. *Cell Mol.Life Sci.* 65:324-337. doi:10.1007/s00018-007-7499-7 [doi].
- Nayal, A., D. J. Webb, C. M. Brown, E. M. Schaefer, M. Vicente-Manzanares, and A. R. Horwitz. 2006. Paxillin phosphorylation at Ser273 localizes a GIT1-PIX-PAK complex and regulates adhesion and protrusion dynamics. *J.Cell Biol.* 173:587-589. doi:jcb.200509075 [pii];10.1083/jcb.200509075 [doi].
- Nayar, R., M. Enos, A. Prince, H. Shin, S. Hemmers, J. K. Jiang, U. Klein, C. J. Thomas, and L. J. Berg. 2012. TCR signaling via Tec kinase ITK and interferon regulatory factor 4 (IRF4) regulates CD8+ T-cell differentiation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 109:E2794-E2802. doi:1205742109 [pii];10.1073/pnas.1205742109 [doi].
- Nazareth, M. R., L. Broderick, M. R. Simpson-Abelson, R. J. Kelleher, Jr., S. J. Yokota, and R. B. Bankert. 2007. Characterization of human lung tumor-associated fibroblasts and their ability to modulate the activation of tumor-associated T cells. *J.Immunol.* 178:5552-5562. doi:178/9/5552 [pii].
- Nemeckova, S., V. Sroller, P. Hainz, J. Krystofova, M. Smahel, and L. Kutinova. 2003. Experimental therapy of HPV16 induced tumors with IL12 expressed by recombinant vaccinia virus in mice. *Int.J.Mol.Med.* 12:789-796.
- Nemeckova, S., R. Stranska, J. Subrtova, L. Kutinova, P. Otahal, P. Hainz, L. Maresova, V. Sroller, E. Hamsikova, and V. Vonka. 2002. Immune response to E7 protein of human papillomavirus type 16 anchored on the cell surface. *Cancer Immunol.Immunother.* 51:111-119. doi:10.1007/s00262-001-0261-3 [doi].
- Nemeth, K., A. Leelahavanichkul, P. S. Yuen, B. Mayer, A. Parmelee, K. Doi, P. G. Robey, K. Leelahavanichkul, B. H. Koller, J. M. Brown, X. Hu, I. Jelinek, R. A. Star, and E. Mezey. 2009. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat.Med.* 15:42-49. doi:nm.1905 [pii];10.1038/nm.1905 [doi].
- Nielsen, B. S., M. Sehested, S. Duun, F. Rank, S. Timshel, J. Rygaard, M. Johnsen, and K. Dano. 2001. Urokinase plasminogen activator is localized in stromal cells in ductal breast cancer. *Lab Invest* 81:1485-1501.
- Nielsen, B. S., M. Sehested, S. Timshel, C. Pyke, and K. Dano. 1996. Messenger RNA for urokinase plasminogen activator is expressed in myofibroblasts adjacent to cancer cells in human breast cancer. *Lab Invest* 74:168-177.
- Nieman, K. M., H. A. Kenny, C. V. Penicka, A. Ladanyi, R. Buell-Gutbrod, M. R. Zillhardt, I. L. Romero, M. S. Carey, G. B. Mills, G. S. Hotamisligil, S. D. Yamada, M. E. Peter, K. Gwin, and E. Lengyel. 2011. Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nat.Med.* 17:1498-1503. doi:nm.2492 [pii];10.1038/nm.2492 [doi].
- Nightingale, J., S. Patel, N. Suzuki, R. Buxton, K. I. Takagi, J. Suzuki, Y. Sumi, A. Imaizumi, R. M. Mason, and Z. Zhang. 2004. Oncostatin M, a cytokine released by activated mononuclear cells, induces epithelial cell-myofibroblast transdifferentiation via Jak/Stat pathway activation. *J.Am.Soc.Nephrol.* 15:21-32.
- Nishikawa, H., T. Kato, I. Tawara, K. Saito, H. Ikeda, K. Kuribayashi, P. M. Allen, R. D. Schreiber, S. Sakaguchi, L. J. Old, and H. Shiku. 2005. Definition of target antigens for naturally occurring CD4(+) CD25(+) regulatory T cells. *J.Exp.Med.* 201:681-686. doi:jem.20041959 [pii];10.1084/jem.20041959 [doi].
- Nishikawa, H. and S. Sakaguchi. 2014. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Curr.Opin.Immunol.* 27:1-7. doi:S0952-7915(13)00223-9 [pii];10.1016/j.coi.2013.12.005 [doi].

- Noble, P. W., F. R. Lake, P. M. Henson, and D. W. Riches. 1993. Hyaluronate activation of CD44 induces insulin-like growth factor-1 expression by a tumor necrosis factor-alpha-dependent mechanism in murine macrophages. *J.Clin.Invest* 91:2368-2377. doi:10.1172/JCI116469 [doi].
- Noman, M. Z., G. Desantis, B. Janji, M. Hasmmim, S. Karray, P. Dessen, V. Bronte, and S. Chouaib. 2014. PD-L1 is a novel direct target of HIF-1alpha, and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation. *J.Exp.Med.* 211:781-790. doi:jem.20131916 [pii];10.1084/jem.20131916 [doi].
- Noskova, V., S. Ahmadi, E. Asander, and B. Casslen. 2009. Ovarian cancer cells stimulate uPA gene expression in fibroblastic stromal cells via multiple paracrine and autocrine mechanisms. *Gynecol.Oncol.* 115:121-126. doi:S0090-8258(09)00467-3 [pii];10.1016/j.ygyno.2009.06.026 [doi].
- Novitskiy, S. V., S. Ryzhov, R. Zaynagetdinov, A. E. Goldstein, Y. Huang, O. Y. Tikhomirov, M. R. Blackburn, I. Biaggioni, D. P. Carbone, I. Feoktistov, and M. M. Dikov. 2008. Adenosine receptors in regulation of dendritic cell differentiation and function. *Blood* 112:1822-1831. doi:blood-2008-02-136325 [pii];10.1182/blood-2008-02-136325 [doi].
- Numasaki, M., J. Fukushi, M. Ono, S. K. Narula, P. J. Zavodny, T. Kudo, P. D. Robbins, H. Tahara, and M. T. Lotze. 2003. Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood* 101:2620-2627. doi:10.1182/blood-2002-05-1461 [doi];2002-05-1461 [pii].
- Nurieva, R., X. O. Yang, G. Martinez, Y. Zhang, A. D. Panopoulos, L. Ma, K. Schluns, Q. Tian, S. S. Watowich, A. M. Jetten, and C. Dong. 2007. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* 448:480-483. doi:nature05969 [pii];10.1038/nature05969 [doi].
- Nurieva, R. I., S. Zheng, W. Jin, Y. Chung, Y. Zhang, G. J. Martinez, J. M. Reynolds, S. L. Wang, X. Lin, S. C. Sun, G. Lozano, and C. Dong. 2010. The E3 ubiquitin ligase GRAIL regulates T cell tolerance and regulatory T cell function by mediating T cell receptor-CD3 degradation. *Immunity.* 32:670-680. doi:S1074-7613(10)00168-8 [pii];10.1016/j.immuni.2010.05.002 [doi].
- Nylander-Lundqvist, E., O. Back, and T. Egelrud. 1996. IL-1 beta activation in human epidermis. *J.Immunol.* 157:1699-1704.
- O'Connor, W., Jr., M. Kamanaka, C. J. Booth, T. Town, S. Nakae, Y. Iwakura, J. K. Kolls, and R. A. Flavell. 2009. A protective function for interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation. *Nat.Immunol.* 10:603-609. doi:ni.1736 [pii];10.1038/ni.1736 [doi].
- O'Keefe, G. M., V. T. Nguyen, and E. N. Benveniste. 1999. Class II transactivator and class II MHC gene expression in microglia: modulation by the cytokines TGF-beta, IL-4, IL-13 and IL-10. *Eur.J.Immunol.* 29:1275-1285. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199904)29:04<1275::AID-IMMU1275>3.0.CO;2-T [pii];10.1002/(SICI)1521-4141(199904)29:04<#60;1275::AID-IMMU1275>#62;3.0.CO;2-T [doi].
- O'Reilly, A. M., H. H. Lee, and M. A. Simon. 2008. Integrins control the positioning and proliferation of follicle stem cells in the Drosophila ovary. *J.Cell Biol.* 182:801-815. doi:jcb.200710141 [pii];10.1083/jcb.200710141 [doi].
- O'Reilly, M. S., T. Boehm, Y. Shing, N. Fukai, G. Vasios, W. S. Lane, E. Flynn, J. R. Birkhead, B. R. Olsen, and J. Folkman. 1997. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88:277-285. doi:S0092-8674(00)81848-6 [pii].
- O'Reilly, M. S., L. Holmgren, Y. Shing, C. Chen, R. A. Rosenthal, M. Moses, W. S. Lane, Y. Cao, E. H. Sage, and J. Folkman. 1994. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 79:315-328. doi:0092-8674(94)90200-3 [pii].
- Obermajer, N., F. C. Popp, Y. Soeder, J. Haarer, E. K. Geissler, H. J. Schlitt, and M. H. Dahlke. 2014. Conversion of Th17 into IL-17Aneg Regulatory T Cells: A Novel Mechanism in Prolonged Allograft Survival Promoted by Mesenchymal Stem Cell-Supported Minimized Immunosuppressive Therapy. *J.Immunol.* 193:4988-4999. doi:jimmunol.1401776 [pii];10.4049/jimmunol.1401776 [doi].
- Odegaard, J. I., R. R. Ricardo-Gonzalez, E. A. Red, D. Vats, C. R. Morel, M. H. Goforth, V. Subramanian, L. Mukundan, A. W. Ferrante, and A. Chawla. 2008. Alternative M2 activation of Kupffer cells by PPARdelta ameliorates obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab* 7:496-507. doi:S1550-4131(08)00113-7 [pii];10.1016/j.cmet.2008.04.003 [doi].
- Oderup, C., L. Cederbom, A. Makowska, C. M. Cilio, and F. Ivars. 2006. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology* 118:240-249. doi:IMM2362 [pii];10.1111/j.1365-2567.2006.02362.x [doi].
- Oestreich, K. J., A. C. Huang, and A. S. Weinmann. 2011. The lineage-defining factors T-bet and Bcl-6 collaborate to regulate Th1 gene expression patterns. *J.Exp.Med.* 208:1001-1013. doi:jem.20102144 [pii];10.1084/jem.20102144 [doi].
- Oestreich, K. J., S. E. Mohn, and A. S. Weinmann. 2012. Molecular mechanisms that control the expression and activity of Bcl-6 in TH1 cells to regulate flexibility with a TFH-like gene profile. *Nat.Immunol.* 13:405-411. doi:ni.2242 [pii];10.1038/ni.2242 [doi].

- Ogishima, T., H. Shiina, J. E. Breault, L. Tabatabai, W. W. Bassett, H. Enokida, L. C. Li, T. Kawakami, S. Urakami, L. A. Ribeiro-Filho, M. Terashima, M. Fujime, M. Igawa, and R. Dahiya. 2005. Increased heparanase expression is caused by promoter hypomethylation and up-regulation of transcriptional factor early growth response-1 in human prostate cancer. *Clin.Cancer Res.* 11:1028-1036. doi:11/3/1028 [pii].
- Ogishima, T., H. Shiina, J. E. Breault, M. Terashima, S. Honda, H. Enokida, S. Urakami, T. Tokizane, T. Kawakami, L. A. Ribeiro-Filho, M. Fujime, C. J. Kane, P. R. Carroll, M. Igawa, and R. Dahiya. 2005. Promoter CpG hypomethylation and transcription factor EGR1 hyperactivate heparanase expression in bladder cancer. *Oncogene* 24:6765-6772. doi:1208811 [pii];10.1038/sj.onc.1208811 [doi].
- Oh, S., L. P. Perera, M. Terabe, L. Ni, T. A. Waldmann, and J. A. Berzofsky. 2008. IL-15 as a mediator of CD4+ help for CD8+ T cell longevity and avoidance of TRAIL-mediated apoptosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 105:5201-5206. doi:0801003105 [pii];10.1073/pnas.0801003105 [doi].
- Ohkura, N., M. Hamaguchi, H. Morikawa, K. Sugimura, A. Tanaka, Y. Ito, M. Osaki, Y. Tanaka, R. Yamashita, N. Nakano, J. Huehn, H. J. Fehling, T. Sparwasser, K. Nakai, and S. Sakaguchi. 2012. T cell receptor stimulation-induced epigenetic changes and Foxp3 expression are independent and complementary events required for Treg cell development. *Immunity.* 37:785-799. doi:S1074-7613(12)00457-8 [pii];10.1016/j.immuni.2012.09.010 [doi].
- Ohno, Y., J. Nakashima, M. Izumi, M. Ohori, T. Hashimoto, and M. Tachibana. 2013. Association of legumain expression pattern with prostate cancer invasiveness and aggressiveness. *World J.Urol.* 31:359-364. doi:10.1007/s00345-012-0977-z [doi].
- Ohtani, H., Y. Naito, K. Saito, and H. Nagura. 1997. Expression of costimulatory molecules B7-1 and B7-2 by macrophages along invasive margin of colon cancer: a possible antitumor immunity? *Lab Invest* 77:231-241.
- Oldfield, M. D., L. A. Bach, J. M. Forbes, D. Nikolic-Paterson, A. McRobert, V. Thallas, R. C. Atkins, T. Osicka, G. Jerums, and M. E. Cooper. 2001. Advanced glycation end products cause epithelial-myofibroblast transdifferentiation via the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *J.Clin.Invest* 108:1853-1863. doi:10.1172/JCI11951 [doi].
- Oleinika, K., R. J. Nibbs, G. J. Graham, and A. R. Fraser. 2013. Suppression, subversion and escape: the role of regulatory T cells in cancer progression. *Clin.Exp.Immunol.* 171:36-45. doi:10.1111/j.1365-2249.2012.04657.x [doi].
- Ono, M., H. Yaguchi, N. Ohkura, I. Kitabayashi, Y. Nagamura, T. Nomura, Y. Miyachi, T. Tsukada, and S. Sakaguchi. 2007. Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1. *Nature* 446:685-689. doi:nature05673 [pii];10.1038/nature05673 [doi].
- Orimo, A., P. B. Gupta, D. C. Sgroi, F. Arenzana-Seisdedos, T. Delaunay, R. Naeem, V. J. Carey, A. L. Richardson, and R. A. Weinberg. 2005. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 121:335-348. doi:S0092-8674(05)00237-0 [pii];10.1016/j.cell.2005.02.034 [doi].
- Orsulic, S., O. Huber, H. Aberle, S. Arnold, and R. Kemler. 1999. E-cadherin binding prevents beta-catenin nuclear localization and beta-catenin/LEF-1-mediated transactivation. *J.Cell Sci.* 112 ( Pt 8):1237-1245.
- Osman, Y., M. Takahashi, Z. Zheng, K. Toba, A. Liu, T. Furukawa, M. Narita, Y. Aizawa, T. Koike, and A. Shibata. 1999. Dendritic cells stimulate the expansion of PML-RAR alpha specific cytotoxic T-lymphocytes: its applicability for antileukemia immunotherapy. *J.Exp.Clin.Cancer Res.* 18:485-492.
- Oswald, J., S. Boxberger, B. Jorgensen, S. Feldmann, G. Ehninger, M. Bornhauser, and C. Werner. 2004. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells* 22:377-384. doi:10.1634/stemcells.22-3-377 [doi].
- Ota, I., X. Y. Li, Y. Hu, and S. J. Weiss. 2009. Induction of a MT1-MMP and MT2-MMP-dependent basement membrane transmigration program in cancer cells by Snail1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 106:20318-20323. doi:0910962106 [pii];10.1073/pnas.0910962106 [doi].
- Ouyang, W., O. Beckett, Q. Ma, and M. O. Li. 2010. Transforming growth factor-beta signaling curbs thymic negative selection promoting regulatory T cell development. *Immunity.* 32:642-653. doi:S1074-7613(10)00161-5 [pii];10.1016/j.immuni.2010.04.012 [doi].
- Ouyang, W., S. H. Ranganath, K. Weindel, D. Bhattacharya, T. L. Murphy, W. C. Sha, and K. M. Murphy. 1998. Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism. *Immunity.* 9:745-755. doi:S1074-7613(00)80671-8 [pii].
- Owens, P., H. Polikowsky, M. W. Pickup, A. E. Gorska, B. Jovanovic, A. K. Shaw, S. V. Novitskiy, C. C. Hong, and H. L. Moses. 2013. Bone Morphogenetic Proteins stimulate mammary fibroblasts to promote mammary carcinoma cell invasion. *PLoS.One.* 8:e67533. doi:10.1371/journal.pone.0067533 [doi];PONE-D-13-03284 [pii].
- Oyama, T., S. Ran, T. Ishida, S. Nadaf, L. Kerr, D. P. Carbone, and D. I. Gabrilovich. 1998. Vascular endothelial growth factor affects dendritic cell maturation through the inhibition of nuclear factor-kappa B activation in hemopoietic progenitor cells. *J.Immunol.* 160:1224-1232.
- Pages, F., A. Kirilovsky, B. Mlecnik, M. Asslaber, M. Tosolini, G. Bindea, C. Lagorce, P. Wind, F. Marliot, P. Bruneval, K. Zatloukal, Z. Trajanoski, A. Berger, W. H. Fridman, and J. Galon. 2009. In situ cytotoxic and memory

- T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J.Clin.Oncol.* 27:5944-5951. doi:JCO.2008.19.6147 [pii];10.1200/JCO.2008.19.6147 [doi].
- Paley, M. A., S. M. Gordon, E. K. Bikoff, E. J. Robertson, E. J. Wherry, and S. L. Reiner. 2013. Technical Advance: Fluorescent reporter reveals insights into eomesodermin biology in cytotoxic lymphocytes. *J.Leukoc.Biol.* 93:307-315. doi:jlb.0812400 [pii];10.1189/jlb.0812400 [doi].
- Paley, M. A., D. C. Kroy, P. M. Odorizzi, J. B. Johnnidis, D. V. Dolfi, B. E. Barnett, E. K. Bikoff, E. J. Robertson, G. M. Lauer, S. L. Reiner, and E. J. Wherry. 2012. Progenitor and terminal subsets of CD8+ T cells cooperate to contain chronic viral infection. *Science* 338:1220-1225. doi:338/6111/1220 [pii];10.1126/science.1229620 [doi].
- Pan, F., H. Yu, E. V. Dang, J. Barbi, X. Pan, J. F. Grosso, D. Jinasena, S. M. Sharma, E. M. McCadden, D. Getnet, C. G. Drake, J. O. Liu, M. C. Ostrowski, and D. M. Pardoll. 2009. Eos mediates Foxp3-dependent gene silencing in CD4+ regulatory T cells. *Science* 325:1142-1146. doi:1176077 [pii];10.1126/science.1176077 [doi].
- Pandiyani, P., L. Zheng, S. Ishihara, J. Reed, and M. J. Lenardo. 2007. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat.Immunol.* 8:1353-1362. doi:ni1536 [pii];10.1038/ni1536 [doi].
- Papagrigoriou, E., A. R. Gingras, I. L. Barsukov, N. Bate, I. J. Fillingham, B. Patel, R. Frank, W. H. Ziegler, G. C. Roberts, D. R. Critchley, and J. Emsley. 2004. Activation of a vinculin-binding site in the talin rod involves rearrangement of a five-helix bundle. *EMBO J.* 23:2942-2951. doi:10.1038/sj.emboj.7600285 [doi];7600285 [pii].
- Pardali, K. and A. Moustakas. 2007. Actions of TGF-beta as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. *Biochim.Biophys.Acta* 1775:21-62. doi:S0304-419X(06)00035-7 [pii];10.1016/j.bbcan.2006.06.004 [doi].
- Park, I. K., L. D. Shultz, J. J. Letterio, and J. D. Gorham. 2005. TGF-beta1 inhibits T-bet induction by IFN-gamma in murine CD4+ T cells through the protein tyrosine phosphatase Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1. *J.Immunol.* 175:5666-5674. doi:175/9/5666 [pii].
- Park, J., H. Li, M. Zhang, Y. Lu, B. Hong, Y. Zheng, J. He, J. Yang, J. Qian, and Q. Yi. 2014. Murine Th9 cells promote the survival of myeloid dendritic cells in cancer immunotherapy. *Cancer Immunol.Immunother.* 63:835-845. doi:10.1007/s00262-014-1557-4 [doi].
- Park, J. E., G. A. Keller, and N. Ferrara. 1993. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol.Biol.Cell* 4:1317-1326.
- Park, J. E., M. C. Lenter, R. N. Zimmermann, P. Garin-Chesa, L. J. Old, and W. J. Rettig. 1999. Fibroblast activation protein, a dual specificity serine protease expressed in reactive human tumor stromal fibroblasts. *J.Biol.Chem.* 274:36505-36512.
- Park, S. J., T. Nakagawa, H. Kitamura, T. Atsumi, H. Kamon, S. Sawa, D. Kamimura, N. Ueda, Y. Iwakura, K. Ishihara, M. Murakami, and T. Hirano. 2004. IL-6 regulates in vivo dendritic cell differentiation through STAT3 activation. *J.Immunol.* 173:3844-3854. doi:173/6/3844 [pii].
- Parsi, M. K., J. R. Adams, J. Whitelock, and M. A. Gibson. 2010. LTBP-2 has multiple heparin/heparan sulfate binding sites. *Matrix Biol.* 29:393-401. doi:S0945-053X(10)00053-3 [pii];10.1016/j.matbio.2010.03.005 [doi].
- Patel, S. A., J. R. Meyer, S. J. Greco, K. E. Corcoran, M. Bryan, and P. Rameshwar. 2010. Mesenchymal stem cells protect breast cancer cells through regulatory T cells: role of mesenchymal stem cell-derived TGF-beta. *J.Immunol.* 184:5885-5894. doi:jimmunol.0903143 [pii];10.4049/jimmunol.0903143 [doi].
- Paulson, K. G., J. G. Iyer, A. R. Tegeder, R. Thibodeau, J. Schelter, S. Koba, D. Schrama, W. T. Simonson, B. D. Lemos, D. R. Byrd, D. M. Koelle, D. A. Galloway, J. H. Leonard, M. M. Madeleine, Z. B. Argenyi, M. L. Disis, J. C. Becker, M. A. Cleary, and P. Nghiem. 2011. Transcriptome-wide studies of merkel cell carcinoma and validation of intratumoral CD8+ lymphocyte invasion as an independent predictor of survival. *J.Clin.Oncol.* 29:1539-1546. doi:JCO.2010.30.6308 [pii];10.1200/JCO.2010.30.6308 [doi].
- Paulsson, J., T. Sjoblom, P. Micke, F. Ponten, G. Landberg, C. H. Heldin, J. Bergh, D. J. Brennan, K. Jirstrom, and A. Ostman. 2009. Prognostic significance of stromal platelet-derived growth factor beta-receptor expression in human breast cancer. *Am.J.Pathol.* 175:334-341. doi:S0002-9440(10)60548-2 [pii];10.2353/ajpath.2009.081030 [doi].
- Pedoeem, A., I. Azoulay-Alfaguter, M. Strazza, G. J. Silverman, and A. Mor. 2014. Programmed death-1 pathway in cancer and autoimmunity. *Clin.Immunol.* 153:145-152. doi:S1521-6616(14)00117-X [pii];10.1016/j.clim.2014.04.010 [doi].
- Pereira, M. C., D. T. Oliveira, and L. P. Kowalski. 2011. The role of eosinophils and eosinophil cationic protein in oral cancer: a review. *Arch.Oral Biol.* 56:353-358. doi:S0003-9969(10)00315-8 [pii];10.1016/j.archoralbio.2010.10.015 [doi].
- Perkus, M. E., D. Panicali, S. Mercer, and E. Paoletti. 1986. Insertion and deletion mutants of vaccinia virus. *Virology* 152:285-297.
- Perrella, A., A. D'Antonio, C. Sbreghia, P. Sorrentino, P. Conca, L. Atripaldi, P. Conti, and O. Perrella. 2014. CD4+/CD25+ T cells suppress autologous CD4+/. *Pathog.Dis.* 72:124-130. doi:10.1111/2049-632X.12190 [doi].

- Peters, A. and N. Yosef. 2014. Understanding Th17 cells through systematic genomic analyses. *Curr.Opin.Immunol.* 28:42-48. doi:S0952-7915(14)00025-9 [pii];10.1016/j.coi.2014.01.017 [doi].
- Petersen, O. W., H. L. Nielsen, T. Gudjonsson, R. Villadsen, F. Rank, E. Niebuhr, M. J. Bissell, and L. Ronnov-Jessen. 2003. Epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer can provide a nonmalignant stroma. *Am.J.Pathol.* 162:391-402. doi:S0002-9440(10)63834-5 [pii];10.1016/S0002-9440(10)63834-5 [doi].
- Petitclerc, E., A. Boutaud, A. Prestayko, J. Xu, Y. Sado, Y. Ninomiya, M. P. Sarras, Jr., B. G. Hudson, and P. C. Brooks. 2000. New functions for non-collagenous domains of human collagen type IV. Novel integrin ligands inhibiting angiogenesis and tumor growth in vivo. *J.Biol.Chem.* 275:8051-8061.
- Phillips, R. J., M. D. Burdick, M. Lutz, J. A. Belperio, M. P. Keane, and R. M. Strieter. 2003. The stromal derived factor-1/CXCL12-CXC chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 167:1676-1686. doi:10.1164/rccm.200301-071OC [doi];200301-071OC [pii].
- Pietras, K., J. Pahler, G. Bergers, and D. Hanahan. 2008. Functions of paracrine PDGF signaling in the proangiogenic tumor stroma revealed by pharmacological targeting. *PLoS.Med.* 5:e19. doi:07-PLME-RA-0582 [pii];10.1371/journal.pmed.0050019 [doi].
- Pinchuk, I. V., J. I. Saada, E. J. Beswick, G. Boya, S. M. Qiu, R. C. Mifflin, G. S. Raju, V. E. Reyes, and D. W. Powell. 2008. PD-1 ligand expression by human colonic myofibroblasts/fibroblasts regulates CD4+ T-cell activity. *Gastroenterology* 135:1228-1237, 1237. doi:S0016-5085(08)01324-3 [pii];10.1053/j.gastro.2008.07.016 [doi].
- Pipkin, M. E., J. A. Sacks, F. Cruz-Guilloty, M. G. Lichtenheld, M. J. Bevan, and A. Rao. 2010. Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells. *Immunity.* 32:79-90. doi:S1074-7613(10)00010-5 [pii];10.1016/j.immuni.2009.11.012 [doi].
- Pirhonen, J., S. Matikainen, and I. Julkunen. 2002. Regulation of virus-induced IL-12 and IL-23 expression in human macrophages. *J.Immunol.* 169:5673-5678.
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig, and D. R. Marshak. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147.
- Plopper, G. E., H. P. McNamee, L. E. Dike, K. Bojanowski, and D. E. Ingber. 1995. Convergence of integrin and growth factor receptor signaling pathways within the focal adhesion complex. *Mol.Biol.Cell* 6:1349-1365.
- Podgorski, I., B. E. Linebaugh, M. Sameni, C. Jedeszko, S. Bhagat, M. L. Cher, and B. F. Sloane. 2005. Bone microenvironment modulates expression and activity of cathepsin B in prostate cancer. *Neoplasia.* 7:207-223. doi:10.1593/neo.04349 [doi].
- Poggi, A., E. Tomasello, E. Ferrero, M. R. Zocchi, and L. Moretta. 1998. p40/LAIR-1 regulates the differentiation of peripheral blood precursors to dendritic cells induced by granulocyte-monocyte colony-stimulating factor. *Eur.J.Immunol.* 28:2086-2091. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199807)28:07<2086::AID-IMMU2086>3.0.CO;2-T [pii];10.1002/(SICI)1521-4141(199807)28:07<2086::AID-IMMU2086>3.0.CO;2-T [doi].
- Poggi, A., E. Tomasello, V. Revello, L. Nanni, P. Costa, and L. Moretta. 1997. p40 molecule regulates NK cell activation mediated by NK receptors for HLA class I antigens and TCR-mediated triggering of T lymphocytes. *Int.Immunol.* 9:1271-1279.
- Potier, E., E. Ferreira, R. Andriamanalijaona, J. P. Pujol, K. Oudina, D. Logeart-Avramoglou, and H. Petite. 2007. Hypoxia affects mesenchymal stromal cell osteogenic differentiation and angiogenic factor expression. *Bone* 40:1078-1087. doi:S8756-3282(06)00852-0 [pii];10.1016/j.bone.2006.11.024 [doi].
- Powell, J. D., C. G. Lerner, and R. H. Schwartz. 1999. Inhibition of cell cycle progression by rapamycin induces T cell clonal anergy even in the presence of costimulation. *J.Immunol.* 162:2775-2784.
- Powell-Braxton, L., P. Hollingshead, C. Warburton, M. Dowd, S. Pitts-Meek, D. Dalton, N. Gillett, and T. A. Stewart. 1993. IGF-I is required for normal embryonic growth in mice. *Genes Dev.* 7:2609-2617.
- Prilliman, K. R., E. E. Lemmens, G. Palioungas, T. G. Wolfe, J. P. Allison, A. H. Sharpe, and S. P. Schoenberger. 2002. Cutting edge: a crucial role for B7-CD28 in transmitting T help from APC to CTL. *J.Immunol.* 169:4094-4097.
- Prokopchuk, O., Y. Liu, D. Henne-Bruns, and M. Kornmann. 2005. Interleukin-4 enhances proliferation of human pancreatic cancer cells: evidence for autocrine and paracrine actions. *Br.J.Cancer* 92:921-928. doi:6602416 [pii];10.1038/sj.bjc.6602416 [doi].
- Provenzano, P. P., K. W. Eliceiri, J. M. Campbell, D. R. Inman, J. G. White, and P. J. Keely. 2006. Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. *BMC.Med.* 4:38. doi:1741-7015-4-38 [pii];10.1186/1741-7015-4-38 [doi].
- Provenzano, P. P., D. R. Inman, K. W. Eliceiri, S. M. Trier, and P. J. Keely. 2008. Contact guidance mediated three-dimensional cell migration is regulated by Rho/ROCK-dependent matrix reorganization. *Biophys.J.* 95:5374-5384. doi:S0006-3495(08)78961-6 [pii];10.1529/biophysj.108.133116 [doi].
- Purwar, R., C. Schlapbach, S. Xiao, H. S. Kang, W. Elyaman, X. Jiang, A. M. Jetten, S. J. Khoury, R. C. Fuhlbrigge, V. K. Kuchroo, R. A. Clark, and T. S. Kupper. 2012. Robust tumor immunity to melanoma mediated by interleukin-9-producing T cells. *Nat.Med.* 18:1248-1253. doi:nm.2856 [pii];10.1038/nm.2856 [doi].

- Qian, B. Z., J. Li, H. Zhang, T. Kitamura, J. Zhang, L. R. Campion, E. A. Kaiser, L. A. Snyder, and J. W. Pollard. 2011. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* 475:222-225. doi:nature10138 [pii];10.1038/nature10138 [doi].
- Qin, X. J., H. Z. Shi, J. M. Deng, Q. L. Liang, J. Jiang, and Z. J. Ye. 2009. CCL22 recruits CD4-positive CD25-positive regulatory T cells into malignant pleural effusion. *Clin.Cancer Res.* 15:2231-2237. doi:1078-0432.CCR-08-2641 [pii];10.1158/1078-0432.CCR-08-2641 [doi].
- Quezada, S. A., K. S. Peggs, T. R. Simpson, and J. P. Allison. 2011. Shifting the equilibrium in cancer immunoediting: from tumor tolerance to eradication. *Immunol.Rev.* 241:104-118. doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01007.x [doi].
- Qureshi, O. S., Y. Zheng, K. Nakamura, K. Attridge, C. Manzotti, E. M. Schmidt, J. Baker, L. E. Jeffery, S. Kaur, Z. Briggs, T. Z. Hou, C. E. Futter, G. Anderson, L. S. Walker, and D. M. Sansom. 2011. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science* 332:600-603. doi:science.1202947 [pii];10.1126/science.1202947 [doi].
- Raines, E. W. and R. Ross. 1992. Compartmentalization of PDGF on extracellular binding sites dependent on exon-6-encoded sequences. *J.Cell Biol.* 116:533-543.
- Rajah, R., S. E. Nunn, D. J. Herrick, M. M. Grunstein, and P. Cohen. 1996. Leukotriene D4 induces MMP-1, which functions as an IGFBP protease in human airway smooth muscle cells. *Am.J.Physiol* 271:L1014-L1022.
- Ramchandran, R., M. Dhanabal, R. Volk, M. J. Waterman, M. Segal, H. Lu, B. Knebelmann, and V. P. Sukhatme. 1999. Antiangiogenic activity of restin, NC10 domain of human collagen XV: comparison to endostatin. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 255:735-739. doi:S0006-291X(99)90248-6 [pii];10.1006/bbrc.1999.0248 [doi].
- Rao, R. R., Q. Li, M. R. Gubbels Bupp, and P. A. Shrikant. 2012. Transcription factor Foxo1 represses T-bet-mediated effector functions and promotes memory CD8(+) T cell differentiation. *Immunity.* 36:374-387. doi:S1074-7613(12)00088-X [pii];10.1016/j.immuni.2012.01.015 [doi].
- Rao, R. R., Q. Li, K. Odunsi, and P. A. Shrikant. 2010. The mTOR kinase determines effector versus memory CD8+ T cell fate by regulating the expression of transcription factors T-bet and Eomesodermin. *Immunity.* 32:67-78. doi:S1074-7613(09)00545-7 [pii];10.1016/j.immuni.2009.10.010 [doi].
- Rapraeger, A. C., A. Krufka, and B. B. Olwin. 1991. Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. *Science* 252:1705-1708.
- Rasmusson, I., O. Ringden, B. Sundberg, and B. K. Le. 2003. Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation* 76:1208-1213. doi:10.1097/01.TP.0000082540.43730.80 [doi].
- Reddy, P., J. L. Slack, R. Davis, D. P. Cerretti, C. J. Kozlosky, R. A. Blanton, D. Shows, J. J. Peschon, and R. A. Black. 2000. Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *J.Biol.Chem.* 275:14608-14614. doi:275/19/14608 [pii].
- Redjimi, N., C. Raffin, I. Raimbaud, P. Pignon, J. Matsuzaki, K. Odunsi, D. Valmori, and M. Ayyoub. 2012. CXCR3+ T regulatory cells selectively accumulate in human ovarian carcinomas to limit type I immunity. *Cancer Res.* 72:4351-4360. doi:0008-5472.CAN-12-0579 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-12-0579 [doi].
- Reiske, H. R., S. C. Kao, L. A. Cary, J. L. Guan, J. F. Lai, and H. C. Chen. 1999. Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase in focal adhesion kinase-promoted cell migration. *J.Biol.Chem.* 274:12361-12366.
- Ren, G., J. Su, L. Zhang, X. Zhao, W. Ling, A. L'huillie, J. Zhang, Y. Lu, A. I. Roberts, W. Ji, H. Zhang, A. B. Rabson, and Y. Shi. 2009. Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Stem Cells* 27:1954-1962. doi:10.1002/stem.118 [doi].
- Ren, X. D., W. B. Kiosses, D. J. Sieg, C. A. Otey, D. D. Schlaepfer, and M. A. Schwartz. 2000. Focal adhesion kinase suppresses Rho activity to promote focal adhesion turnover. *J.Cell Sci.* 113 ( Pt 20):3673-3678.
- Restifo, N. P., M. E. Dudley, and S. A. Rosenberg. 2012. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nat.Rev.Immunol.* 12:269-281. doi:nri3191 [pii];10.1038/nri3191 [doi].
- Restifo, N. P., F. M. Marincola, Y. Kawakami, J. Taubenberger, J. R. Yannelli, and S. A. Rosenberg. 1996. Loss of functional beta 2-microglobulin in metastatic melanomas from five patients receiving immunotherapy. *J.Nat.Cancer Inst.* 88:100-108.
- Rettig, W. J., P. Garin-Chesa, J. H. Healey, S. L. Su, H. L. Ozer, M. Schwab, A. P. Albino, and L. J. Old. 1993. Regulation and heteromeric structure of the fibroblast activation protein in normal and transformed cells of mesenchymal and neuroectodermal origin. *Cancer Res.* 53:3327-3335.
- Reuschenbach, M., D. M. von Knebel, and N. Wentzensen. 2009. A systematic review of humoral immune responses against tumor antigens. *Cancer Immunol.Immunother.* 58:1535-1544. doi:10.1007/s00262-009-0733-4 [doi].
- Reya, T. and H. Clevers. 2005. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 434:843-850. doi:nature03319 [pii];10.1038/nature03319 [doi].

- Ricote, M., A. C. Li, T. M. Willson, C. J. Kelly, and C. K. Glass. 1998. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 391:79-82. doi:10.1038/34178 [doi].
- Ridge, J. P., R. F. Di, and P. Matzinger. 1998. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 393:474-478. doi:10.1038/30989 [doi].
- Ridley, A. J., H. F. Paterson, C. L. Johnston, D. Diekmann, and A. Hall. 1992. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70:401-410. doi:0092-8674(92)90164-8 [pii].
- Rincon, M., J. Anguita, T. Nakamura, E. Fikrig, and R. A. Flavell. 1997. Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells. *J.Exp.Med.* 185:461-469.
- Ring, S., S. Karakhanova, T. Johnson, A. H. Enk, and K. Mahnke. 2010. Gap junctions between regulatory T cells and dendritic cells prevent sensitization of CD8(+) T cells. *J.Allergy Clin.Immunol.* 125:237-246. doi:S0091-6749(09)01554-1 [pii];10.1016/j.jaci.2009.10.025 [doi].
- Ringe, J., S. Strassburg, K. Neumann, M. Endres, M. Notter, G. R. Burmester, C. Kaps, and M. Sittinger. 2007. Towards in situ tissue repair: human mesenchymal stem cells express chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CCR2, and migrate upon stimulation with CXCL8 but not CCL2. *J.Cell Biochem.* 101:135-146. doi:10.1002/jcb.21172 [doi].
- Robson, S. C., E. Kaczmarek, J. B. Siegel, D. Candinas, K. Koziak, M. Millan, W. W. Hancock, and F. H. Bach. 1997. Loss of ATP diphosphohydrolase activity with endothelial cell activation. *J.Exp.Med.* 185:153-163.
- Roca, H., M. J. Craig, C. Ying, Z. S. Varsos, P. Czarnieski, A. S. Alva, J. Hernandez, D. Fuller, S. Daignault, P. N. Healy, and K. J. Pienta. 2012. IL-4 induces proliferation in prostate cancer PC3 cells under nutrient-depletion stress through the activation of the JNK-pathway and survivin up-regulation. *J.Cell Biochem.* 113:1569-1580. doi:10.1002/jcb.24025 [doi].
- Roca, H., Z. S. Varsos, S. Sud, M. J. Craig, C. Ying, and K. J. Pienta. 2009. CCL2 and interleukin-6 promote survival of human CD11b+ peripheral blood mononuclear cells and induce M2-type macrophage polarization. *J.Biol.Chem.* 284:34342-34354. doi:M109.042671 [pii];10.1074/jbc.M109.042671 [doi].
- Rodriguez, P. C., A. H. Zea, J. DeSalvo, K. S. Culotta, J. Zabaleta, D. G. Quiceno, J. B. Ochoa, and A. C. Ochoa. 2003. L-arginine consumption by macrophages modulates the expression of CD3 zeta chain in T lymphocytes. *J.Immunol.* 171:1232-1239.
- Rolny, C., M. Mazzone, S. Tugues, D. Laoui, I. Johansson, C. Coulon, M. L. Squadrito, I. Segura, X. Li, E. Knevels, S. Costa, S. Vinckier, T. Dresselaer, P. Akerud, M. M. De, H. Salomaki, M. Phillipson, S. Wyns, E. Larsson, I. Buyschaert, J. Botling, U. Himmelreich, J. A. Van Ginderachter, P. M. De, M. Dewerchin, L. Claesson-Welsh, and P. Carmeliet. 2011. HRG inhibits tumor growth and metastasis by inducing macrophage polarization and vessel normalization through downregulation of PlGF. *Cancer Cell* 19:31-44. doi:S1535-6108(10)00474-5 [pii];10.1016/j.ccr.2010.11.009 [doi].
- Romano, M., M. Sironi, C. Toniatti, N. Polentarutti, P. Fruscella, P. Ghezzi, R. Faggioni, W. Luini, H. van, V. S. Sozzani, F. Bussolino, V. Poli, G. Ciliberto, and A. Mantovani. 1997. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity.* 6:315-325. doi:S1074-7613(00)80334-9 [pii].
- Roncarolo, M. G., S. Gregori, M. Battaglia, R. Bacchetta, K. Fleischhauer, and M. K. Levings. 2006. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol.Rev.* 212:28-50. doi:IMR420 [pii];10.1111/j.0105-2896.2006.00420.x [doi].
- Ronnov-Jessen, L., O. W. Petersen, V. E. Kotliansky, and M. J. Bissell. 1995. The origin of the myofibroblasts in breast cancer. Recapitulation of tumor environment in culture unravels diversity and implicates converted fibroblasts and recruited smooth muscle cells. *J.Clin.Invest* 95:859-873. doi:10.1172/JCI117736 [doi].
- Ronty, M. J., S. K. Leivonen, B. Hinz, A. Rachlin, C. A. Otey, V. M. Kahari, and O. M. Carpen. 2006. Isoform-specific regulation of the actin-organizing protein plectin during TGF-beta1-induced myofibroblast differentiation. *J.Invest Dermatol.* 126:2387-2396. doi:5700427 [pii];10.1038/sj.jid.5700427 [doi].
- Roovers, K., G. Davey, X. Zhu, M. E. Bottazzi, and R. K. Assoian. 1999. Alpha5beta1 integrin controls cyclin D1 expression by sustaining mitogen-activated protein kinase activity in growth factor-treated cells. *Mol.Biol.Cell* 10:3197-3204.
- Rosel, D., J. Brabek, O. Tolde, C. T. Mierke, D. P. Zitterbart, C. Raupach, K. Bicanova, P. Kollmannsberger, D. Pankova, P. Vesely, P. Folk, and B. Fabry. 2008. Up-regulation of Rho/ROCK signaling in sarcoma cells drives invasion and increased generation of protrusive forces. *Mol.Cancer Res.* 6:1410-1420. doi:6/9/1410 [pii];10.1158/1541-7786.MCR-07-2174 [doi].
- Rovere, C., J. Luis, J. C. Lissitzky, A. Basak, J. Marvaldi, M. Chretien, and N. G. Seidah. 1999. The RGD motif and the C-terminal segment of proprotein convertase 1 are critical for its cellular trafficking but not for its intracellular binding to integrin alpha5beta1. *J.Biol.Chem.* 274:12461-12467.
- Ruan, Q., V. Kameswaran, Y. Tone, L. Li, H. C. Liou, M. I. Greene, M. Tone, and Y. H. Chen. 2009. Development of Foxp3(+) regulatory t cells is driven by the c-Rel enhanceosome. *Immunity.* 31:932-940. doi:S1074-7613(09)00503-2 [pii];10.1016/j.immuni.2009.10.006 [doi].

- Rudner, X. L., K. I. Happel, E. A. Young, and J. E. Shellito. 2007. Interleukin-23 (IL-23)-IL-17 cytokine axis in murine *Pneumocystis carinii* infection. *Infect.Immun.* 75:3055-3061. doi:IAI.01329-06 [pii];10.1128/IAI.01329-06 [doi].
- Rudnick, J. A., L. M. Arendt, I. Klebba, J. W. Hinds, V. Iyer, P. B. Gupta, S. P. Naber, and C. Kuperwasser. 2011. Functional heterogeneity of breast fibroblasts is defined by a prostaglandin secretory phenotype that promotes expansion of cancer-stem like cells. *PLoS.One.* 6:e24605. doi:10.1371/journal.pone.0024605 [doi];PONE-D-11-11675 [pii].
- Rudra, D., P. DeRoos, A. Chaudhry, R. E. Niec, A. Arvey, R. M. Samstein, C. Leslie, S. A. Shaffer, D. R. Goodlett, and A. Y. Rudensky. 2012. Transcription factor Foxp3 and its protein partners form a complex regulatory network. *Nat.Immunol.* 13:1010-1019. doi:ni.2402 [pii];10.1038/ni.2402 [doi].
- Rudra, D., T. Egawa, M. M. Chong, P. Treuting, D. R. Littman, and A. Y. Rudensky. 2009. Runx-CBFbeta complexes control expression of the transcription factor Foxp3 in regulatory T cells. *Nat.Immunol.* 10:1170-1177. doi:ni.1795 [pii];10.1038/ni.1795 [doi].
- Rutishauser, R. L., G. A. Martins, S. Kalachikov, A. Chandele, I. A. Parish, E. Meffre, J. Jacob, K. Calame, and S. M. Kaech. 2009. Transcriptional repressor Blimp-1 promotes CD8(+) T cell terminal differentiation and represses the acquisition of central memory T cell properties. *Immunity.* 31:296-308. doi:S1074-7613(09)00323-9 [pii];10.1016/j.immuni.2009.05.014 [doi].
- Ryder, M., M. Gild, T. M. Hohl, E. Pamer, J. Knauf, R. Ghossein, J. A. Joyce, and J. A. Fagin. 2013. Genetic and pharmacological targeting of CSF-1/CSF-1R inhibits tumor-associated macrophages and impairs BRAF-induced thyroid cancer progression. *PLoS.One.* 8:e54302. doi:10.1371/journal.pone.0054302 [doi];PONE-D-12-29549 [pii].
- Ryu, S., J. H. Lee, and S. I. Kim. 2006. IL-17 increased the production of vascular endothelial growth factor in rheumatoid arthritis synoviocytes. *Clin.Rheumatol.* 25:16-20. doi:10.1007/s10067-005-1081-1 [doi].
- Saad, S., D. J. Gottlieb, K. F. Bradstock, C. M. Overall, and L. J. Bendall. 2002. Cancer cell-associated fibronectin induces release of matrix metalloproteinase-2 from normal fibroblasts. *Cancer Res.* 62:283-289.
- Sadowski, T., S. Dietrich, F. Koschinsky, A. Ludwig, E. Proksch, B. Titz, and R. Sedlacek. 2005. Matrix metalloproteinase 19 processes the laminin 5 gamma 2 chain and induces epithelial cell migration. *Cell Mol.Life Sci.* 62:870-880. doi:10.1007/s00018-005-4478-8 [doi].
- Sadowski, T., S. Dietrich, F. Koschinsky, and R. Sedlacek. 2003. Matrix metalloproteinase 19 regulates insulin-like growth factor-mediated proliferation, migration, and adhesion in human keratinocytes through proteolysis of insulin-like growth factor binding protein-3. *Mol.Biol.Cell* 14:4569-4580. doi:10.1091/mbc.E03-01-0009 [doi];E03-01-0009 [pii].
- Safford, M., S. Collins, M. A. Lutz, A. Allen, C. T. Huang, J. Kowalski, A. Blackford, M. R. Horton, C. Drake, R. H. Schwartz, and J. D. Powell. 2005. Egr-2 and Egr-3 are negative regulators of T cell activation. *Nat.Immunol.* 6:472-480. doi:ni1193 [pii];10.1038/ni1193 [doi].
- Sahai, E. and C. J. Marshall. 2003. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat.Cell Biol.* 5:711-719. doi:10.1038/ncb1019 [doi];ncb1019 [pii].
- Saharinen, J., J. Taipale, O. Monni, and J. Keski-Oja. 1998. Identification and characterization of a new latent transforming growth factor-beta-binding protein, LTBP-4. *J.Biol.Chem.* 273:18459-18469.
- Sakaguchi, S., M. Miyara, C. M. Costantino, and D. A. Hafler. 2010. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat.Rev.Immunol.* 10:490-500. doi:nri2785 [pii];10.1038/nri2785 [doi].
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J.Immunol.* 155:1151-1164.
- Sakaguchi, S., T. Yamaguchi, T. Nomura, and M. Ono. 2008. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133:775-787. doi:S0092-8674(08)00624-7 [pii];10.1016/j.cell.2008.05.009 [doi].
- Saksela, O., D. Moscatelli, A. Sommer, and D. B. Rifkin. 1988. Endothelial cell-derived heparan sulfate binds basic fibroblast growth factor and protects it from proteolytic degradation. *J.Cell Biol.* 107:743-751.
- Sallusto, F. and A. Lanzavecchia. 2009. Human Th17 cells in infection and autoimmunity. *Microbes.Infect.* 11:620-624. doi:S1286-4579(09)00089-6 [pii];10.1016/j.micinf.2009.04.004 [doi].
- Samstein, R. M., A. Arvey, S. Z. Josefowicz, X. Peng, A. Reynolds, R. Sandstrom, S. Neph, P. Sabo, J. M. Kim, W. Liao, M. O. Li, C. Leslie, J. A. Stamatoyannopoulos, and A. Y. Rudensky. 2012. Foxp3 exploits a pre-existent enhancer landscape for regulatory T cell lineage specification. *Cell* 151:153-166. doi:S0092-8674(12)01014-8 [pii];10.1016/j.cell.2012.06.053 [doi].
- Samstein, R. M., S. Z. Josefowicz, A. Arvey, P. M. Treuting, and A. Y. Rudensky. 2012. Extrathymic generation of regulatory T cells in placental mammals mitigates maternal-fetal conflict. *Cell* 150:29-38. doi:S0092-8674(12)00652-6 [pii];10.1016/j.cell.2012.05.031 [doi].

- Sander, E. E., J. P. ten Klooster, D. S. van, R. A. van der Kammen, and J. G. Collard. 1999. Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J. Cell Biol.* 147:1009-1022.
- Sanderson, C. J., A. O'Garra, D. J. Warren, and G. G. Klaus. 1986. Eosinophil differentiation factor also has B-cell growth factor activity: proposed name interleukin 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83:437-440.
- Sanjabi, S., M. M. Mosaheb, and R. A. Flavell. 2009. Opposing effects of TGF-beta and IL-15 cytokines control the number of short-lived effector CD8+ T cells. *Immunity.* 31:131-144. doi:S1074-7613(09)00283-0 [pii];10.1016/j.immuni.2009.04.020 [doi].
- Sanos, S. L., V. L. Bui, A. Mortha, K. Oberle, C. Heners, C. Johner, and A. Diefenbach. 2009. RORgamma and commensal microflora are required for the differentiation of mucosal interleukin 22-producing NKp46+ cells. *Nat. Immunol.* 10:83-91. doi:ni.1684 [pii];10.1038/ni.1684 [doi].
- Santer, F. R., N. Bacher, B. Moser, D. Morandell, S. Ressler, S. M. Firth, G. A. Spoden, C. Sergi, R. C. Baxter, P. Jansen-Durr, and W. Zwierschke. 2006. Nuclear insulin-like growth factor binding protein-3 induces apoptosis and is targeted to ubiquitin/proteasome-dependent proteolysis. *Cancer Res.* 66:3024-3033. doi:66/6/3024 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-05-2013 [doi].
- Sanz-Moreno, V., G. Gadea, J. Ahn, H. Paterson, P. Marra, S. Pinner, E. Sahai, and C. J. Marshall. 2008. Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. *Cell* 135:510-523. doi:S0092-8674(08)01236-1 [pii];10.1016/j.cell.2008.09.043 [doi].
- Satoh, T., O. Takeuchi, A. Vandenbon, K. Yasuda, Y. Tanaka, Y. Kumagai, T. Miyake, K. Matsushita, T. Okazaki, T. Saitoh, K. Honma, T. Matsuyama, K. Yui, T. Tsujimura, D. M. Standley, K. Nakanishi, K. Nakai, and S. Akira. 2010. The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection. *Nat. Immunol.* 11:936-944. doi:ni.1920 [pii];10.1038/ni.1920 [doi].
- Savinov, A. Y., A. G. Remacle, V. S. Golubkov, M. Krajewska, S. Kennedy, M. J. Duffy, D. V. Rozanov, S. Krajewski, and A. Y. Strongin. 2006. Matrix metalloproteinase 26 proteolysis of the NH2-terminal domain of the estrogen receptor beta correlates with the survival of breast cancer patients. *Cancer Res.* 66:2716-2724. doi:66/5/2716 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-05-3592 [doi].
- Schaller, M. D., J. D. Hildebrand, J. D. Shannon, J. W. Fox, R. R. Vines, and J. T. Parsons. 1994. Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. *Mol. Cell Biol.* 14:1680-1688.
- Schaller, M. D., C. A. Otey, J. D. Hildebrand, and J. T. Parsons. 1995. Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains. *J. Cell Biol.* 130:1181-1187.
- Scharton, T. M. and P. Scott. 1993. Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. *J. Exp. Med.* 178:567-577.
- Schedlich, L. J., S. L. Le Page, S. M. Firth, L. J. Briggs, D. A. Jans, and R. C. Baxter. 2000. Nuclear import of insulin-like growth factor-binding protein-3 and -5 is mediated by the importin beta subunit. *J. Biol. Chem.* 275:23462-23470. doi:10.1074/jbc.M002208200 [doi];M002208200 [pii].
- Scheinman, E. J. and O. Avni. 2009. Transcriptional regulation of GATA3 in T helper cells by the integrated activities of transcription factors downstream of the interleukin-4 receptor and T cell receptor. *J. Biol. Chem.* 284:3037-3048. doi:M807302200 [pii];10.1074/jbc.M807302200 [doi].
- Schenk, S., E. Hintermann, M. Bilban, N. Koshikawa, C. Hojilla, R. Khokha, and V. Quaranta. 2003. Binding to EGF receptor of a laminin-5 EGF-like fragment liberated during MMP-dependent mammary gland involution. *J. Cell Biol.* 161:197-209. doi:10.1083/jcb.200208145 [doi];jcb.200208145 [pii].
- Schietinger, A. and P. D. Greenberg. 2014. Tolerance and exhaustion: defining mechanisms of T cell dysfunction. *Trends Immunol.* 35:51-60. doi:S1471-4906(13)00154-3 [pii];10.1016/j.it.2013.10.001 [doi].
- Schlecker, E., N. Fiegler, A. Arnold, P. Altevogt, S. Rose-John, G. Moldenhauer, A. Sucker, A. Paschen, E. P. von Strandmann, S. Textor, and A. Cerwenka. 2014. Metalloprotease-mediated tumor cell shedding of B7-H6, the ligand of the natural killer cell-activating receptor NKp30. *Cancer Res.* 74:3429-3440. doi:0008-5472.CAN-13-3017 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-13-3017 [doi].
- Schleimer, R. P., S. A. Sterbinsky, J. Kaiser, C. A. Bickel, D. A. Klunk, K. Tomioka, W. Newman, F. W. Luscinskas, M. A. Gimbrone, Jr., B. W. McIntyre, and . 1992. IL-4 induces adherence of human eosinophils and basophils but not neutrophils to endothelium. Association with expression of VCAM-1. *J. Immunol.* 148:1086-1092.
- Schmieder, A., J. Michel, K. Schonhaar, S. Goerdts, and K. Schledzewski. 2012. Differentiation and gene expression profile of tumor-associated macrophages. *Semin. Cancer Biol.* 22:289-297. doi:S1044-579X(12)00025-9 [pii];10.1016/j.semcancer.2012.02.002 [doi].
- Schmitt, E., M. Klein, and T. Bopp. 2014. Th9 cells, new players in adaptive immunity. *Trends Immunol.* 35:61-68. doi:S1471-4906(13)00157-9 [pii];10.1016/j.it.2013.10.004 [doi].

- Schneller, M., K. Vuori, and E. Ruoslahti. 1997. Alphavbeta3 integrin associates with activated insulin and PDGFbeta receptors and potentiates the biological activity of PDGF. *EMBO J.* 16:5600-5607. doi:10.1093/emboj/16.18.5600 [doi].
- Scholz, F., A. Schulte, F. Adamski, C. Hundhausen, J. Mittag, A. Schwarz, M. L. Kruse, E. Proksch, and A. Ludwig. 2007. Constitutive expression and regulated release of the transmembrane chemokine CXCL16 in human and murine skin. *J.Invest Dermatol.* 127:1444-1455. doi:5700751 [pii];10.1038/sj.jid.5700751 [doi].
- Schonbeck, U., F. Mach, and P. Libby. 1998. Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing. *J.Immunol.* 161:3340-3346.
- Schoppmann, S. F., P. Birner, J. Stockl, R. Kalt, R. Ullrich, C. Caucig, E. Kriehuber, K. Nagy, K. Alitalo, and D. Kerjaschki. 2002. Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *Am.J.Pathol.* 161:947-956. doi:S0002-9440(10)64255-1 [pii];10.1016/S0002-9440(10)64255-1 [doi].
- Schor, S. L. and A. M. Schor. 2001. Phenotypic and genetic alterations in mammary stroma: implications for tumour progression. *Breast Cancer Res.* 3:373-379.
- Schreck, S., D. Friebel, M. Buettner, L. Distel, G. Grabenbauer, L. S. Young, and G. Niedobitek. 2009. Prognostic impact of tumour-infiltrating Th2 and regulatory T cells in classical Hodgkin lymphoma. *Hematol.Oncol.* 27:31-39. doi:10.1002/hon.878 [doi].
- Schreiber, R. D., L. J. Old, and M. J. Smyth. 2011. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331:1565-1570. doi:331/6024/1565 [pii];10.1126/science.1203486 [doi].
- Schuler, P. J., Z. Saze, C. S. Hong, L. Muller, D. G. Gillespie, D. Cheng, M. Harasymczuk, M. Mandapathil, S. Lang, E. K. Jackson, and T. L. Whiteside. 2014. Human CD4+ CD39+ regulatory T cells produce adenosine upon co-expression of surface CD73 or contact with CD73+ exosomes or CD73+ cells. *Clin.Exp.Immunol.* 177:531-543. doi:10.1111/cei.12354 [doi].
- Schultz, G. S. and A. Wysocki. 2009. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound.Repair Regen.* 17:153-162. doi:WRR466 [pii];10.1111/j.1524-475X.2009.00466.x [doi].
- Seddiki, N., B. Santner-Nanan, J. Martinson, J. Zaunders, S. Sasson, A. Landay, M. Solomon, W. Selby, S. I. Alexander, R. Nanan, A. Kelleher, and G. B. Fazekas de St. 2006. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J.Exp.Med.* 203:1693-1700. doi:jem.20060468 [pii];10.1084/jem.20060468 [doi].
- Sekiya, T., I. Kashiwagi, N. Inoue, R. Morita, S. Hori, H. Waldmann, A. Y. Rudensky, H. Ichinose, D. Metzger, P. Chambon, and A. Yoshimura. 2011. The nuclear orphan receptor Nr4a2 induces Foxp3 and regulates differentiation of CD4+ T cells. *Nat.Commun.* 2:269. doi:ncomms1272 [pii];10.1038/ncomms1272 [doi].
- Sekiya, T., I. Kashiwagi, R. Yoshida, T. Fukaya, R. Morita, A. Kimura, H. Ichinose, D. Metzger, P. Chambon, and A. Yoshimura. 2013. Nr4a receptors are essential for thymic regulatory T cell development and immune homeostasis. *Nat.Immunol.* 14:230-237. doi:ni.2520 [pii];10.1038/ni.2520 [doi].
- Selmani, Z., A. Naji, I. Zidi, B. Favier, E. Gaiffe, L. Obert, C. Borg, P. Saas, P. Tiberghien, N. Rouas-Freiss, E. D. Carosella, and F. Deschaseaux. 2008. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *Stem Cells* 26:212-222. doi:2007-0554 [pii];10.1634/stemcells.2007-0554 [doi].
- Semenza, G. L. 2009. Regulation of cancer cell metabolism by hypoxia-inducible factor 1. *Semin.Cancer Biol.* 19:12-16. doi:S1044-579X(08)00106-5 [pii];10.1016/j.semcancer.2008.11.009 [doi].
- Semple, K., A. Nguyen, Y. Yu, H. Wang, C. Anasetti, and X. Z. Yu. 2011. Strong CD28 costimulation suppresses induction of regulatory T cells from naive precursors through Lck signaling. *Blood* 117:3096-3103. doi:blood-2010-08-301275 [pii];10.1182/blood-2010-08-301275 [doi].
- Senior, R. M., H. D. Gresham, G. L. Griffin, E. J. Brown, and A. E. Chung. 1992. Entactin stimulates neutrophil adhesion and chemotaxis through interactions between its Arg-Gly-Asp (RGD) domain and the leukocyte response integrin. *J.Clin.Invest* 90:2251-2257. doi:10.1172/JCI116111 [doi].
- Senior, R. M., G. L. Griffin, and R. P. Mecham. 1980. Chemotactic activity of elastin-derived peptides. *J.Clin.Invest* 66:859-862. doi:10.1172/JCI109926 [doi].
- Senior, R. M., G. L. Griffin, R. P. Mecham, D. S. Wrenn, K. U. Prasad, and D. W. Urry. 1984. Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly, a repeating peptide in elastin, is chemotactic for fibroblasts and monocytes. *J.Cell Biol.* 99:870-874.
- Senior, R. M., A. Hinek, G. L. Griffin, D. J. Pipoly, E. C. Crouch, and R. P. Mecham. 1989. Neutrophils show chemotaxis to type IV collagen and its 7S domain and contain a 67 kD type IV collagen binding protein with lectin properties. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 1:479-487. doi:10.1165/ajrcmb/1.6.479 [doi].
- Serafini, P., S. Mgebroff, K. Noonan, and I. Borrello. 2008. Myeloid-derived suppressor cells promote cross-tolerance in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells. *Cancer Res.* 68:5439-5449. doi:68/13/5439 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-07-6621 [doi].

- Sfanos, K. S., T. C. Bruno, C. H. Maris, L. Xu, C. J. Thoburn, A. M. DeMarzo, A. K. Meeker, W. B. Isaacs, and C. G. Drake. 2008. Phenotypic analysis of prostate-infiltrating lymphocytes reveals TH17 and Treg skewing. *Clin.Cancer Res.* 14:3254-3261. doi:14/11/3254 [pii];10.1158/1078-0432.CCR-07-5164 [doi].
- Shahinian, A., K. Pfeffer, K. P. Lee, T. M. Kundig, K. Kishihara, A. Wakeham, K. Kawai, P. S. Ohashi, C. B. Thompson, and T. W. Mak. 1993. Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science* 261:609-612.
- Shangguan, L., X. Ti, U. Krause, B. Hai, Y. Zhao, Z. Yang, and F. Liu. 2012. Inhibition of TGF-beta/Smad signaling by BAMBI blocks differentiation of human mesenchymal stem cells to carcinoma-associated fibroblasts and abolishes their protumor effects. *Stem Cells* 30:2810-2819. doi:10.1002/stem.1251 [doi].
- Shankaran, V., H. Ikeda, A. T. Bruce, J. M. White, P. E. Swanson, L. J. Old, and R. D. Schreiber. 2001. IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410:1107-1111. doi:10.1038/35074122 [doi];35074122 [pii].
- Shebanie, A. F., I. Tadmori, H. Jing, E. Vassiliou, and D. Ganea. 2004. Prostaglandin E2 induces IL-23 production in bone marrow-derived dendritic cells. *FASEB J.* 18:1318-1320. doi:10.1096/fj.03-1367fje [doi];03-1367fje [pii].
- Sheu, B. C., S. M. Hsu, H. N. Ho, H. C. Lien, S. C. Huang, and R. H. Lin. 2001. A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression. *Cancer Res.* 61:237-242.
- Shi, Y., C. H. Liu, A. I. Roberts, J. Das, G. Xu, G. Ren, Y. Zhang, L. Zhang, Z. R. Yuan, H. S. Tan, G. Das, and S. Devadas. 2006. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know. *Cell Res.* 16:126-133. doi:7310017 [pii];10.1038/sj.cr.7310017 [doi].
- Shimizu, K., M. Nakata, Y. Hirami, T. Yukawa, A. Maeda, and K. Tanemoto. 2010. Tumor-infiltrating Foxp3+ regulatory T cells are correlated with cyclooxygenase-2 expression and are associated with recurrence in resected non-small cell lung cancer. *J.Thorac.Oncol.* 5:585-590. doi:10.1097/JTO.0b013e3181d60fd7 [doi].
- Shin, H., S. D. Blackburn, A. M. Intlekofer, C. Kao, J. M. Angelosanto, S. L. Reiner, and E. J. Wherry. 2009. A role for the transcriptional repressor Blimp-1 in CD8(+) T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity.* 31:309-320. doi:S1074-7613(09)00319-7 [pii];10.1016/j.immuni.2009.06.019 [doi].
- Shinagawa, K., Y. Kitadai, M. Tanaka, T. Sumida, M. Kodama, Y. Higashi, S. Tanaka, W. Yasui, and K. Chayama. 2010. Mesenchymal stem cells enhance growth and metastasis of colon cancer. *Int.J.Cancer* 127:2323-2333. doi:10.1002/ijc.25440 [doi].
- Shirahama-Noda, K., A. Yamamoto, K. Sugihara, N. Hashimoto, M. Asano, M. Nishimura, and I. Hara-Nishimura. 2003. Biosynthetic processing of cathepsins and lysosomal degradation are abolished in asparaginyl endopeptidase-deficient mice. *J.Biol.Chem.* 278:33194-33199. doi:10.1074/jbc.M302742200 [doi];M302742200 [pii].
- Sica, A. and A. Mantovani. 2012. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J.Clin.Invest* 122:787-795. doi:59643 [pii];10.1172/JCI59643 [doi].
- Sica, A., A. Saccani, B. Bottazzi, N. Polentarutti, A. Vecchi, D. J. Van, and A. Mantovani. 2000. Autocrine production of IL-10 mediates defective IL-12 production and NF-kappa B activation in tumor-associated macrophages. *J.Immunol.* 164:762-767. doi:ji\_v164n2p762 [pii].
- Sica, A., T. Schioppa, A. Mantovani, and P. Allavena. 2006. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur.J.Cancer* 42:717-727. doi:S0959-8049(06)00040-2 [pii];10.1016/j.ejca.2006.01.003 [doi].
- Sieg, D. J., C. R. Hauck, D. Ilic, C. K. Klingbeil, E. Schaefer, C. H. Damsky, and D. D. Schlaepfer. 2000. FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat.Cell Biol.* 2:249-256. doi:10.1038/35010517 [doi].
- Sierra-Filardi, E., C. Nieto, A. Dominguez-Soto, R. Barroso, P. Sanchez-Mateos, A. Puig-Kroger, M. Lopez-Bravo, J. Joven, C. Ardavin, J. L. Rodriguez-Fernandez, C. Sanchez-Torres, M. Mellado, and A. L. Corbi. 2014. CCL2 shapes macrophage polarization by GM-CSF and M-CSF: identification of CCL2/CCR2-dependent gene expression profile. *J.Immunol.* 192:3858-3867. doi:jimmunol.1302821 [pii];10.4049/jimmunol.1302821 [doi].
- Silzle, T., M. Kreutz, M. A. Dobler, G. Brockhoff, R. Knuechel, and L. A. Kunz-Schughart. 2003. Tumor-associated fibroblasts recruit blood monocytes into tumor tissue. *Eur.J.Immunol.* 33:1311-1320. doi:10.1002/eji.200323057 [doi].
- Sim, G. C., N. Martin-Orozco, L. Jin, Y. Yang, S. Wu, E. Washington, D. Sanders, C. Lacey, Y. Wang, L. Vence, P. Hwu, and L. Radvanyi. 2014. IL-2 therapy promotes suppressive ICOS+ Treg expansion in melanoma patients. *J.Clin.Invest* 124:99-110. doi:46266 [pii];10.1172/JCI46266 [doi].
- Singer, C. F., N. Kronsteiner, E. Marton, M. Kubista, K. J. Cullen, K. Hirtenlehner, M. Seifert, and E. Kubista. 2002. MMP-2 and MMP-9 expression in breast cancer-derived human fibroblasts is differentially regulated by stromal-epithelial interactions. *Breast Cancer Res.Treat.* 72:69-77.

- Singh, R. P., S. Hasan, S. Sharma, S. Nagra, D. T. Yamaguchi, D. Wong, H. Bh, and A. Hossain. 2014. Th17 cells in inflammation and autoimmunity. *Autoimmun.Rev.* doi:S1568-9972(14)00163-3 [pii];10.1016/j.autrev.2014.08.019 [doi].
- Slack-Davis, J. K., S. T. Eblen, M. Zecevic, S. A. Boerner, A. Tarcsafalvi, H. B. Diaz, M. S. Marshall, M. J. Weber, J. T. Parsons, and A. D. Catling. 2003. PAK1 phosphorylation of MEK1 regulates fibronectin-stimulated MAPK activation. *J.Cell Biol.* 162:281-291. doi:10.1083/jcb.200212141 [doi];jcb.200212141 [pii].
- Smahel, M., M. Duskova, I. Polakova, and J. Musil. 2014. Enhancement of DNA vaccine potency against legumain. *J.Immunother.* 37:293-303. doi:10.1097/CJI.0000000000000040 [doi];00002371-201406000-00005 [pii].
- Smahel, M., I. Polakova, E. Sobotkova, and E. Vajdova. 2011. Systemic administration of CpG oligodeoxynucleotide and levamisole as adjuvants for gene-gun-delivered antitumor DNA vaccines. *Clin.Dev.Immunol.* 2011:176759. doi:10.1155/2011/176759 [doi].
- Smahel, M., E. Sobotkova, J. Bubenik, J. Simova, R. Zak, V. Ludvikova, R. Hajkova, J. Kovarik, F. Jelinek, C. Povysil, J. Marinov, and V. Vonka. 2001. Metastatic MHC class I-negative mouse cells derived by transformation with human papillomavirus type 16. *Br.J.Cancer* 84:374-380. doi:S000709200091615X [pii];10.1054/bjoc.2000.1615 [doi].
- Song, B., B. Kim, S. H. Choi, K. Y. Song, Y. G. Chung, Y. S. Lee, and G. Park. 2014. Mesenchymal stromal cells promote tumor progression in fibrosarcoma and gastric cancer cells. *Korean J.Pathol.* 48:217-224. doi:10.4132/KoreanJPathol.2014.48.3.217 [doi].
- Sotiropoulou, P. A., S. A. Perez, A. D. Gritzapis, C. N. Baxevanis, and M. Papamichail. 2006. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells* 24:74-85. doi:2004-0359 [pii];10.1634/stemcells.2004-0359 [doi].
- Soto-Nieves, N., I. Puga, B. T. Abe, S. Bandyopadhyay, I. Baine, A. Rao, and F. Macian. 2009. Transcriptional complexes formed by NFAT dimers regulate the induction of T cell tolerance. *J.Exp.Med.* 206:867-876. doi:jem.20082731 [pii];10.1084/jem.20082731 [doi].
- Soucek, L., E. R. Lawlor, D. Soto, K. Shchors, L. B. Swigart, and G. I. Evan. 2007. Mast cells are required for angiogenesis and macroscopic expansion of Myc-induced pancreatic islet tumors. *Nat.Med.* 13:1211-1218. doi:nm1649 [pii];10.1038/nm1649 [doi].
- Spaeth, E., A. Klopp, J. Dembinski, M. Andreeff, and F. Marini. 2008. Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. *Gene Ther.* 15:730-738. doi:gt200839 [pii];10.1038/gt.2008.39 [doi].
- Spaggiari, G. M., H. Abdelrazik, F. Becchetti, and L. Moretta. 2009. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood* 113:6576-6583. doi:blood-2009-02-203943 [pii];10.1182/blood-2009-02-203943 [doi].
- Spaggiari, G. M., A. Capobianco, H. Abdelrazik, F. Becchetti, M. C. Mingari, and L. Moretta. 2008. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* 111:1327-1333. doi:blood-2007-02-074997 [pii];10.1182/blood-2007-02-074997 [doi].
- Spuul, P., P. Ciufici, V. Veillat, A. Leclercq, T. Daubon, I. J. Kramer, and E. Genot. 2014. Importance of RhoGTPases in formation, characteristics, and functions of invadosomes. *Small GTPases.* 5:e28195. doi:28713 [pii];10.4161/sgtp.28713 [doi].
- Stanley, E. R., K. L. Berg, D. B. Einstein, P. S. Lee, F. J. Pixley, Y. Wang, and Y. G. Yeung. 1997. Biology and action of colony-stimulating factor-1. *Mol.Reprod.Dev.* 46:4-10. doi:10.1002/(SICI)1098-2795(199701)46:1<4::AID-MRD2>3.0.CO;2-V [pii];10.1002/(SICI)1098-2795(199701)46:1<4::AID-MRD2>3.0.CO;2-V [doi].
- Staudt, V., E. Bothur, M. Klein, K. Lingnau, S. Reuter, N. Grebe, B. Gerlitzki, M. Hoffmann, A. Ulges, C. Taube, N. Dehzad, M. Becker, M. Stassen, A. Steinborn, M. Lohoff, H. Schild, E. Schmitt, and T. Bopp. 2010. Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells. *Immunity.* 33:192-202. doi:S1074-7613(10)00279-7 [pii];10.1016/j.immuni.2010.07.014 [doi].
- Steidl, C., T. Lee, S. P. Shah, P. Farinha, G. Han, T. Nayar, A. Delaney, S. J. Jones, J. Iqbal, D. D. Weisenburger, M. A. Bast, A. Rosenwald, H. K. Muller-Hermelink, L. M. Rimsza, E. Campo, J. Delabie, R. M. Braziel, J. R. Cook, R. R. Tubbs, E. S. Jaffe, G. Lenz, J. M. Connors, L. M. Staudt, W. C. Chan, and R. D. Gascoyne. 2010. Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *N.Engl.J.Med.* 362:875-885. doi:362/10/875 [pii];10.1056/NEJMoa0905680 [doi].
- Stocker, W., F. Grams, U. Baumann, P. Reinemer, F. X. Gomis-Ruth, D. B. McKay, and W. Bode. 1995. The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Sci.* 4:823-840. doi:10.1002/pro.5560040502 [doi].

- Strauss, L., C. Bergmann, and T. L. Whiteside. 2009. Human circulating CD4+CD25highFoxp3+ regulatory T cells kill autologous CD8+ but not CD4+ responder cells by Fas-mediated apoptosis. *J.Immunol.* 182:1469-1480. doi:182/3/1469 [pii].
- Sritesky, G. L., S. C. Jameson, and K. A. Hogquist. 2012. Selection of self-reactive T cells in the thymus. *Annu.Rev.Immunol.* 30:95-114. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-075035 [doi].
- Sritesky, G. L., R. Muthukrishnan, S. Sehra, R. Goswami, D. Pham, J. Travers, E. T. Nguyen, D. E. Levy, and M. H. Kaplan. 2011. The transcription factor STAT3 is required for T helper 2 cell development. *Immunity.* 34:39-49. doi:S1074-7613(10)00492-9 [pii];10.1016/j.immuni.2010.12.013 [doi].
- Strutz, F., H. Okada, C. W. Lo, T. Danoff, R. L. Carone, J. E. Tomaszewski, and E. G. Neilson. 1995. Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J.Cell Biol.* 130:393-405.
- Stuelten, C. H., J. I. Busch, B. Tang, K. C. Flanders, A. Oshima, E. Sutton, T. S. Karpova, A. B. Roberts, L. M. Wakefield, and J. E. Niederhuber. 2010. Transient tumor-fibroblast interactions increase tumor cell malignancy by a TGF-Beta mediated mechanism in a mouse xenograft model of breast cancer. *PLoS.One.* 5:e9832. doi:10.1371/journal.pone.0009832 [doi].
- Stuelten, C. H., B. S. DaCosta, P. R. Arany, T. S. Karpova, W. G. Stetler-Stevenson, and A. B. Roberts. 2005. Breast cancer cells induce stromal fibroblasts to express MMP-9 via secretion of TNF-alpha and TGF-beta. *J.Cell Sci.* 118:2143-2153. doi:jcs.02334 [pii];10.1242/jcs.02334 [doi].
- Su, X., J. Ye, E. C. Hsueh, Y. Zhang, D. F. Hoft, and G. Peng. 2010. Tumor microenvironments direct the recruitment and expansion of human Th17 cells. *J.Immunol.* 184:1630-1641. doi:jimmunol.0902813 [pii];10.4049/jimmunol.0902813 [doi].
- Su, Z., Y. Sun, H. Zhu, Y. Liu, X. Lin, H. Shen, J. Chen, W. Xu, and H. Xu. 2014. Th17 cell expansion in gastric cancer may contribute to cancer development and metastasis. *Immunol.Res.* 58:118-124. doi:10.1007/s12026-013-8483-y [doi].
- Subramaniam, K. S., S. T. Tham, Z. Mohamed, Y. L. Woo, N. A. Mat Adenan, and I. Chung. 2013. Cancer-associated fibroblasts promote proliferation of endometrial cancer cells. *PLoS.One.* 8:e68923. doi:10.1371/journal.pone.0068923 [doi];PONE-D-13-05900 [pii].
- Sudhakar, A., H. Sugimoto, C. Yang, J. Lively, M. Zeisberg, and R. Kalluri. 2003. Human tumstatin and human endostatin exhibit distinct antiangiogenic activities mediated by alpha v beta 3 and alpha 5 beta 1 integrins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100:4766-4771. doi:10.1073/pnas.0730882100 [doi];0730882100 [pii].
- Sugimoto, H., T. M. Mundel, M. W. Kieran, and R. Kalluri. 2006. Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer Biol.Ther.* 5:1640-1646. doi:3354 [pii].
- Sugimoto, N., T. Oida, K. Hirota, K. Nakamura, T. Nomura, T. Uchiyama, and S. Sakaguchi. 2006. Foxp3-dependent and -independent molecules specific for CD25+CD4+ natural regulatory T cells revealed by DNA microarray analysis. *Int.Immunol.* 18:1197-1209. doi:dxl060 [pii];10.1093/intimm/dxl060 [doi].
- Sullivan, N. J., A. K. Sasser, A. E. Axel, F. Vesuna, V. Raman, N. Ramirez, T. M. Oberyszyn, and B. M. Hall. 2009. Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells. *Oncogene* 28:2940-2947. doi:onc2009180 [pii];10.1038/onc.2009.180 [doi].
- Sun, C. M., J. A. Hall, R. B. Blank, N. Bouladoux, M. Oukka, J. R. Mora, and Y. Belkaid. 2007. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J.Exp.Med.* 204:1775-1785. doi:jem.20070602 [pii];10.1084/jem.20070602 [doi].
- Sun, J. C., M. A. Williams, and M. J. Bevan. 2004. CD4+ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8+ T cells after acute infection. *Nat.Immunol.* 5:927-933. doi:10.1038/ni1105 [doi];ni1105 [pii].
- Sundberg, C. and K. Rubin. 1996. Stimulation of beta1 integrins on fibroblasts induces PDGF independent tyrosine phosphorylation of PDGF beta-receptors. *J.Cell Biol.* 132:741-752.
- Suzuki, K., R. Sun, M. Origuchi, M. Kanehira, T. Takahata, J. Itoh, A. Umezawa, H. Kijima, S. Fukuda, and Y. Saijo. 2011. Mesenchymal stromal cells promote tumor growth through the enhancement of neovascularization. *Mol.Med.* 17:579-587. doi:molmed.2010.00157 [pii];10.2119/molmed.2010.00157 [doi].
- Swiercz, R., J. D. Wolfe, A. Zaher, and J. Jankun. 1998. Expression of the plasminogen activation system in kidney cancer correlates with its aggressive phenotype. *Clin.Cancer Res.* 4:869-877.
- Szabo, S. J., S. T. Kim, G. L. Costa, X. Zhang, C. G. Fathman, and L. H. Glimcher. 2000. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100:655-669. doi:S0092-8674(00)80702-3 [pii].
- Szajnik, M., M. Czystowska, M. J. Szczepanski, M. Mandapathil, and T. L. Whiteside. 2010. Tumor-derived microvesicles induce, expand and up-regulate biological activities of human regulatory T cells (Treg). *PLoS.One.* 5:e11469. doi:10.1371/journal.pone.0011469 [doi].
- Szanto, A., B. L. Balint, Z. S. Nagy, E. Barta, B. Dezsó, A. Pap, L. Szeles, S. Poliska, M. Oros, R. M. Evans, Y. Barak, J. Schwabe, and L. Nagy. 2010. STAT6 transcription factor is a facilitator of the nuclear receptor PPARgamma-regulated gene expression in macrophages and dendritic cells. *Immunity.* 33:699-712. doi:S1074-7613(10)00415-2 [pii];10.1016/j.immuni.2010.11.009 [doi].

- Tabata, T., S. Hazama, S. Yoshino, and M. Oka. 1999. Th2 subset dominance among peripheral blood T lymphocytes in patients with digestive cancers. *Am.J.Surg.* 177:203-208. doi:S0002-9610(99)00004-5 [pii].
- Tadokoro, S., S. J. Shattil, K. Eto, V. Tai, R. C. Liddington, J. M. de Pereda, M. H. Ginsberg, and D. A. Calderwood. 2003. Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science* 302:103-106. doi:10.1126/science.1086652 [doi];302/5642/103 [pii].
- Tai, X., M. Cowan, L. Feigenbaum, and A. Singer. 2005. CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nat.Immunol.* 6:152-162. doi:ni1160 [pii];10.1038/ni1160 [doi].
- Taipale, J. and J. Keski-Oja. 1997. Growth factors in the extracellular matrix. *FASEB J.* 11:51-59.
- Taipale, J., K. Miyazono, C. H. Heldin, and J. Keski-Oja. 1994. Latent transforming growth factor-beta 1 associates to fibroblast extracellular matrix via latent TGF-beta binding protein. *J.Cell Biol.* 124:171-181.
- Taipale, J., J. Saharinen, K. Hedman, and J. Keski-Oja. 1996. Latent transforming growth factor-beta 1 and its binding protein are components of extracellular matrix microfibrils. *J.Histochem.Cytochem.* 44:875-889.
- Takai, S., J. Schlom, J. Tucker, K. Y. Tsang, and J. W. Greiner. 2013. Inhibition of TGF-beta1 signaling promotes central memory T cell differentiation. *J.Immunol.* 191:2299-2307. doi:jimmunol.1300472 [pii];10.4049/jimmunol.1300472 [doi].
- Takaoka, A., H. Yanai, S. Kondo, G. Duncan, H. Negishi, T. Mizutani, S. Kano, K. Honda, Y. Ohba, T. W. Mak, and T. Taniguchi. 2005. Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* 434:243-249. doi:nature03308 [pii];10.1038/nature03308 [doi].
- Talts, J. F., G. Wirl, M. Dictor, W. J. Muller, and R. Fassler. 1999. Tenascin-C modulates tumor stroma and monocyte/macrophage recruitment but not tumor growth or metastasis in a mouse strain with spontaneous mammary cancer. *J.Cell Sci.* 112 ( Pt 12):1855-1864.
- Tam, E. M., C. J. Morrison, Y. I. Wu, M. S. Stack, and C. M. Overall. 2004. Membrane protease proteomics: Isotope-coded affinity tag MS identification of undescribed MT1-matrix metalloproteinase substrates. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101:6917-6922. doi:10.1073/pnas.0305862101 [doi];0305862101 [pii].
- Tan, M. C., P. S. Goedegebuure, B. A. Belt, B. Flaherty, N. Sankpal, W. E. Gillanders, T. J. Eberlein, C. S. Hsieh, and D. C. Linehan. 2009. Disruption of CCR5-dependent homing of regulatory T cells inhibits tumor growth in a murine model of pancreatic cancer. *J.Immunol.* 182:1746-1755. doi:182/3/1746 [pii].
- Tanaka, H., O. Shinto, M. Yashiro, S. Yamazoe, T. Iwauchi, K. Muguruma, N. Kubo, M. Ohira, and K. Hirakawa. 2010. Transforming growth factor beta signaling inhibitor, SB-431542, induces maturation of dendritic cells and enhances anti-tumor activity. *Oncol.Rep.* 24:1637-1643.
- Tao, H., Y. Mimura, K. Aoe, S. Kobayashi, H. Yamamoto, E. Matsuda, K. Okabe, T. Matsumoto, K. Sugi, and H. Ueoka. 2012. Prognostic potential of FOXP3 expression in non-small cell lung cancer cells combined with tumor-infiltrating regulatory T cells. *Lung Cancer* 75:95-101. doi:S0169-5002(11)00331-X [pii];10.1016/j.lungcan.2011.06.002 [doi].
- Taraban, V. Y., T. F. Rowley, and A. Al-Shamkhani. 2004. Cutting edge: a critical role for CD70 in CD8 T cell priming by CD40-licensed APCs. *J.Immunol.* 173:6542-6546. doi:173/11/6542 [pii].
- Tartar, D. M., A. M. VanMorlan, X. Wan, F. B. Guloglu, R. Jain, C. L. Haymaker, J. S. Ellis, C. M. Hoeman, J. A. Cascio, M. Dhakal, M. Oukka, and H. Zaghouni. 2010. FoxP3+RORgammat+ T helper intermediates display suppressive function against autoimmune diabetes. *J.Immunol.* 184:3377-3385. doi:jimmunol.0903324 [pii];10.4049/jimmunol.0903324 [doi].
- Tassi, E., F. Gavazzi, L. Albarello, V. Senyukov, R. Longhi, P. Dellabona, C. Doglioni, M. Braga, C. Di, V., and M. P. Protti. 2008. Carcinoembryonic antigen-specific but not antiviral CD4+ T cell immunity is impaired in pancreatic carcinoma patients. *J.Immunol.* 181:6595-6603. doi:181/9/6595 [pii].
- Tavakkol, A., J. T. Elder, C. E. Griffiths, K. D. Cooper, H. Talwar, G. J. Fisher, K. M. Keane, S. K. Foltin, and J. J. Voorhees. 1992. Expression of growth hormone receptor, insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and IGF-1 receptor mRNA and proteins in human skin. *J.Invest Dermatol.* 99:343-349.
- Taylor, K. R., K. Yamasaki, K. A. Radek, N. A. Di, H. Goodarzi, D. Golenbock, B. Beutler, and R. L. Gallo. 2007. Recognition of hyaluronan released in sterile injury involves a unique receptor complex dependent on Toll-like receptor 4, CD44, and MD-2. *J.Biol.Chem.* 282:18265-18275. doi:M606352200 [pii];10.1074/jbc.M606352200 [doi].
- Tekautz, T. M., K. Zhu, J. Grenet, D. Kaushal, V. J. Kidd, and J. M. Lahti. 2006. Evaluation of IFN-gamma effects on apoptosis and gene expression in neuroblastoma--preclinical studies. *Biochim.Biophys.Acta* 1763:1000-1010. doi:S0167-4889(06)00213-8 [pii];10.1016/j.bbamer.2006.06.014 [doi].
- Terabe, M., S. Matsui, J. M. Park, M. Mamura, N. Noben-Trauth, D. D. Donaldson, W. Chen, S. M. Wahl, S. Ledbetter, B. Pratt, J. J. Letterio, W. E. Paul, and J. A. Berzofsky. 2003. Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence. *J.Exp.Med.* 198:1741-1752. doi:10.1084/jem.20022227 [doi];jem.20022227 [pii].

- Termeer, C., F. Benedix, J. Sleeman, C. Fieber, U. Voith, T. Ahrens, K. Miyake, M. Freudenberg, C. Galanos, and J. C. Simon. 2002. Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J.Exp.Med.* 195:99-111.
- Termeer, C. C., J. Hennies, U. Voith, T. Ahrens, J. M. Weiss, P. Prehm, and J. C. Simon. 2000. Oligosaccharides of hyaluronan are potent activators of dendritic cells. *J.Immunol.* 165:1863-1870. doi:ji\_v165n4p1863 [pii].
- Teschendorff, A. E., S. Gomez, A. Arenas, D. El-Ashry, M. Schmidt, M. Gehrman, and C. Caldas. 2010. Improved prognostic classification of breast cancer defined by antagonistic activation patterns of immune response pathway modules. *BMC.Cancer* 10:604. doi:1471-2407-10-604 [pii];10.1186/1471-2407-10-604 [doi].
- Tester, A. M., J. H. Cox, A. R. Connor, A. E. Starr, R. A. Dean, X. S. Puente, C. Lopez-Otin, and C. M. Overall. 2007. LPS responsiveness and neutrophil chemotaxis in vivo require PMN MMP-8 activity. *PLoS.One.* 2:e312. doi:10.1371/journal.pone.0000312 [doi].
- Thaventhiran, J. E., D. T. Fearon, and L. Gattinoni. 2013. Transcriptional regulation of effector and memory CD8+ T cell fates. *Curr.Opin.Immunol.* 25:321-328. doi:S0952-7915(13)00080-0 [pii];10.1016/j.coi.2013.05.010 [doi].
- Thaventhiran, J. E., A. Hoffmann, L. Magiera, M. de la Roche, H. Lingel, M. Brunner-Weinzierl, and D. T. Fearon. 2012. Activation of the Hippo pathway by CTLA-4 regulates the expression of Blimp-1 in the CD8+ T cell. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 109:E2223-E2229. doi:1209115109 [pii];10.1073/pnas.1209115109 [doi].
- Thierfelder, W. E., J. M. van Deursen, K. Yamamoto, R. A. Tripp, S. R. Sarawar, R. T. Carson, M. Y. Sangster, D. A. Vignali, P. C. Doherty, G. C. Grosveld, and J. N. Ihle. 1996. Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature* 382:171-174. doi:10.1038/382171a0 [doi].
- Thomas, D. A. and J. Massague. 2005. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell* 8:369-380. doi:S1535-6108(05)00331-4 [pii];10.1016/j.ccr.2005.10.012 [doi].
- Thomas, R. M., N. Chunder, C. Chen, S. E. Umetsu, S. Winandy, and A. D. Wells. 2007. Ikaros enforces the costimulatory requirement for IL2 gene expression and is required for anergy induction in CD4+ T lymphocytes. *J.Immunol.* 179:7305-7315. doi:179/11/7305 [pii].
- Thornberry, N. A., H. G. Bull, J. R. Calaycay, K. T. Chapman, A. D. Howard, M. J. Kostura, D. K. Miller, S. M. Molineaux, J. R. Weidner, J. Aunins, and . 1992. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 356:768-774. doi:10.1038/356768a0 [doi].
- Thraillkill, K. M., L. D. Quarles, H. Nagase, K. Suzuki, D. M. Serra, and J. L. Fowlkes. 1995. Characterization of insulin-like growth factor-binding protein 5-degrading proteases produced throughout murine osteoblast differentiation. *Endocrinology* 136:3527-3533. doi:10.1210/endo.136.8.7543045 [doi].
- Thuault, S., U. Valcourt, M. Petersen, G. Manfioletti, C. H. Heldin, and A. Moustakas. 2006. Transforming growth factor-beta employs HMGA2 to elicit epithelial-mesenchymal transition. *J.Cell Biol.* 174:175-183. doi:jcb.200512110 [pii];10.1083/jcb.200512110 [doi].
- Tiemessen, M. M., A. L. Jagger, H. G. Evans, M. J. van Herwijnen, S. John, and L. S. Taams. 2007. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 104:19446-19451. doi:0706832104 [pii];10.1073/pnas.0706832104 [doi].
- Tinoco, R., V. Alcalde, Y. Yang, K. Sauer, and E. I. Zuniga. 2009. Cell-intrinsic transforming growth factor-beta signaling mediates virus-specific CD8+ T cell deletion and viral persistence in vivo. *Immunity.* 31:145-157. doi:S1074-7613(09)00288-X [pii];10.1016/j.immuni.2009.06.015 [doi].
- TODARO, G. J. and H. GREEN. 1963. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J.Cell Biol.* 17:299-313.
- Todaro, M., M. P. Alea, A. B. Di Stefano, P. Cammareri, L. Vermeulen, F. Iovino, C. Tripodo, A. Russo, G. Gulotta, J. P. Medema, and G. Stassi. 2007. Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4. *Cell Stem Cell* 1:389-402. doi:S1934-5909(07)00118-X [pii];10.1016/j.stem.2007.08.001 [doi].
- Todaro, M., Y. Lombardo, M. G. Francipane, M. P. Alea, P. Cammareri, F. Iovino, A. B. Di Stefano, B. C. Di, A. Agrusa, G. Condorelli, H. Walczak, and G. Stassi. 2008. Apoptosis resistance in epithelial tumors is mediated by tumor-cell-derived interleukin-4. *Cell Death.Differ.* 15:762-772. doi:4402305 [pii];10.1038/sj.cdd.4402305 [doi].
- Tone, Y., K. Furuuchi, Y. Kojima, M. L. Tykocinski, M. I. Greene, and M. Tone. 2008. Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nat.Immunol.* 9:194-202. doi:ni1549 [pii];10.1038/ni1549 [doi].
- Tong, Z., X. O. Yang, H. Yan, W. Liu, X. Niu, Y. Shi, W. Fang, B. Xiong, Y. Wan, and C. Dong. 2012. A protective role by interleukin-17F in colon tumorigenesis. *PLoS.One.* 7:e34959. doi:10.1371/journal.pone.0034959 [doi];PONE-D-11-11768 [pii].
- Topp, W. C. 1981. Normal rat cell lines deficient in nuclear thymidine kinase. *Virology* 113:408-411.
- Tosolini, M., A. Kirilovsky, B. Mlecnik, T. Fredriksen, S. Mauger, G. Bindea, A. Berger, P. Bruneval, W. H. Fridman, F. Pages, and J. Galon. 2011. Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Res.* 71:1263-1271. doi:0008-5472.CAN-10-2907 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-10-2907 [doi].

- Trautmann, A. 2009. Extracellular ATP in the immune system: more than just a "danger signal". *Sci.Signal.* 2:e6. doi:scisignal.256pe6 [pii];10.1126/scisignal.256pe6 [doi].
- Traversari, C., R. Meazza, M. Coppolecchia, S. Basso, A. Verrecchia, P. van der Bruggen, A. Ardizzoni, A. Gaggero, and S. Ferrini. 1997. IFN-gamma gene transfer restores HLA-class I expression and MAGE-3 antigen presentation to CTL in HLA-deficient small cell lung cancer. *Gene Ther.* 4:1029-1035. doi:10.1038/sj.gt.3300489 [doi].
- Tripathi, P. and S. Agrawal. 2006. Non-classical HLA-G antigen and its role in the cancer progression. *Cancer Invest* 24:178-186. doi:WUV2813435701733 [pii];10.1080/07357900500524579 [doi].
- Trivedy, C., K. A. Warnakulasuriya, V. K. Hazarey, M. Tavassoli, P. Sommer, and N. W. Johnson. 1999. The upregulation of lysyl oxidase in oral submucous fibrosis and squamous cell carcinoma. *J.Oral Pathol.Med.* 28:246-251.
- Tsai, K. S., S. H. Yang, Y. P. Lei, C. C. Tsai, H. W. Chen, C. Y. Hsu, L. L. Chen, H. W. Wang, S. A. Miller, S. H. Chiou, M. C. Hung, and S. C. Hung. 2011. Mesenchymal stem cells promote formation of colorectal tumors in mice. *Gastroenterology* 141:1046-1056. doi:S0016-5085(11)00748-7 [pii];10.1053/j.gastro.2011.05.045 [doi].
- Tsuji, K., T. Nakahata, M. Takagi, T. Kobayashi, A. Ishiguro, T. Kikuchi, K. Naganuma, K. Koike, A. Miyajima, K. Arai, and . 1990. Effects of interleukin-3 and interleukin-4 on the development of "connective tissue-type" mast cells: interleukin-3 supports their survival and interleukin-4 triggers and supports their proliferation synergistically with interleukin-3. *Blood* 75:421-427.
- Tsuyada, A., A. Chow, J. Wu, G. Somlo, P. Chu, S. Loera, T. Luu, A. X. Li, X. Wu, W. Ye, S. Chen, W. Zhou, Y. Yu, Y. Z. Wang, X. Ren, H. Li, P. Scherle, Y. Kuroki, and S. E. Wang. 2012. CCL2 mediates cross-talk between cancer cells and stromal fibroblasts that regulates breast cancer stem cells. *Cancer Res.* 72:2768-2779. doi:0008-5472.CAN-11-3567 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-11-3567 [doi].
- Tufvesson, E. and G. Westergren-Thorsson. 2002. Tumour necrosis factor-alpha interacts with biglycan and decorin. *FEBS Lett.* 530:124-128. doi:S0014579302034397 [pii].
- Tugal, D., X. Liao, and M. K. Jain. 2013. Transcriptional control of macrophage polarization. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*33:1135-1144.doi:ATVBAHA.113.301453 [pii];10.1161/ATVBAHA.113.301453 [doi].
- Tunayaplin, C., A. L. Shaffer, C. D. Angelin-Duclos, X. Yu, L. M. Staudt, and K. L. Calame. 2004. Direct repression of *prdm1* by *Bcl-6* inhibits plasmacytic differentiation. *J.Immunol.* 173:1158-1165.
- Ubukata, H., G. Motohashi, T. Tabuchi, H. Nagata, S. Konishi, and T. Tabuchi. 2010. Evaluations of interferon-gamma/interleukin-4 ratio and neutrophil/lymphocyte ratio as prognostic indicators in gastric cancer patients. *J.Surg.Oncol.* 102:742-747. doi:10.1002/jso.21725 [doi].
- Ulich, T. R., C. J. del, and K. Z. Guo. 1989. In vivo hematologic effects of recombinant interleukin-6 on hematopoiesis and circulating numbers of RBCs and WBCs. *Blood* 73:108-110.
- Ulrich, T. A., E. M. de Juan Pardo, and S. Kumar. 2009. The mechanical rigidity of the extracellular matrix regulates the structure, motility, and proliferation of glioma cells. *Cancer Res.* 69:4167-4174. doi:0008-5472.CAN-08-4859 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-08-4859 [doi].
- Usui, T., R. Nishikomori, A. Kitani, and W. Strober. 2003. GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12Rbeta2 chain or T-bet. *Immunity.* 18:415-428. doi:S1074761303000578 [pii].
- Usui, T., J. C. Preiss, Y. Kanno, Z. J. Yao, J. H. Bream, J. J. O'Shea, and W. Strober. 2006. T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFNG gene acetylation and transcription. *J.Exp.Med.* 203:755-766. doi:jem.20052165 [pii];10.1084/jem.20052165 [doi].
- Vaeth, M., T. Gogishvili, T. Bopp, M. Klein, F. Berberich-Siebelt, S. Gattenloehner, A. Avots, T. Sparwasser, N. Grebe, E. Schmitt, T. Hunig, E. Serfling, and J. Bodor. 2011. Regulatory T cells facilitate the nuclear accumulation of inducible cAMP early repressor (ICER) and suppress nuclear factor of activated T cell c1 (NFATc1). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 108:2480-2485. doi:1009463108 [pii];10.1073/pnas.1009463108 [doi].
- Vaeth, M., U. Schliesser, G. Muller, S. Reissig, K. Satoh, A. Tuettenberg, H. Jonuleit, A. Waisman, M. R. Muller, E. Serfling, B. S. Sawitzki, and F. Berberich-Siebelt. 2012. Dependence on nuclear factor of activated T-cells (NFAT) levels discriminates conventional T cells from Foxp3+ regulatory T cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 109:16258-16263. doi:1203870109 [pii];10.1073/pnas.1203870109 [doi].
- Valmori, D., C. Raffin, I. Raimbaud, and M. Ayyoub. 2010. Human RORgammat+ TH17 cells preferentially differentiate from naive FOXP3+Treg in the presence of lineage-specific polarizing factors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 107:19402-19407. doi:1008247107 [pii];10.1073/pnas.1008247107 [doi].
- Valzasina, B., S. Piconese, C. Guiducci, and M. P. Colombo. 2006. Tumor-induced expansion of regulatory T cells by conversion of CD4+CD25- lymphocytes is thymus and proliferation independent. *Cancer Res.* 66:4488-4495. doi:66/8/4488 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-05-4217 [doi].

- van Beelen, A. J., Z. Zelinkova, E. W. Taanman-Kueter, F. J. Muller, D. W. Hommes, S. A. Zaat, M. L. Kapsenberg, and E. C. de Jong. 2007. Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells. *Immunity*. 27:660-669. doi:S1074-7613(07)00443-8 [pii];10.1016/j.immuni.2007.08.013 [doi].
- Van Den Steen, P. E., P. Proost, A. Wuyts, D. J. Van, and G. Opdenakker. 2000. Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood* 96:2673-2681.
- Van Den Steen, P. E., A. Wuyts, S. J. Husson, P. Proost, D. J. Van, and G. Opdenakker. 2003. Gelatinase B/MMP-9 and neutrophil collagenase/MMP-8 process the chemokines human GCP-2/CXCL6, ENA-78/CXCL5 and mouse GCP-2/LIX and modulate their physiological activities. *Eur.J.Biochem*. 270:3739-3749. doi:3760 [pii].
- van der Vuurst de Vries AR, H. Clevers, T. Logtenberg, and L. Meyaard. 1999. Leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor-1 (LAIR-1) is differentially expressed during human B cell differentiation and inhibits B cell receptor-mediated signaling. *Eur.J.Immunol*. 29:3160-3167. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199910)29:10<3160::AID-IMMU3160>3.0.CO;2-S [pii];10.1002/(SICI)1521-4141(199910)29:10<#60;3160::AID-IMMU3160>3.0.CO;2-S [doi].
- Van Deusen, K. E., R. Rajapakse, and T. N. Bullock. 2010. CD70 expression by dendritic cells plays a critical role in the immunogenicity of CD40-independent, CD4+ T cell-dependent, licensed CD8+ T cell responses. *J.Leukoc.Biol*. 87:477-485. doi:jl.b.0809535 [pii];10.1189/jlb.0809535 [doi].
- Vandenbroucke, R. E., E. Dejonckheere, H. F. Van, S. Lodens, R. R. De, W. E. Van, A. Staes, K. Gevaert, C. Lopez-Otin, and C. Libert. 2013. Matrix metalloproteinase 13 modulates intestinal epithelial barrier integrity in inflammatory diseases by activating TNF. *EMBO Mol.Med*. 5:932-948. doi:10.1002/emmm.201202100 [doi].
- Vang, K. B., J. Yang, S. A. Mahmud, M. A. Burchill, A. L. Vegoe, and M. A. Farrar. 2008. IL-2, -7, and -15, but not thymic stromal lymphopoeitin, redundantly govern CD4+Foxp3+ regulatory T cell development. *J.Immunol*. 181:3285-3290. doi:181/5/3285 [pii].
- Vaughan, M. B., E. W. Howard, and J. J. Tomasek. 2000. Transforming growth factor-beta1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast. *Exp.Cell Res*. 257:180-189. doi:S0014-4827(00)94869-9 [pii];10.1006/excr.2000.4869 [doi].
- Veldhoen, M., R. J. Hocking, C. J. Atkins, R. M. Locksley, and B. Stockinger. 2006. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. 24:179-189. doi:S1074-7613(06)00004-5 [pii];10.1016/j.immuni.2006.01.001 [doi].
- Venet, F., A. Pachot, A. L. Debard, J. Bohe, J. Bienvenu, A. Lepape, W. S. Powell, and G. Monneret. 2006. Human CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes inhibit lipopolysaccharide-induced monocyte survival through a Fas/Fas ligand-dependent mechanism. *J.Immunol*. 177:6540-6547. doi:177/9/6540 [pii].
- Verona, E. V., A. G. Elkahlon, J. Yang, A. Bandyopadhyay, I. T. Yeh, and L. Z. Sun. 2007. Transforming growth factor-beta signaling in prostate stromal cells supports prostate carcinoma growth by up-regulating stromal genes related to tissue remodeling. *Cancer Res*. 67:5737-5746. doi:67/12/5737 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-07-0444 [doi].
- Verreck, F. A., B. T. de, D. M. Langenberg, M. A. Hoeve, M. Kramer, E. Vaisberg, R. Kastelein, A. Kolk, R. de Waal-Malefyt, and T. H. Ottenhoff. 2004. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101:4560-4565. doi:10.1073/pnas.0400983101 [doi];0400983101 [pii].
- Vieira, P. L., E. C. de Jong, E. A. Wierenga, M. L. Kapsenberg, and P. Kalinski. 2000. Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction. *J.Immunol*. 164:4507-4512. doi:ji\_v164n9p4507 [pii].
- Vishvakarma, N. K. and S. M. Singh. 2010. Immunopotentiating effect of proton pump inhibitor pantoprazole in a lymphoma-bearing murine host: Implication in antitumor activation of tumor-associated macrophages. *Immunol.Lett*. 134:83-92. doi:S0165-2478(10)00222-1 [pii];10.1016/j.imlet.2010.09.002 [doi].
- von Mensdorff-Pouilly, S., A. A. Verstraeten, P. Kenemans, F. G. Snijdwint, A. Kok, G. J. Van Kamp, M. A. Paul, P. J. Van Diest, S. Meijer, and J. Hilgers. 2000. Survival in early breast cancer patients is favorably influenced by a natural humoral immune response to polymorphic epithelial mucin. *J.Clin.Oncol*. 18:574-583.
- Waldhauer, I., D. Goehlsdorf, F. Gieseke, T. Weinschenk, M. Wittenbrink, A. Ludwig, S. Stevanovic, H. G. Rammensee, and A. Steinle. 2008. Tumor-associated MICA is shed by ADAM proteases. *Cancer Res*. 68:6368-6376. doi:68/15/6368 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-07-6768 [doi].
- Waldhauer, I. and A. Steinle. 2006. Proteolytic release of soluble UL16-binding protein 2 from tumor cells. *Cancer Res*. 66:2520-2526. doi:66/5/2520 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-05-2520 [doi].
- Wang, B., Q. Li, L. Qin, S. Zhao, J. Wang, and X. Chen. 2011. Transition of tumor-associated macrophages from MHC class II(hi) to MHC class II(low) mediates tumor progression in mice. *BMC.Immunol*. 12:43. doi:1471-2172-12-43 [pii];10.1186/1471-2172-12-43 [doi].

- Wang, B., J. Sun, S. Kitamoto, M. Yang, A. Grubb, H. A. Chapman, R. Kalluri, and G. P. Shi. 2006. Cathepsin S controls angiogenesis and tumor growth via matrix-derived angiogenic factors. *J.Biol.Chem.* 281:6020-6029. doi:M509134200 [pii];10.1074/jbc.M509134200 [doi].
- Wang, H. B., M. Dembo, S. K. Hanks, and Y. Wang. 2001. Focal adhesion kinase is involved in mechanosensing during fibroblast migration. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98:11295-11300. doi:10.1073/pnas.201201198 [doi];98/20/11295 [pii].
- Wang, J., A. Ioan-Facsinay, E. I. van der Voort, T. W. Huizinga, and R. E. Toes. 2007. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. *Eur.J.Immunol.* 37:129-138. doi:10.1002/eji.200636435 [doi].
- Wang, L., S. Chen, M. Zhang, N. Li, Y. Chen, W. Su, Y. Liu, D. Lu, S. Li, Y. Yang, Z. Li, D. Stupack, P. Qu, H. Hu, and R. Xiang. 2012. Legumain: a biomarker for diagnosis and prognosis of human ovarian cancer. *J.Cell Biochem.* 113:2679-2686. doi:10.1002/jcb.24143 [doi].
- Wang, L., K. Pino-Lagos, V. C. de Vries, I. Guleria, M. H. Sayegh, and R. J. Noelle. 2008. Programmed death 1 ligand signaling regulates the generation of adaptive Foxp3+CD4+ regulatory T cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 105:9331-9336. doi:0710441105 [pii];10.1073/pnas.0710441105 [doi].
- Wang, L., T. Yi, M. Kortylewski, D. M. Pardoll, D. Zeng, and H. Yu. 2009. IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway. *J.Exp.Med.* 206:1457-1464. doi:jem.20090207 [pii];10.1084/jem.20090207 [doi].
- Wang, L., T. Yi, W. Zhang, D. M. Pardoll, and H. Yu. 2010. IL-17 enhances tumor development in carcinogen-induced skin cancer. *Cancer Res.* 70:10112-10120. doi:70/24/10112 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-10-0775 [doi].
- Wang, Y., J. Godec, K. Ben-Aissa, K. Cui, K. Zhao, A. B. Pucsek, Y. K. Lee, C. T. Weaver, R. Yagi, and V. Lazarevic. 2014. The transcription factors T-bet and Runx are required for the ontogeny of pathogenic interferon-gamma-producing T helper 17 cells. *Immunity.* 40:355-366. doi:S1074-7613(14)00028-4 [pii];10.1016/j.immuni.2014.01.002 [doi].
- Wang, Y. and M. A. McNiven. 2012. Invasive matrix degradation at focal adhesions occurs via protease recruitment by a FAK-p130Cas complex. *J.Cell Biol.* 196:375-385. doi:jcb.201105153 [pii];10.1083/jcb.201105153 [doi].
- Wasiuk, A., D. K. Dalton, W. L. Schpero, R. V. Stan, J. R. Conejo-Garcia, and R. J. Noelle. 2012. Mast cells impair the development of protective anti-tumor immunity. *Cancer Immunol.Immunother.* 61:2273-2282. doi:10.1007/s00262-012-1276-7 [doi].
- Waters, J. P., J. S. Pober, and J. R. Bradley. 2013. Tumour necrosis factor and cancer. *J.Pathol.* 230:241-248. doi:10.1002/path.4188 [doi].
- Watkins, S. K., N. K. Egilmez, J. Suttles, and R. D. Stout. 2007. IL-12 rapidly alters the functional profile of tumor-associated and tumor-infiltrating macrophages in vitro and in vivo. *J.Immunol.* 178:1357-1362. doi:178/3/1357 [pii].
- Weathington, N. M., A. H. van Houwelingen, B. D. Noerager, P. L. Jackson, A. D. Kraneveld, F. S. Galin, G. Folkerts, F. P. Nijkamp, and J. E. Blalock. 2006. A novel peptide CXCR ligand derived from extracellular matrix degradation during airway inflammation. *Nat.Med.* 12:317-323. doi:nm1361 [pii];10.1038/nm1361 [doi].
- Webb, D. J., K. Donais, L. A. Whitmore, S. M. Thomas, C. E. Turner, J. T. Parsons, and A. F. Horwitz. 2004. FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat.Cell Biol.* 6:154-161. doi:10.1038/ncb1094 [doi];ncb1094 [pii].
- Weber, F., S. N. Byrne, S. Le, D. A. Brown, S. N. Breit, R. A. Scolyer, and G. M. Halliday. 2005. Transforming growth factor-beta1 immobilises dendritic cells within skin tumours and facilitates tumour escape from the immune system. *Cancer Immunol.Immunother.* 54:898-906. doi:10.1007/s00262-004-0652-3 [doi].
- Wei, S., I. Kryczek, R. P. Edwards, L. Zou, W. Szeliga, M. Banerjee, M. Cost, P. Cheng, A. Chang, B. Redman, R. B. Herberman, and W. Zou. 2007. Interleukin-2 administration alters the CD4+FOXP3+ T-cell pool and tumor trafficking in patients with ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 67:7487-7494. doi:67/15/7487 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-07-0565 [doi].
- Weigelin, B., M. Krause, and P. Friedl. 2011. Cytotoxic T lymphocyte migration and effector function in the tumor microenvironment. *Immunol.Lett.* 138:19-21. doi:S0165-2478(11)00056-3 [pii];10.1016/j.imlet.2011.02.016 [doi].
- Weiss, J. M., A. M. Bilate, M. Gobert, Y. Ding, M. A. Curotto de Lafaille, C. N. Parkhurst, H. Xiong, J. Dolpady, A. B. Frey, M. G. Ruocco, Y. Yang, S. Floess, J. Huehn, S. Oh, M. O. Li, R. E. Niec, A. Y. Rudensky, M. L. Dustin, D. R. Littman, and J. J. Lafaille. 2012. Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3+ T reg cells. *J.Exp.Med.* 209:1723-42, S1. doi:jem.20120914 [pii];10.1084/jem.20120914 [doi].
- Wells, A. D. 2009. New insights into the molecular basis of T cell anergy: anergy factors, avoidance sensors, and epigenetic imprinting. *J.Immunol.* 182:7331-7341. doi:182/12/7331 [pii];10.4049/jimmunol.0803917 [doi].
- Wendt, M. K., N. Balanis, C. R. Carlin, and W. P. Schiemann. 2014. STAT3 and epithelial-mesenchymal transitions in carcinomas. *JAKSTAT.* 3:e28975. doi:10.4161/jkst.28975 [doi];2013JAKS0151R [pii].

- Werno, C., H. Menrad, A. Weigert, N. Dehne, S. Goerdts, K. Schledzewski, J. Kzhyshkowska, and B. Brune. 2010. Knockout of HIF-1 $\alpha$  in tumor-associated macrophages enhances M2 polarization and attenuates their pro-angiogenic responses. *Carcinogenesis* 31:1863-1872. doi:10.1093/carcin/bgq088 [pii];10.1093/carcin/bgq088 [doi].
- Weroha, S. J. and P. Haluska. 2012. The insulin-like growth factor system in cancer. *Endocrinol.Metab Clin.North Am.* 41:335-50, vi. doi:S0889-8529(12)00036-9 [pii];10.1016/j.ecl.2012.04.014 [doi].
- Wherry, E. J. 2011. T cell exhaustion. *Nat.Immunol.* 12:492-499.
- Wieckowski, E. U., C. Visus, M. Szajnik, M. J. Szczepanski, W. J. Storkus, and T. L. Whiteside. 2009. Tumor-derived microvesicles promote regulatory T cell expansion and induce apoptosis in tumor-reactive activated CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *J.Immunol.* 183:3720-3730. doi:jimmunol.0900970 [pii];10.4049/jimmunol.0900970 [doi].
- Wiegering, V., M. Eyrich, S. Rutkowski, M. Wolfl, P. G. Schlegel, and B. Winkler. 2011. TH1 predominance is associated with improved survival in pediatric medulloblastoma patients. *Cancer Immunol.Immunother.* 60:693-703. doi:10.1007/s00262-011-0981-y [doi].
- Williams, M. A., A. J. Tzysnik, and M. J. Bevan. 2006. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8<sup>+</sup> memory T cells. *Nature* 441:890-893. doi:nature04790 [pii];10.1038/nature04790 [doi].
- Willis, C. D., C. Poluzzi, M. Mongiat, and R. V. Iozzo. 2013. Endorepellin laminin-like globular 1/2 domains bind Ig3-5 of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor 2 and block pro-angiogenic signaling by VEGFA in endothelial cells. *FEBS J.* 280:2271-2284. doi:10.1111/febs.12164 [doi].
- Wilson, J. M., W. G. Ross, O. N. Agbai, R. Frazier, R. A. Figler, J. Rieger, J. Linden, and P. B. Ernst. 2009. The A2B adenosine receptor impairs the maturation and immunogenicity of dendritic cells. *J.Immunol.* 182:4616-4623. doi:182/8/4616 [pii];10.4049/jimmunol.0801279 [doi].
- Wingender, G., N. Garbi, B. Schumak, F. Jungerkes, E. Endl, B. D. von, J. Steitz, J. Striegler, G. Moldenhauer, T. Tuting, A. Heit, K. M. Huster, O. Takikawa, S. Akira, D. H. Busch, H. Wagner, G. J. Hammerling, P. A. Knolle, and A. Limmer. 2006. Systemic application of CpG-rich DNA suppresses adaptive T cell immunity via induction of IDO. *Eur.J.Immunol.* 36:12-20. doi:10.1002/eji.200535602 [doi].
- Wolf, K., I. Mazo, H. Leung, K. Engelke, U. H. von Andrian, E. I. Deryugina, A. Y. Strongin, E. B. Brocker, and P. Friedl. 2003. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J.Cell Biol.* 160:267-277. doi:10.1083/jcb.200209006 [doi];jcb.200209006 [pii].
- Wolf, K., L. M. Te, M. Krause, S. Alexander, R. J. Te, A. L. Willis, R. M. Hoffman, C. G. Figdor, S. J. Weiss, and P. Friedl. 2013. Physical limits of cell migration: control by ECM space and nuclear deformation and tuning by proteolysis and traction force. *J.Cell Biol.* 201:1069-1084. doi:jcb.201210152 [pii];10.1083/jcb.201210152 [doi].
- Wolf, K., Y. I. Wu, Y. Liu, J. Geiger, E. Tam, C. Overall, M. S. Stack, and P. Friedl. 2007. Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion. *Nat.Cell Biol.* 9:893-904. doi:ncb1616 [pii];10.1038/ncb1616 [doi].
- Wolfsberg, T. G., P. D. Straight, R. L. Gerena, A. P. Huovila, P. Primakoff, D. G. Myles, and J. M. White. 1995. ADAM, a widely distributed and developmentally regulated gene family encoding membrane proteins with a disintegrin and metalloprotease domain. *Dev.Biol.* 169:378-383. doi:S0012-1606(85)71152-9 [pii];10.1006/dbio.1995.1152 [doi].
- Wortzman, M. E., D. L. Clouthier, A. J. McPherson, G. H. Lin, and T. H. Watts. 2013. The contextual role of TNFR family members in CD8(+) T-cell control of viral infections. *Immunol.Rev.* 255:125-148. doi:10.1111/immr.12086 [doi].
- Wu, C., X. Liu, Y. Wang, H. Tian, Y. Xie, Q. Li, X. Zhang, and F. Liu. 2013. Insulin-like factor binding protein-3 promotes the G1 cell cycle arrest in several cancer cell lines. *Gene* 512:127-133. doi:S0378-1119(12)01189-4 [pii];10.1016/j.gene.2012.09.080 [doi].
- Wu, W., J. Huang, B. Duan, D. C. Traficante, H. Hong, M. Risech, S. Lory, and G. P. Priebe. 2012. Th17-stimulating protein vaccines confer protection against *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 186:420-427. doi:rccm.201202-0182OC [pii];10.1164/rccm.201202-0182OC [doi].
- Wu, Y., M. Borde, V. Heissmeyer, M. Feuerer, A. D. Lapan, J. C. Stroud, D. L. Bates, L. Guo, A. Han, S. F. Ziegler, D. Mathis, C. Benoist, L. Chen, and A. Rao. 2006. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell* 126:375-387. doi:S0092-8674(06)00815-4 [pii];10.1016/j.cell.2006.05.042 [doi].
- Wu, Y., J. Deng, P. G. Rychahou, S. Qiu, B. M. Evers, and B. P. Zhou. 2009. Stabilization of snail by NF- $\kappa$ B is required for inflammation-induced cell migration and invasion. *Cancer Cell* 15:416-428. doi:S1535-6108(09)00085-3 [pii];10.1016/j.ccr.2009.03.016 [doi].
- Wuthrich, M., B. Gern, C. Y. Hung, K. Ersland, N. Rocco, J. Pick-Jacobs, K. Galles, H. Filutowicz, T. Warner, M. Evans, G. Cole, and B. Klein. 2011. Vaccine-induced protection against 3 systemic mycoses endemic to North America requires Th17 cells in mice. *J.Clin.Invest* 121:554-568. doi:43984 [pii];10.1172/JCI43984 [doi].

- Wyckoff, J., W. Wang, E. Y. Lin, Y. Wang, F. Pixley, E. R. Stanley, T. Graf, J. W. Pollard, J. Segall, and J. Condeelis. 2004. A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer Res.* 64:7022-7029. doi:64/19/7022 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-04-1449 [doi].
- Wyckoff, J. B., S. E. Pinner, S. Gschmeissner, J. S. Condeelis, and E. Sahai. 2006. ROCK- and Myosin-Dependent Matrix Deformation Enables Protease-Independent Tumor-Cell Invasion In Vivo. *Curr.Biol.* 16:1515-1523. doi:S0960-9822(06)01724-6 [pii];10.1016/j.cub.2006.05.065 [doi].
- Wyckoff, J. B., Y. Wang, E. Y. Lin, J. F. Li, S. Goswami, E. R. Stanley, J. E. Segall, J. W. Pollard, and J. Condeelis. 2007. Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. *Cancer Res.* 67:2649-2656. doi:67/6/2649 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-06-1823 [doi].
- Wynes, M. W. and D. W. Riches. 2003. Induction of macrophage insulin-like growth factor-I expression by the Th2 cytokines IL-4 and IL-13. *J.Immunol.* 171:3550-3559.
- Wynn, T. A., A. Chawla, and J. W. Pollard. 2013. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 496:445-455. doi:nature12034 [pii];10.1038/nature12034 [doi].
- Xiao, X., S. Balasubramanian, W. Liu, X. Chu, H. Wang, E. J. Taparowsky, Y. X. Fu, Y. Choi, M. C. Walsh, and X. C. Li. 2012. OX40 signaling favors the induction of T(H)9 cells and airway inflammation. *Nat.Immunol.* 13:981-990. doi:ni.2390 [pii];10.1038/ni.2390 [doi].
- Xie, D. L., R. Meyers, and G. A. Homandberg. 1993. Release of elastase from monocytes adherent to a fibronectin-gelatin surface. *Blood* 81:186-192.
- Xu, J., D. Rodriguez, E. Petitclerc, J. J. Kim, M. Hangai, Y. S. Moon, G. E. Davis, and P. C. Brooks. 2001. Proteolytic exposure of a cryptic site within collagen type IV is required for angiogenesis and tumor growth in vivo. *J.Cell Biol.* 154:1069-1079. doi:10.1083/jcb.200103111 [doi];154/5/1069 [pii].
- Xu, L., A. Kitani, C. Stuelten, G. McGrady, I. Fuss, and W. Strober. 2010. Positive and negative transcriptional regulation of the Foxp3 gene is mediated by access and binding of the Smad3 protein to enhancer I. *Immunity.* 33:313-325. doi:S1074-7613(10)00324-9 [pii];10.1016/j.immuni.2010.09.001 [doi].
- Xu, R., Z. Y. Yao, L. Xin, Q. Zhang, T. P. Li, and R. B. Gan. 2001. NC1 domain of human type VIII collagen (alpha 1) inhibits bovine aortic endothelial cell proliferation and causes cell apoptosis. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 289:264-268. doi:10.1006/bbrc.2001.5970 [doi];S0006-291X(01)95970-4 [pii].
- Xu, W. T., Z. Y. Bian, Q. M. Fan, G. Li, and T. T. Tang. 2009. Human mesenchymal stem cells (hMSCs) target osteosarcoma and promote its growth and pulmonary metastasis. *Cancer Lett.* 281:32-41. doi:S0304-3835(09)00123-2 [pii];10.1016/j.canlet.2009.02.022 [doi].
- Yadav, A., B. Kumar, J. Datta, T. N. Teknos, and P. Kumar. 2011. IL-6 promotes head and neck tumor metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition via the JAK-STAT3-SNAIL signaling pathway. *Mol.Cancer Res.* 9:1658-1667. doi:1541-7786.MCR-11-0271 [pii];10.1158/1541-7786.MCR-11-0271 [doi].
- Yadav, M., C. Louvet, D. Davini, J. M. Gardner, M. Martinez-Llordella, S. Bailey-Bucktrout, B. A. Anthony, F. M. Sverdrup, R. Head, D. J. Kuster, P. Ruminski, D. Weiss, S. D. Von, and J. A. Bluestone. 2012. Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. *J.Exp.Med.* 209:1713-1719. doi:jem.20120822 [pii];10.1084/jem.20120822 [doi].
- Yagi, R., I. S. Junttila, G. Wei, J. F. Urban, Jr., K. Zhao, W. E. Paul, and J. Zhu. 2010. The transcription factor GATA3 actively represses RUNX3 protein-regulated production of interferon-gamma. *Immunity.* 32:507-517. doi:S1074-7613(10)00129-9 [pii];10.1016/j.immuni.2010.04.004 [doi].
- Yamada, P. M. and K. W. Lee. 2009. Perspectives in mammalian IGFBP-3 biology: local vs. systemic action. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 296:C954-C976. doi:00598.2008 [pii];10.1152/ajpcell.00598.2008 [doi].
- Yamagiwa, S., J. D. Gray, S. Hashimoto, and D. A. Horwitz. 2001. A role for TGF-beta in the generation and expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells from human peripheral blood. *J.Immunol.* 166:7282-7289.
- Yamaguchi, Y., Y. Hayashi, Y. Sugama, Y. Miura, T. Kasahara, S. Kitamura, M. Torisu, S. Mita, A. Tominaga, and K. Takatsu. 1988. Highly purified murine interleukin 5 (IL-5) stimulates eosinophil function and prolongs in vitro survival. IL-5 as an eosinophil chemotactic factor. *J.Exp.Med.* 167:1737-1742.
- Yamaguchi, Y., T. Suda, S. Ohta, K. Tominaga, Y. Miura, and T. Kasahara. 1991. Analysis of the survival of mature human eosinophils: interleukin-5 prevents apoptosis in mature human eosinophils. *Blood* 78:2542-2547.
- Yamanaka, Y., J. L. Fowlkes, E. M. Wilson, R. G. Rosenfeld, and Y. Oh. 1999. Characterization of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) binding to human breast cancer cells: kinetics of IGFBP-3 binding and identification of receptor binding domain on the IGFBP-3 molecule. *Endocrinology* 140:1319-1328. doi:10.1210/endo.140.3.6566 [doi].
- Yang, C. Y., J. A. Best, J. Knell, E. Yang, A. D. Sheridan, A. K. Jesionek, H. S. Li, R. R. Rivera, K. C. Lind, L. M. D'Cruz, S. S. Watowich, C. Murre, and A. W. Goldrath. 2011. The transcriptional regulators Id2 and Id3 control the formation of distinct memory CD8+ T cell subsets. *Nat.Immunol.* 12:1221-1229. doi:ni.2158 [pii];10.1038/ni.2158 [doi].

- Yang, J., D. Liao, C. Chen, Y. Liu, T. H. Chuang, R. Xiang, D. Markowitz, R. A. Reisfeld, and Y. Luo. 2013. Tumor-associated macrophages regulate murine breast cancer stem cells through a novel paracrine EGFR/Stat3/Sox-2 signaling pathway. *Stem Cells* 31:248-258. doi:10.1002/stem.1281 [doi].
- Yang, J., Y. Lin, Z. Guo, J. Cheng, J. Huang, L. Deng, W. Liao, Z. Chen, Z. Liu, and B. Su. 2001. The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF-kappaB activation. *Nat.Immunol.* 2:620-624. doi:10.1038/89769 [doi];89769 [pii].
- Yang, M., C. Ma, S. Liu, J. Sun, Q. Shao, W. Gao, Y. Zhang, Z. Li, Q. Xie, Z. Dong, and X. Qu. 2009. Hypoxia skews dendritic cells to a T helper type 2-stimulating phenotype and promotes tumour cell migration by dendritic cell-derived osteopontin. *Immunology* 128:e237-e249. doi:IMM2954 [pii];10.1111/j.1365-2567.2008.02954.x [doi].
- Yang, X. O., P. Angkasekwinai, J. Zhu, J. Peng, Z. Liu, R. Nurieva, X. Liu, Y. Chung, S. H. Chang, B. Sun, and C. Dong. 2009. Requirement for the basic helix-loop-helix transcription factor Dec2 in initial TH2 lineage commitment. *Nat.Immunol.* 10:1260-1266. doi:ni.1821 [pii];10.1038/ni.1821 [doi].
- Yang, X. O., A. D. Panopoulos, R. Nurieva, S. H. Chang, D. Wang, S. S. Watowich, and C. Dong. 2007. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J.Biol.Chem.* 282:9358-9363. doi:C600321200 [pii];10.1074/jbc.C600321200 [doi].
- Yang, X. O., B. P. Pappu, R. Nurieva, A. Akimzhanov, H. S. Kang, Y. Chung, L. Ma, B. Shah, A. D. Panopoulos, K. S. Schluns, S. S. Watowich, Q. Tian, A. M. Jetten, and C. Dong. 2008. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity*. 28:29-39. doi:S1074-7613(07)00575-4 [pii];10.1016/j.immuni.2007.11.016 [doi].
- Yang, X. O., H. Zhang, B. S. Kim, X. Niu, J. Peng, Y. Chen, R. Kerketta, Y. H. Lee, S. H. Chang, D. B. Corry, D. Wang, S. S. Watowich, and C. Dong. 2013. The signaling suppressor CIS controls proallergic T cell development and allergic airway inflammation. *Nat.Immunol.* 14:732-740. doi:ni.2633 [pii];10.1038/ni.2633 [doi].
- Yang, X. P., K. Ghoreschi, S. M. Steward-Tharp, J. Rodriguez-Canales, J. Zhu, J. R. Grainger, K. Hirahara, H. W. Sun, L. Wei, G. Vahedi, Y. Kanno, J. J. O'Shea, and A. Laurence. 2011. Opposing regulation of the locus encoding IL-17 through direct, reciprocal actions of STAT3 and STAT5. *Nat.Immunol.* 12:247-254. doi:ni.1995 [pii];10.1038/ni.1995 [doi].
- Yang, Y., J. C. Ochando, J. S. Bromberg, and Y. Ding. 2007. Identification of a distant T-bet enhancer responsive to IL-12/Stat4 and IFNgamma/Stat1 signals. *Blood* 110:2494-2500. doi:blood-2006-11-058271 [pii];10.1182/blood-2006-11-058271 [doi].
- Yaqub, S., K. Henjum, M. Mahic, F. L. Jahnsen, E. M. Aandahl, B. A. Bjornbeth, and K. Tasken. 2008. Regulatory T cells in colorectal cancer patients suppress anti-tumor immune activity in a COX-2 dependent manner. *Cancer Immunol.Immunother.* 57:813-821. doi:10.1007/s00262-007-0417-x [doi].
- Yayon, A., M. Klagsbrun, J. D. Esko, P. Leder, and D. M. Ornitz. 1991. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* 64:841-848. doi:0092-8674(91)90512-W [pii].
- Ye, H., J. Cheng, Y. Tang, Z. Liu, C. Xu, Y. Liu, and Y. Sun. 2012. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells produced TGFbeta contributes to progression and metastasis of prostate cancer. *Cancer Invest* 30:513-518. doi:10.3109/07357907.2012.692171 [doi].
- Yee, D., S. Paik, G. S. Lebovic, R. R. Marcus, R. E. Favoni, K. J. Cullen, M. E. Lippman, and N. Rosen. 1989. Analysis of insulin-like growth factor I gene expression in malignancy: evidence for a paracrine role in human breast cancer. *Mol.Endocrinol.* 3:509-517. doi:10.1210/mend-3-3-509 [doi].
- Yeo, E. J., L. Cassetta, B. Z. Qian, I. Lewkowich, J. F. Li, J. A. Stefater, III, A. N. Smith, L. S. Wiechmann, Y. Wang, J. W. Pollard, and R. A. Lang. 2014. Myeloid WNT7b mediates the angiogenic switch and metastasis in breast cancer. *Cancer Res.* 74:2962-2973. doi:0008-5472.CAN-13-2421 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-13-2421 [doi].
- Yi, J. S., M. A. Cox, and A. J. Zajac. 2010. Interleukin-21: a multifunctional regulator of immunity to infections. *Microbes.Infect.* 12:1111-1119. doi:S1286-4579(10)00210-8 [pii];10.1016/j.micinf.2010.08.008 [doi].
- Yi, L., H. Xiao, M. Xu, X. Ye, J. Hu, F. Li, M. Li, C. Luo, S. Yu, X. Bian, and H. Feng. 2011. Glioma-initiating cells: a predominant role in microglia/macrophages tropism to glioma. *J.Neuroimmunol.* 232:75-82. doi:S0165-5728(10)00461-3 [pii];10.1016/j.jneuroim.2010.10.011 [doi].
- Yi, M. and E. Ruoslahti. 2001. A fibronectin fragment inhibits tumor growth, angiogenesis, and metastasis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98:620-624. doi:10.1073/pnas.98.2.620 [doi];98/2/620 [pii].
- Yin, W., E. Smiley, J. Germiller, R. P. Mecham, J. B. Florer, R. J. Wenstrup, and J. Bonadio. 1995. Isolation of a novel latent transforming growth factor-beta binding protein gene (LTBP-3). *J.Biol.Chem.* 270:10147-10160.
- Yoon, N. K., E. L. Maresh, D. Shen, Y. Elshimali, S. Apple, S. Horvath, V. Mah, S. Bose, D. Chia, H. R. Chang, and L. Goodglick. 2010. Higher levels of GATA3 predict better survival in women with breast cancer. *Hum.Pathol.* 41:1794-1801. doi:S0046-8177(10)00216-9 [pii];10.1016/j.humpath.2010.06.010 [doi].
- Yosef, N., A. K. Shalek, J. T. Gaublotme, H. Jin, Y. Lee, A. Awasthi, C. Wu, K. Karwacz, S. Xiao, M. Jorgolli, D. Gennert, R. Satija, A. Shakya, D. Y. Lu, J. J. Trombetta, M. R. Pillai, P. J. Ratcliffe, M. L. Coleman, M. Bix, D.

- Tantin, H. Park, V. K. Kuchroo, and A. Regev. 2013. Dynamic regulatory network controlling TH17 cell differentiation. *Nature* 496:461-468. doi:nature11981 [pii];10.1038/nature11981 [doi].
- Young, G. D. and J. E. Murphy-Ullrich. 2004. Molecular interactions that confer latency to transforming growth factor-beta. *J.Biol.Chem.* 279:38032-38039. doi:10.1074/jbc.M405658200 [doi];M405658200 [pii].
- Young, J. D., C. G. Peterson, P. Venge, and Z. A. Cohn. 1986. Mechanism of membrane damage mediated by human eosinophil cationic protein. *Nature* 321:613-616. doi:10.1038/321613a0 [doi].
- Yu, Q. and I. Stamenkovic. 2000. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* 14:163-176.
- Yu, S., X. Zhou, F. C. Steinke, C. Liu, S. C. Chen, O. Zagorodna, X. Jing, Y. Yokota, D. K. Meyerholz, C. G. Mullighan, C. M. Knudson, D. M. Zhao, and H. H. Xue. 2012. The TCF-1 and LEF-1 transcription factors have cooperative and opposing roles in T cell development and malignancy. *Immunity.* 37:813-826. doi:S1074-7613(12)00372-X [pii];10.1016/j.immuni.2012.08.009 [doi].
- Yuan, X. L., L. Chen, M. X. Li, P. Dong, J. Xue, J. Wang, T. T. Zhang, X. A. Wang, F. M. Zhang, H. L. Ge, L. S. Shen, and D. Xu. 2010. Elevated expression of Foxp3 in tumor-infiltrating Treg cells suppresses T-cell proliferation and contributes to gastric cancer progression in a COX-2-dependent manner. *Clin.Immunol.* 134:277-288. doi:S1521-6616(09)00845-6 [pii];10.1016/j.clim.2009.10.005 [doi].
- Zaidel-Bar, R., S. Itzkovitz, A. Ma'ayan, R. Iyengar, and B. Geiger. 2007. Functional atlas of the integrin adhesome. *Nat.Cell Biol.* 9:858-867. doi:ncb0807-858 [pii];10.1038/ncb0807-858 [doi].
- Zapf, J., E. Schoenle, G. Jagars, I. Sand, J. Grunwald, and E. R. Froesch. 1979. Inhibition of the action of nonsuppressible insulin-like activity on isolated rat fat cells by binding to its carrier protein. *J.Clin.Invest* 63:1077-1084. doi:10.1172/JCI109377 [doi].
- Zarek, P. E., C. T. Huang, E. R. Lutz, J. Kowalski, M. R. Horton, J. Linden, C. G. Drake, and J. D. Powell. 2008. A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood* 111:251-259. doi:blood-2007-03-081646 [pii];10.1182/blood-2007-03-081646 [doi].
- Zeisberg, E. M., S. Potenta, L. Xie, M. Zeisberg, and R. Kalluri. 2007. Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res.* 67:10123-10128. doi:67/21/10123 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-07-3127 [doi].
- Zeng, W. P. 2013. 'All things considered': transcriptional regulation of T helper type 2 cell differentiation from precursor to effector activation. *Immunology* 140:31-38. doi:10.1111/imm.12121 [doi].
- Zha, Y., R. Marks, A. W. Ho, A. C. Peterson, S. Janardhan, I. Brown, K. Praveen, S. Stang, J. C. Stone, and T. F. Gajewski. 2006. T cell anergy is reversed by active Ras and is regulated by diacylglycerol kinase-alpha. *Nat.Immunol.* 7:1166-1173. doi:ni1394 [pii];10.1038/ni1394 [doi].
- Zhang, C., W. Zhai, Y. Xie, Q. Chen, W. Zhu, and X. Sun. 2013. Mesenchymal stem cells derived from breast cancer tissue promote the proliferation and migration of the MCF-7 cell line. *Oncol.Lett.* 6:1577-1582. doi:10.3892/ol.2013.1619 [doi];ol-06-06-1577 [pii].
- Zhang, D. H., L. Yang, and A. Ray. 1998. Differential responsiveness of the IL-5 and IL-4 genes to transcription factor GATA-3. *J.Immunol.* 161:3817-3821.
- Zhang, J., Y. Lu, and K. J. Pienta. 2010. Multiple roles of chemokine (C-C motif) ligand 2 in promoting prostate cancer growth. *J.Natl.Cancer Inst.* 102:522-528. doi:djq044 [pii];10.1093/jnci/djq044 [doi].
- Zhang, J. P., J. Yan, J. Xu, X. H. Pang, M. S. Chen, L. Li, C. Wu, S. P. Li, and L. Zheng. 2009. Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *J.Hepatol.* 50:980-989. doi:S0168-8278(09)00086-5 [pii];10.1016/j.jhep.2008.12.033 [doi].
- Zhang, N. and M. J. Bevan. 2011. CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity.* 35:161-168. doi:S1074-7613(11)00303-7 [pii];10.1016/j.immuni.2011.07.010 [doi].
- Zhang, R., Y. Xu, N. Ekman, Z. Wu, J. Wu, K. Alitalo, and W. Min. 2003. Etk/Bmx transactivates vascular endothelial growth factor 2 and recruits phosphatidylinositol 3-kinase to mediate the tumor necrosis factor-induced angiogenic pathway. *J.Biol.Chem.* 278:51267-51276. doi:10.1074/jbc.M310678200 [doi];M310678200 [pii].
- Zhang, W., X. D. Zhu, H. C. Sun, Y. Q. Xiong, P. Y. Zhuang, H. X. Xu, L. Q. Kong, L. Wang, W. Z. Wu, and Z. Y. Tang. 2010. Depletion of tumor-associated macrophages enhances the effect of sorafenib in metastatic liver cancer models by antimetastatic and antiangiogenic effects. *Clin.Cancer Res.* 16:3420-3430. doi:1078-0432.CCR-09-2904 [pii];10.1158/1078-0432.CCR-09-2904 [doi].
- Zhang, Y., H. Tang, J. Cai, T. Zhang, J. Guo, D. Feng, and Z. Wang. 2011. Ovarian cancer-associated fibroblasts contribute to epithelial ovarian carcinoma metastasis by promoting angiogenesis, lymphangiogenesis and tumor cell invasion. *Cancer Lett.* 303:47-55. doi:S0304-3835(11)00024-3 [pii];10.1016/j.canlet.2011.01.011 [doi].
- Zhao, Q., D. M. Kuang, Y. Wu, X. Xiao, X. F. Li, T. J. Li, and L. Zheng. 2012. Activated CD69+ T cells foster immune privilege by regulating IDO expression in tumor-associated macrophages. *J.Immunol.* 188:1117-1124. doi:jimmunol.1100164 [pii];10.4049/jimmunol.1100164 [doi].

- Zheng, S. G., J. H. Wang, W. Stohl, K. S. Kim, J. D. Gray, and D. A. Horwitz. 2006. TGF-beta requires CTLA-4 early after T cell activation to induce FoxP3 and generate adaptive CD4+CD25+ regulatory cells. *J.Immunol.* 176:3321-3329. doi:176/6/3321 [pii].
- Zheng, Y., A. Chaudhry, A. Kas, P. DeRoos, J. M. Kim, T. T. Chu, L. Corcoran, P. Treuting, U. Klein, and A. Y. Rudensky. 2009. Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses. *Nature* 458:351-356. doi:nature07674 [pii];10.1038/nature07674 [doi].
- Zheng, Y., G. M. Delgoffe, C. F. Meyer, W. Chan, and J. D. Powell. 2009. Anergic T cells are metabolically anergic. *J.Immunol.* 183:6095-6101. doi:jimmunol.0803510 [pii];10.4049/jimmunol.0803510 [doi].
- Zheng, Y., S. Josefowicz, A. Chaudhry, X. P. Peng, K. Forbush, and A. Y. Rudensky. 2010. Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. *Nature* 463:808-812. doi:nature08750 [pii];10.1038/nature08750 [doi].
- Zheng, Y., P. Saftig, D. Hartmann, and C. Blobel. 2004. Evaluation of the contribution of different ADAMs to tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) shedding and of the function of the TNFalpha ectodomain in ensuring selective stimulated shedding by the TNFalpha convertase (TACE/ADAM17). *J.Biol.Chem.* 279:42898-42906. doi:10.1074/jbc.M403193200 [doi];M403193200 [pii].
- Zheng, Y., Y. Zha, G. Driessens, F. Locke, and T. F. Gajewski. 2012. Transcriptional regulator early growth response gene 2 (Egr2) is required for T cell anergy in vitro and in vivo. *J.Exp.Med.* 209:2157-2163. doi:jem.20120342 [pii];10.1084/jem.20120342 [doi].
- Zhou, G. and H. I. Levitsky. 2007. Natural regulatory T cells and de novo-induced regulatory T cells contribute independently to tumor-specific tolerance. *J.Immunol.* 178:2155-2162. doi:178/4/2155 [pii].
- Zhou, J., J. Zhang, M. G. Lichtenheld, and G. G. Meadows. 2002. A role for NF-kappa B activation in perforin expression of NK cells upon IL-2 receptor signaling. *J.Immunol.* 169:1319-1325.
- Zhou, L., J. E. Lopes, M. M. Chong, I. I. Ivanov, R. Min, G. D. Victora, Y. Shen, J. Du, Y. P. Rubtsov, A. Y. Rudensky, S. F. Ziegler, and D. R. Littman. 2008. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgamma function. *Nature* 453:236-240. doi:nature06878 [pii];10.1038/nature06878 [doi].
- Zhou, M., W. Ouyang, Q. Gong, S. G. Katz, J. M. White, S. H. Orkin, and K. M. Murphy. 2001. Friend of GATA-1 represses GATA-3-dependent activity in CD4+ T cells. *J.Exp.Med.* 194:1461-1471.
- Zhou, Q., R. Q. Peng, X. J. Wu, Q. Xia, J. H. Hou, Y. Ding, Q. M. Zhou, X. Zhang, Z. Z. Pang, D. S. Wan, Y. X. Zeng, and X. S. Zhang. 2010. The density of macrophages in the invasive front is inversely correlated to liver metastasis in colon cancer. *J.Transl.Med.* 8:13. doi:1479-5876-8-13 [pii];10.1186/1479-5876-8-13 [doi].
- Zhou, X., S. Yu, D. M. Zhao, J. T. Harty, V. P. Badovinac, and H. H. Xue. 2010. Differentiation and persistence of memory CD8(+) T cells depend on T cell factor 1. *Immunity.* 33:229-240. doi:S1074-7613(10)00285-2 [pii];10.1016/j.immuni.2010.08.002 [doi].
- Zhou, Y., A. K. Singh, R. F. Hoyt, Jr., S. Wang, Z. Yu, T. Hunt, B. Kindzelski, P. C. Corcoran, M. M. Mohiuddin, and K. A. Horvath. 2014. Regulatory T cells enhance mesenchymal stem cell survival and proliferation following autologous cotransplantation in ischemic myocardium. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 148:1131-1137. doi:S0022-5223(14)00824-1 [pii];10.1016/j.jtcvs.2014.06.029 [doi].
- Zhou, Y., C. M. Weyman, H. Liu, A. Almasan, and A. Zhou. 2008. IFN-gamma induces apoptosis in HL-60 cells through decreased Bcl-2 and increased Bak expression. *J.Interferon Cytokine Res.* 28:65-72. doi:10.1089/jir.2007.0025 [doi].
- Zhu, G. G., L. Risteli, M. Makinen, J. Risteli, A. Kauppila, and F. Stenback. 1995. Immunohistochemical study of type I collagen and type I pN-collagen in benign and malignant ovarian neoplasms. *Cancer* 75:1010-1017.
- Zhu, J., J. Cote-Sierra, L. Guo, and W. E. Paul. 2003. Stat5 activation plays a critical role in Th2 differentiation. *Immunity.* 19:739-748. doi:S1074761303002929 [pii].
- Zhu, J., D. Jankovic, A. J. Oler, G. Wei, S. Sharma, G. Hu, L. Guo, R. Yagi, H. Yamane, G. Punkosdy, L. Feigenbaum, K. Zhao, and W. E. Paul. 2012. The transcription factor T-bet is induced by multiple pathways and prevents an endogenous Th2 cell program during Th1 cell responses. *Immunity.* 37:660-673. doi:S1074-7613(12)00417-7 [pii];10.1016/j.immuni.2012.09.007 [doi].
- Zhu, W., W. Xu, R. Jiang, H. Qian, M. Chen, J. Hu, W. Cao, C. Han, and Y. Chen. 2006. Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo. *Exp.Mol.Pathol.* 80:267-274. doi:S0014-4800(05)00086-9 [pii];10.1016/j.yexmp.2005.07.004 [doi].
- Zhu, X. D., J. B. Zhang, P. Y. Zhuang, H. G. Zhu, W. Zhang, Y. Q. Xiong, W. Z. Wu, L. Wang, Z. Y. Tang, and H. C. Sun. 2008. High expression of macrophage colony-stimulating factor in peritumoral liver tissue is associated with poor survival after curative resection of hepatocellular carcinoma. *J.Clin.Oncol.* 26:2707-2716. doi:26/16/2707 [pii];10.1200/JCO.2007.15.6521 [doi].
- Zorn, E., E. A. Nelson, M. Mohseni, F. Porcheray, H. Kim, D. Litsa, R. Bellucci, E. Raderschall, C. Canning, R. J. Soiffer, D. A. Frank, and J. Ritz. 2006. IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells

through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood* 108:1571-1579. doi:blood-2006-02-004747 [pii];10.1182/blood-2006-02-004747 [doi].

Zou, W. 2006. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat.Rev.Immunol.* 6:295-307. doi:nri1806 [pii];10.1038/nri1806 [doi].

. Zuk, P. A., M. Zhu, P. Ashjian, D. A. De Ugarte, J. I. Huang, H. Mizuno, Z. C. Alfonso, J. K. Fraser, P. Benhaim, and M. H. Hedrick. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol.Biol.Cell* 13:4279-4295. doi:10.1091/mbc.E02-02-0105 [doi].

Zuniga, L. A., R. Jain, C. Haines, and D. J. Cua. 2013. Th17 cell development: from the cradle to the grave. *Immunol.Rev.* 252:78-88. doi:10.1111/imr.12036 [doi].

Zurkova, K., K. Babiarova, P. Hainz, J. Krystofova, L. Kutinova, P. Otahal, and S. Nemeckova. 2009. The expression of the soluble isoform of hFlt3 ligand by recombinant vaccinia virus enhances immunogenicity of the vector. *Oncol.Rep.* 21:1335-1343.

Zurkova, K., P. Chlanda, Z. Samkova, K. Babiarova, L. Kutinova, J. Krystofova, P. Hainz, and S. Nemeckova. 2011. Expression of soluble TGF-beta receptor II by recombinant Vaccinia virus enhances E7 specific immunotherapy of HPV16 tumors. *Neoplasma* 58:181-188.

Zurkova, K., P. Hainz, J. Krystofova, L. Kutinova, M. Sanda, and S. Nemeckova. 2010. Attenuation of vaccinia virus by the expression of human Flt3 ligand. *Viol.J.* 7:109. doi:1743-422X-7-109 [pii];10.1186/1743-422X-7-109 [doi].

## 9. Přílohy

1. publikace:

**Antitumor activity and immunogenicity of recombinant vaccinia virus expressing HPV 16 E7 protein SigE7LAMP is enhanced by high-level coexpression of IGFBP-3**

Musil J, Kutinova L, Zurkova K, Hainz P, Babiarova K, Krystofova J, Nemeckova S.

Cancer Gene Ther. 2014 Mar;21(3):115-25. doi: 10.1038/cgt.2014.6. Epub 2014 Feb 21.

2. publikace

**Enhancement of DNA vaccine potency against legumain.**

Smahel M, Duskova M, Polakova I, Musil J.

J Immunother. 2014 Jun;37(5):293-303. doi:10.1097/CJI.0000000000000040.