

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Katedra medicínské biologie



**Některé možnosti imunoterapie nádorových
onemocnění.**

Bakalářská práce

Jan Martinek

Vedoucí práce: RNDr. Jan ŽENKA, CSc., PřF JU

České Budějovice, 2011

Martinek, J., 2010: Některé možnosti imunoterapie nádorových onemocnění. [Some possibilities of immunotherapy of cancer. Bc. Thesis, in Czech.] – 35 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

The aim of this study was to find ways, how to break immunological tolerance of tumors by comparison immune privileged sites. We analysed the mechanisms of establishment of tolerance. The possibility of cancer therapy based on stimulation of innate immunity was evaluated as well.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě fakultou - elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 28.4. 2011

.....

Jan Martinek

Poděkování

Na tomto místě bych chtěl velmi poděkovat mému školiteli RNDr . Janu Ženkovi CSc. za vedení mé práce, rady a především velkou trpělivost. a dále také všem, kteří mě po celou dobu podporovali.

Obsah

1. Úvod	1
1.1 Rakovina	1
1.2 Nádorová imunologie.....	2
1.2.1 Získaná imunita	2
1.2.2 Nádorové antigeny	4
1.2.3 Vrozená imunita	4
1.3 Tolerance	4
1.3.1 Co je to imunologická tolerance.....	5
1.3.2 Indukce imunologické tolerance	5
1.3.3 Imunoprivilegované oblasti jako zvláštní případ tolerance.....	6
2. Cíle práce	7
3. Mechanismy navození tolerance u jednotlivých imunoprivilegovaných míst	8
3.1 Přední komora oční	8
3.2 Mozek	9
3.3 Varlata.....	10
3.4 Lící váček křečka	11
3.5 Těhotenství: placenta, plod a děloha.....	11
3.6 Mechanismy navození tolerance nádoru.....	13
3.6.1 Mechanismy úniku nádorů před imunitním systémem	13
3.7 Srovnání mechanismů zajišťujících toleranci u jednotlivých imunoprivilegovaných míst	16
4. Mechanismy porušení tolerance u jednotlivých imunoprivilegovaných míst	18

4.1 Oko.....	18
4.2 Mozek	19
4.3 Varlata.....	19
4.4 Trofoblast.....	19
4.5 Zobecnění poznatků z porušení tolerance u jednotlivých imunoprivilegovaných míst, návrhy pro nádorovou terapii.....	21
5. Terapie nádorů stimulací vrozené imunity.	22
5.1 Pattern recognition receptors	22
5.1.1 Druhy PRRs	22
5.2 SR/CR myši	23
5.3 Toll-like receptory	23
5.3.1 TLR a jejich agonisté	24
5.4 Umístění agonisty TLR na povrch nádorových buněk	25
5.5 Jaké agonisty TLR použít?.....	25
5.6 Jaké onkolytické viry použít?	26
5.7 Uspořádání in vivo experimentu.....	26
6. Závěr.....	27
7. Seznam použité literatury	28

Seznam zkratek:

ACAID – anterior chamber-associated immune deviation (imunitní odchylka asociovaná s přední komorou oční)

ADCC – antibody dependent cellular cytotoxicity (na protilátkách závislá buněčná cytotoxicita)

APC – antigen presenting cell (antigen prezentující buňka)

BBB – blood brain barrier (krevní mozková bariéra)

BRAID – brain associated immune deviation (imunitní odchylka asociovaná s mozkiem)

BTB – blood tubular barrier (krevní tubulární bariéra)

CD – cluster of differentiation (diferenční skupina)

CGRP – calcitonin gene-related peptide (peptid příbuzný genu pro kalcitonin)

CNS – central nervous system (centrální nervová soustava)

CRP – C reactive protein (C reaktivní protein)

Crly – complement receptor-1 related gene/protein Y (komplementový receptor související s genem/proteinem Y)

CTL – cytotoxic t lymphocyte (cytotoxický t lymfocyt)

DC – dendritic cell (dendritická buňka)

DTH – delayed-type hypersensitivity (opožděná hypersensitivita)

EAU – experimental autoimmune uveoretinitis (experimentální autoimunní uveoretinitida)

EIU – endotoxin-induced uveitis (endotoxinem indukovaná uveitida)

FasL – Fas ligand (receptor pro Fas)

Foxp3 – forkhead box P3 (forkhead transkripční faktor)

HLA – human leukocyte antigen (lidský lymfocytární antigen)

ICAM-I – intracellular adhesion molecule-I (vnitrobuněčná adhezivní molekula)

IDO – indoleamine-2,3-dioxygenase

IL – interleukin

IL-1-R – interleukin-1 receptor (receptor pro interleukin)

IMA – immunologically mediated abortion (imunologicky zprostředkovaný potrat)

INF – interferon

KIR – killer cell immunoglobulin-like receptor (imunoglobulinu podobný receptor zabíječských buněk)

LIR – leukocyte Ig-like receptor (imunoglobulinu podobný receptor leukocytu)

LRR – leucine-rich repeats (opakování bohatá na leuciny) MHC – major histocompatibility complex (hlavní histokompatibilní komplex)

MBL – mannose-binding lectin (lektin vázající manosu)

MIF – macrophage inhibitory factor (makrofág inhibující faktor)

MIP-1 α – monocyte inflammatory protein (monocytární zánětlivý protein)

MR – mannose receptor (manosový receptor)

NDV – Newcastle disease virus (virus Newcastleské nemoci)

NK – natural killers (přirození zabíječi)

NKG – NK-cell lectine-like receptor (lektinu podobný receptor zabíječských buněk)

NLR – NOD-like receptor (receptor podobný nukleotidu, vázajícího oligomerující doménu)

PAMPs – pathogen-associated molecular patterns (molekulové vzory asociované s patogeny)

PD-1 – programmed death-1 (protein programované smrti)

PDL-1 – programmed death ligand-1 (ligand programované smrti)

PGE₂ – prostaglandin E₂

PRR – pathogen recognition receptor (receptor rozpoznávající patogeny)

Rd – retinal degeneration (degenerace sítnice)

RM – recurrent miscarriage (opakovaný potrat)

RPE – retinal pigment epithelial cells (pigmentové epiteliální buňky sítnice)

SfasL – soluble Fas ligand (rozpustný Fas ligand)

SOM – somatostatin

SR/CR – spontaneous regression/complete resistance mice (odolnost myši s kompletní spontánní regresí)

TAA – tumor associated antigens (antigeny asociované s nádory)

TCR – t lymphocyte receptor (receptor lymfocytu T)

TGF β – transforming growth factor (transformující růstový faktor)

Th – t helper cell (pomahačská t buňka)

TIR – the toll/interleukin-1 receptor (receptor toll/interleukin-1)

TLR – toll like receptor (receptor podobný genu Toll)

TLRA – toll like receptor agonist (agonista toll like receptoru)

TNF – tumor necrosis factor (faktor nádorové nekrózy)

Treg – regulatory t cells (regulační t buňky)

TSA – tumor specific antigens (nádorově specifické antigeny)

TSTA – tumor-associated transplantation antigen (transplantační antigen asociovaný s nádory)

VIP – vasoactive intestinal peptide (vazoaktivní střevní peptid)

α MSH – α melanocyte stimulating hormone (α melanocyt stimulující hormon)

1. Úvod

Imunitní systém má schopnost rozpoznat a zabít rakovinné buňky. Nicméně tyto buňky si vytvořily účinné mechanismy jak se rozpoznání a následnému eliminování vyhnout. Nádorová imunoterapie se zabývá vývojem různých strategií, které by tento problém překonaly.

V této práci budou probrány především mechanismy imunitní tolerance imunoprivilegovaných míst (oka, mozku, varlat, lícního váčku křečka a trofoblastu) a mechanismy tolerance nádorů (jako zvláštní případ imunoprivilegovaného místa). Bude provedeno porovnání těchto mechanismů a následně shrnuty případy, kdy je jejich tolerance prolomena. Pokusíme se poučit ze zjištěných poznatků a navrhnout hypotézu, jak by se dala narušit tolerance nádorů na úrovni získané imunity. Ve druhé části práce bude navržena možnost využití stimulace vrozené imunity pro terapii nádorových onemocnění.

1.1 Rakovina

Rakovina je skupina nemocí, ve které určitý klastr buněk vykazuje nekontrolovatelný růst, invazi do okolních tkání a někdy i metastázy (rozšíření buněk přes mízu nebo krev do dalších míst v těle). Hlavní a základní rys rakovinných buněk je chybná kontrola buněčné proliferace, ke které dochází v důsledku mutací. Obvykle vzniká mutací v proliferačních genech tzv. onkogenech nebo antiproliferačních genech tzv. antionkogenech. Tím získají mutantní formy buněk nové vlastnosti, buď zvýšenou nebo sníženou aktivitu. Potomstvo těchto buněk zdědí tyto mutace a vzniká z nich nádor, který může neomezeně růst (Alberts et al. 1998).

Velká část genetických změn vzniká prostřednictvím endogenních mechanismů (chyby během replikace genomu). Faktory prostředí hrají také důležitou roli. Jsou to především chemické karcinogeny, tabákový kouř, infekční agens (viry, bakterie) a radiace (Schwab 2008).

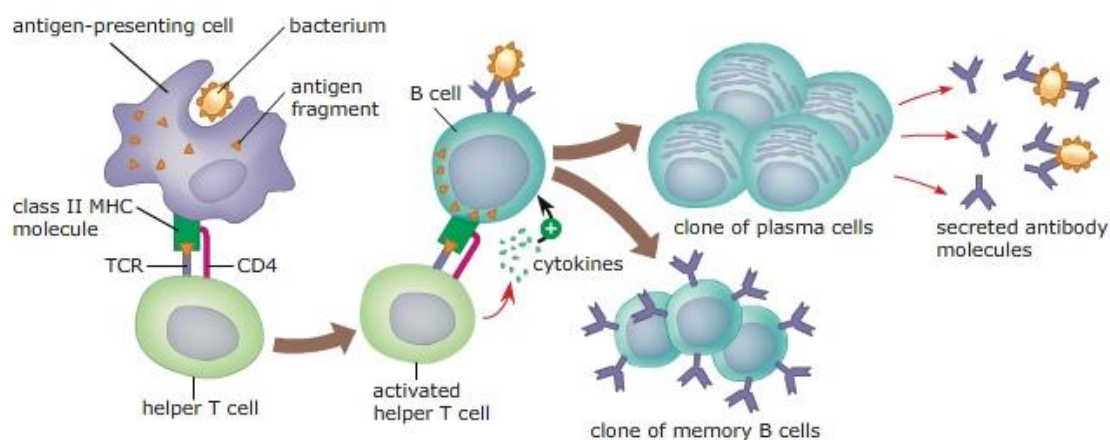
1.2 Nádorová imunologie

Mechanismy imunitního systému můžeme rozdělit do dvou kategorií: získaná imunita (antigenně specifická, adaptivní) a vrozená imunita (nespecifická, neadaptivní). k tomu aby mohl imunitní systém reagovat s nádorovými buňkami, musí je nejdříve rozpoznat. Základním předpokladem tohoto rozpoznání je tedy existence nádorově specifických povrchových antigenů (Hořejší a Bartůňková 1998). u experimentálních zvířat bylo prokázáno, že nádorové antigeny mohou vyvolat humorální i buňkami zprostředkované imunitní odpovědi, které vyúsťují v destrukci nádorových buněk (Janeway et al. 2004).

1.2.1 Získaná imunita

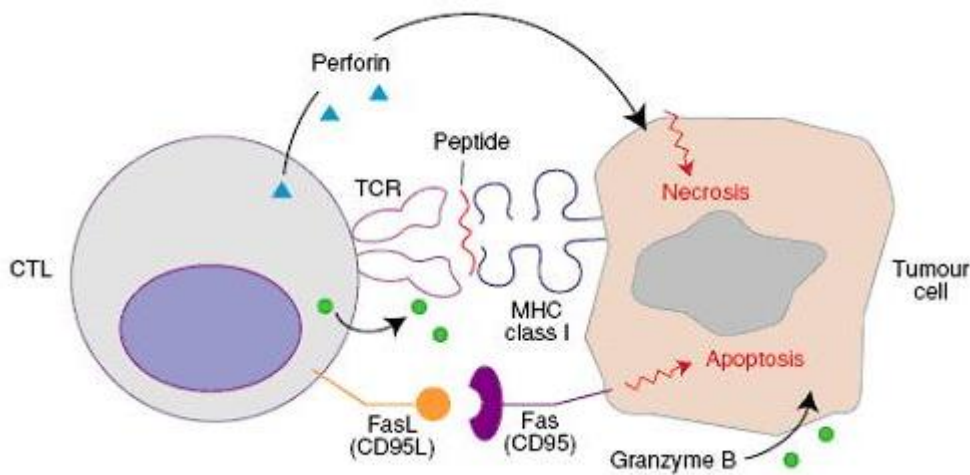
Vyskytuje se až u obratlovců. Základní vlastností je rozpoznání mezi tělu cizími a tělu vlastními strukturami. Dále je charakterizována specifitou, diverzitou a imunologickou pamětí (což je princip očkování).

Získaná imunita se rozděluje na dva oddíly: humorální a buněčný. Humorální imunitní odpověď spočívá ve vazbě protilátka-antigen. Efektorovými buňkami jsou B-lymfocyty, na jejichž membránách jsou navázané zmíněné protilátky. Po navázání antigenu na protilátku dochází ke klonální expanzi B-lymfocytů (se specifitou pro daný antigen). Část těchto klonů necirkuluje v krvi a přemění se na paměťové buňky, které umožní rychlejší nástup reakce po opětovném setkání s antigenem (Roitt et al. 2006), viz Obr. 1.



Obr. 1: Aktivace a klonální expanze B buněk (Campbell a Reece 2008).

Hlavní úlohu u buněčně zprostředkovaných mechanismů mají T-lymfocyty. Ty reagují na každou cizorodou strukturu prostřednictvím svých receptorů (TCR). Rozlišují se dvě základní subpopulace T-lymfocytů CD4+ a CD8+. CD4+ jsou označovány jako Th (pomocné) buňky. Dělí se na Th1, jejichž funkcí je produkovat lymfokíny, uplatňují se v oddáleném typu přecitlivělosti a buněčné cytotoxicitě. Druhým typem jsou Th2 buňky, které také produkují lymfokíny a pomáhají polyklonální aktivaci B buněk. Oba typy Th buněk rozpoznávají exogenní antigen prezentovaný v komplexu s MHC II. MHC II je na povrchu APC buněk (např. makrofágů, dendritických buněk). CD8+ buňky jsou označovány jako Tc (cytotoxické). Jejich hlavní funkcí je rozpoznat endogenní antigeny v komplexu s MHC I. MHC I je na povrchu všech jaderných buněk, viz Obr. 2. Endogenní antigeny tvoří hlavně virem infikované buňky nebo buňky nádorové (Kuby et al. 2007).



Obr. 2: Rozpoznání rakovinných buněk cytotoxickými T-lymfocyty (Mitra et al. 2003)

Mezi další důležité buňky patří NK buňky a makrofágy. NK atakují hlavně buňky, které neexprimují MHC I a uplatňují se v ADCC (na protilátkách závislá buněčná cytotoxicita). Makrofágy jsou hlavní fagocytující a antigen prezentující buňky.

Hlavní příčinou selhávání imunitní obrany proti nádorům je asi právě nedostatečná prezentace (Hořejší a Bartůňková 1998). Specifické rysy, jako tlumení reakce, bude probráno dál.

1.2.2 Nádorové antigeny

Jsou to molekulové struktury na povrchu nádorových buněk. Měly by se chovat jako antigeny a tudíž vyvolat imunitní odpověď (Krejsek a Kopecký 2004).

Zpočátku byly nádorové antigeny obecně rozděleny do dvou kategorií na základě způsobu jejich exprese. Na TSA, které jsou přítomny pouze na nádorových buňkách a TAA, které jsou přítomny na některých nádorových buňkách a také na některých normálních buňkách. Nicméně, tato klasifikace je nedokonalá, protože se ukázalo, že mnoho antigenů, které byly považovány za tumor-specifické, bylo objeveno také na některých normálních buňkách. Moderní klasifikace nádorových antigenů je založena na jejich molekulární struktuře a původu. v současné době jsou lidské nádorové antigeny rozděleny do následujících tříd: diferenciatní antigeny, antigeny se zvýšenou expresí, nádorové testikulární antigeny, antigeny odvozené od virově indukovaných nádorů, onkofetální antigeny a antigeny, které vznikají bodovými mutacemi v onkogenech nebo tumor supresorových genech (Liu 2010).

1.2.3 Vrozená imunita

Je evolučně starší. Vyskytuje se u všech mnohobuněčných organismů. Imunitní reakce vrozené imunity není závislá na rozpoznání lymfocyty. Mechanismy nespecifické imunity jsou tvořeny dvěma složkami: buněčnou a humorální. Buněčnou složku představují fagocytující buňky a přirozeně cytotoxické buňky (NK). Humorální složku zase komplementový systém, interferony, lektiny a jiné sérové proteiny. Na rozdíl od specifických složek vrozená imunita nemá imunologickou paměť (Hořejší a Bartůňková 1998). Podrobněji bude rozebrána dále.

1.3 Tolerance

Významnou překážkou k vytvoření imunoterapeutik a očkovacích látek proti rakovině je, že mnohé nádorové antigeny jsou poměrně slabé a že navíc dochází k navození stavu účinné imunotolerance nádorů. Pokud bychom porozuměli mechanismům neodpovídavosti a dokázali nějakým způsobem regulovat tuto imunologickou toleranci, byl by to významný krok v oblasti nádorové imunoterapie.

1.3.1 Co je to imunologická tolerance

Je to stav, kdy imunitní systém neodpovídá na určitý antigen, který by za jiných podmínek u stejného jedince vyvolal imunitní odpověď. Specifická neodpovídavost je způsobena v důsledku snížené nebo úplně potlačené reaktivity klonu lymfocytů na daný antigen. Někdy je tento klon z organismu úplně eliminován. Jedinec, který toleruje určitý antigen, má zachovanou schopnost odpovídat na ostatní antigeny. Imunologická tolerance je proto stejně specifická jako imunita. Může být přirozená (spontánní neodpovídavost na vlastní antigeny, která vzniká během ontogenetického vývoje jedince se nazývá autotolerance) nebo sekundární (neodpovídavost na cizí antigen). v experimentálních podmínkách se tolerance na určitý antigen dá navodit uměle (Ferenčík et al. 2004).

1.3.2 Indukce imunologické tolerance

Imunologická tolerance k vlastním antigenům se vyvíjí v lymfatických orgánech během zrání t a B buněk. Lymfocyty t zrají v thymu (centrální tolerance) a v sekundárních lymfatických tkáních po exportu zralých t buněk z thymu (periferní tolerance). v thymu dochází k pozitivní a negativní selekci. Pozitivní selekce je založena na eliminaci lymfocytů s nefunkčním TCR neschopných rozpoznat vlastní HLA molekuly. u negativní selekce dochází k delecii autoreaktivních t buněk s vysokou afinitou vazby komplexu HLA-peptid (Sprent a Kishimoto 2001). Tento proces není dokonalý, malé množství autoreaktivních buněk uniká do periferie. Aby se zabránilo útoku těchto buněk na vlastní komponenty a následnému vzniku autoimunitní nemoci, je nezbytná existence mechanismů periferní tolerance. Ty zahrnují t buněčnou klonální delecii, anergii, ignoranci a supresi (Miyagawa et al. 2010). Klonální delecce vede k apoptotické smrti autoreaktivních klonů (např. při nekróze po uvolnění velkého množství autoantigenů). Klonální anergie vzniká při funkčním útlumu t lymfocytů, které jsou schopny rozpoznat autoantigen, ale chybí kostimulační signál (Bandyopadhyay et al. 2007). Klonální ignorace je stav, kdy lymfocyty nejsou schopny rozpoznat autoantigen (např. u antigenů, které jsou exprimovány na vlastních tkáních v podprahovém množství). Všechny uvedené mechanismy spadají do procesu pasivních mechanismů periferní tolerance. Aktivní mechanismus imunologické suprese je založen na existenci regulačních t buněk. (Veselá a Stříž 2004). B buňky kromě regulace tolerance t lymfocytů mohou být samy tolerizujícími buňkami. Podstupují klonální delecii, editaci receptoru nebo anergii (Ashour a Seif 2007).

1.3.3 Imunoprivilegované oblasti jako zvláštní případ tolerance

Jsou to určitá místa v těle, která jsou schopna tolerovat přítomnost cizích antigenů. Plně alogenní tkáň může být do nich transplantována bez rizika odmítnutí. v důsledku toho nedojde k poškození tkáně či orgánu, které by mohla způsobit imunitní reakce vyvolaná těmito antigeny. Mezi tato místa patří přední komora očí, mozek, varlata, děloha nesoucí plod a také lícní váček u křečků. Dříve se myslelo, že tato tolerance je způsobena izolací těchto míst různými bariérami a tedy nepřístupností pro efektorové buňky imunitního systému. Ale bylo dokázáno, že cizí antigeny mohou vyvolat v imunoprivilegovaných místech specifickou imunitní odpověď (Streilein 1995).

2. Cíle práce

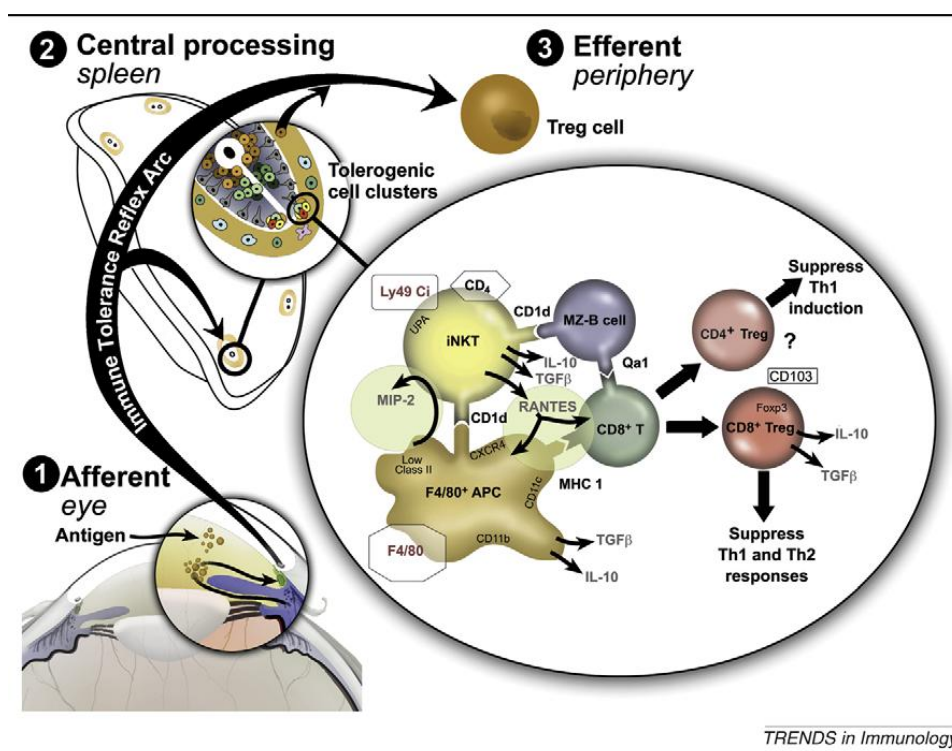
Srovnání imunoprivilegovaných míst a mechanismů navození imunotolerance za fyziologických podmínek s navozením imunotolerance u nádorů. Možnosti prolomení imunotolerance u nádorů.

Úloha vrozené imunity ve vztahu nádor-hostitel. Možnosti využití stimulace vrozené imunity pro imunoterapii nádorových onemocnění.

3. Mechanismy navození tolerance u jednotlivých imunoprivilegovaných míst

3.1 Přední komora oční

Privilegovaného stavu tohoto místa je z velké části dosaženo supresí DTH reakce, která je vyvolána presentací aloantigenů do přední komory oční. Místní F4/80 APC buňky opustí oko, vstoupí do krevního řečiště a nesou imunitní signál do sleziny. Za 1 týden se objeví regulační T buňky, které vytvoří antigen specifickou supresi DTH. Tento mechanismus se nazývá ACAID (Streilein 2008), viz Obr. 3.



Obr. 3: Reflexní oblouk imunitní tolerance oka. Zpracování antigenu (Streilein 2008).

Mnoho antigenů vyvolává ACAID, TSTA naopak vyvolávají silnou DTH reakci (Benson a Niederkorn 1992). k pochopení imunitních odpovědí oka na přítomnost cizího antigenu je také nutné brát v úvahu mnoho překrývajících se mechanismů, které přispívají k ustavení a udržování privilegovanosti.

Mechanismy imunitní privilegovanosti oka:

- oko je vyplněno imunosupresivními faktory zahrnující neuropeptidy, α MSH, somatostatin, vazomotorní střevní peptid, peptid vázaný na gen pro kalcitonin, cytokiny (TGF β -2), inhibitory komplementu (CRP) a inhibitory aktivity NK buněk (MIF),
- nízká exprese MHC II limitující prezentaci antigenu,
- stromální buňky duhovky, řasnatého tělesa a sítnice jsou schopny přeměnit t buňky na Treg buňky, navíc buňky RPE jsou schopny přímo inhibovat primované t buňky,
- molekuly jako PDL-1 a FasL, které jsou exprimovány stromálními buňkami oka, indukují apoptosu buněk (Streilein 2008),
- IDO enzym ovlivňuje katabolismus tryptofanu, který je důležitou aminokyselinou pro přežití t buněk (Chen et al. 2006).

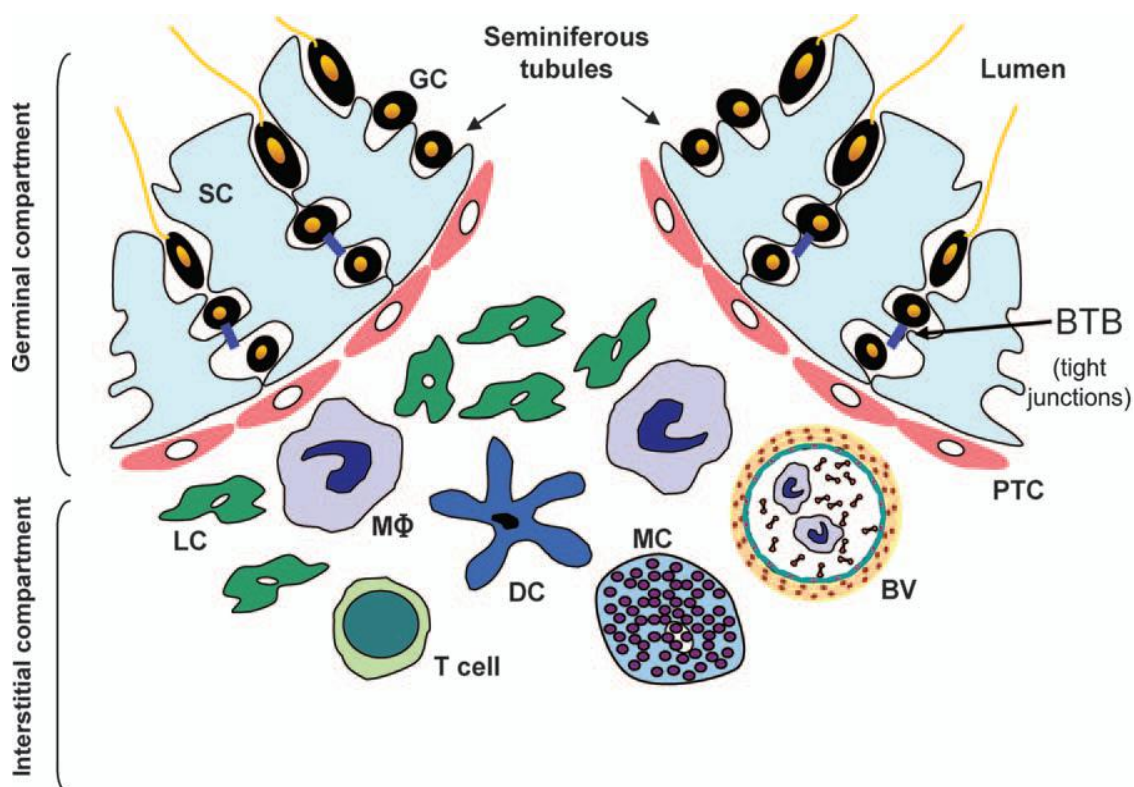
3.2 Mozek

Mozek je důležitý orgán pro přežití a proto musí být chráněn před patogeny. Imunoprivilegovanost tohoto orgánu se vysvětlovala izolací od imunitního systému pomocí BBB, nedostatkem lymfatických kanálů a imunitní nekompetentností mikroglíí (makrofágy v CNS). Nedávná data ale ukázala, že CNS není izolována a ani není pasivní v interakcích s imunitním systémem (Carson et al. 2006). Podobně jako u přední komory oční se v CNS uplatňuje odchylná reakce na antigen (BRAID). Po vpravení antigenu do mozku dojde k potlačení antigen specifické DTH reakce. Ale mechanismy BRAID se liší od mechanismů ACAID. Neuplatňuje se slezina, ale buňky izolované z krčních uzlin. Ty mohou adoptivně přenést BRAID. (Wenkel 2000).

Nedostatečná prezentace antigenu v důsledku nízké exprese MHC molekul a kostimulačních molekul, přímé imunosupresivní působení neuronů na gliové buňky a produkce imunosupresivních cytokinů astrocyty a neurony jsou dalšími faktory podílejícími se na privilegovanosti (Roitt et al. 2006).

3.3 Varlata

Imunologická tolerance je ustanovena už před narozením člověka. Přítomné antigeny jsou považovány za vlastní. Antigeny, které se vyskytnou později jsou označovány jako cizí. Proti těmto cizím antigenům by měla vzniknout imunitní odpověď. Během puberty zárodečné buňky ale zahajují program, který vede ke vzniku spermií. Během tohoto procesu se na povrchu zárodečných buněk tvoří řada nových, pro organismus cizích molekul. Varlata ale mají schopnost tolerovat tyto cizí antigeny. Opět se zde vyskytuje více faktorů, které se podílejí na imunoprivilegovanosti tohoto orgánu. Nejznámější z nich je BTB. Je charakterizována těsným spojením mezi sousedícími Sertoliho buňkami, viz Obr. 4. Je tak regulován vstup větších hydrofilních molekul obzvláště proteinů.



Obr. 4: Morfologie varlat (Fijak a Meinhardt 2006).

Androgeny hrají roli v inhibici exprese prozánětlivých cytokinů a posouvají rovnováhu cytokinů k tolerantnějšímu prostředí. Žírné buňky hrají roli v indukci a zesílení imunitních reakcí. Tím, že nedochází k jejich aktivaci, je udržována imunitní privilegovanost (Fijak

a Meinhardt 2006). Produkce imunosupresivních molekul Sertoliho buňkami (hlavně IL-6, který působí na aktivaci T a B lymfocytů) a exprese FasL (zprostředkovává buněčnou smrt) jsou dalšími mechanismy, které přispívají k imunotoleranci (Filippini et al. 2001).

3.4 Lícní váček křečka

Je zřejmé, že lícní vak je bez lymfatických cév. Areolární pojivová tkáň (hlavní vrstva membrány lícního váčku) je zodpovědná za imunitní privilegovanost (Shepro et al. 1963, Billingham 1960).

3.5 Těhotenství: placenta, plod a děloha

Těhotenství je unikátní událostí, kdy geneticky a imunologicky částečně cizí plod (polovina genomu je otcovská) přežívá, aniž by byl odmítnut imunitním systémem matky. Nejdůležitější roli v přežívání hrají buňky trofoblastu (cytotrofoblastu). Ty na svém povrchu exprimují jiný typ HLA molekul (HLA G a HLA E). Takže mateřské T lymfocyty je sice rozpoznají, ale místo zahájení imunologické reakce, která by vedla k destrukci, dochází pouze k supresi. Ačkoliv by měly být buňky trofoblastu zničeny mateřskými NK buňkami, nedochází k tomu. v děloze matky se nachází speciální NK buňky. Buňky cytotrofoblastu vylučují chemokiny (MIP-1 α), které ovlivňují vznik těchto NK buněk. Na povrchu NK buněk se nachází specifické inhibiční receptory. Ty se váží s HLA G a tak nedochází k odmítnutí plodu (Poole a Claman 2004).

Plod je relativně izolován od imunitního systému matky.

Na buňkách lidské placenty byly identifikovány proteiny rodiny B7. Jsou to transmembránové proteiny, které interagují s receptory rodiny CD28. Poskytují kostimulační signál k iniciaci primární odpovědi T-lymfocytů. PD-1 je jedním z CD28 inhibičních receptorů. Ten je in vivo exprimován na aktivovaných T buňkách a je kriticky důležitý v udržování imunologické tolerance.

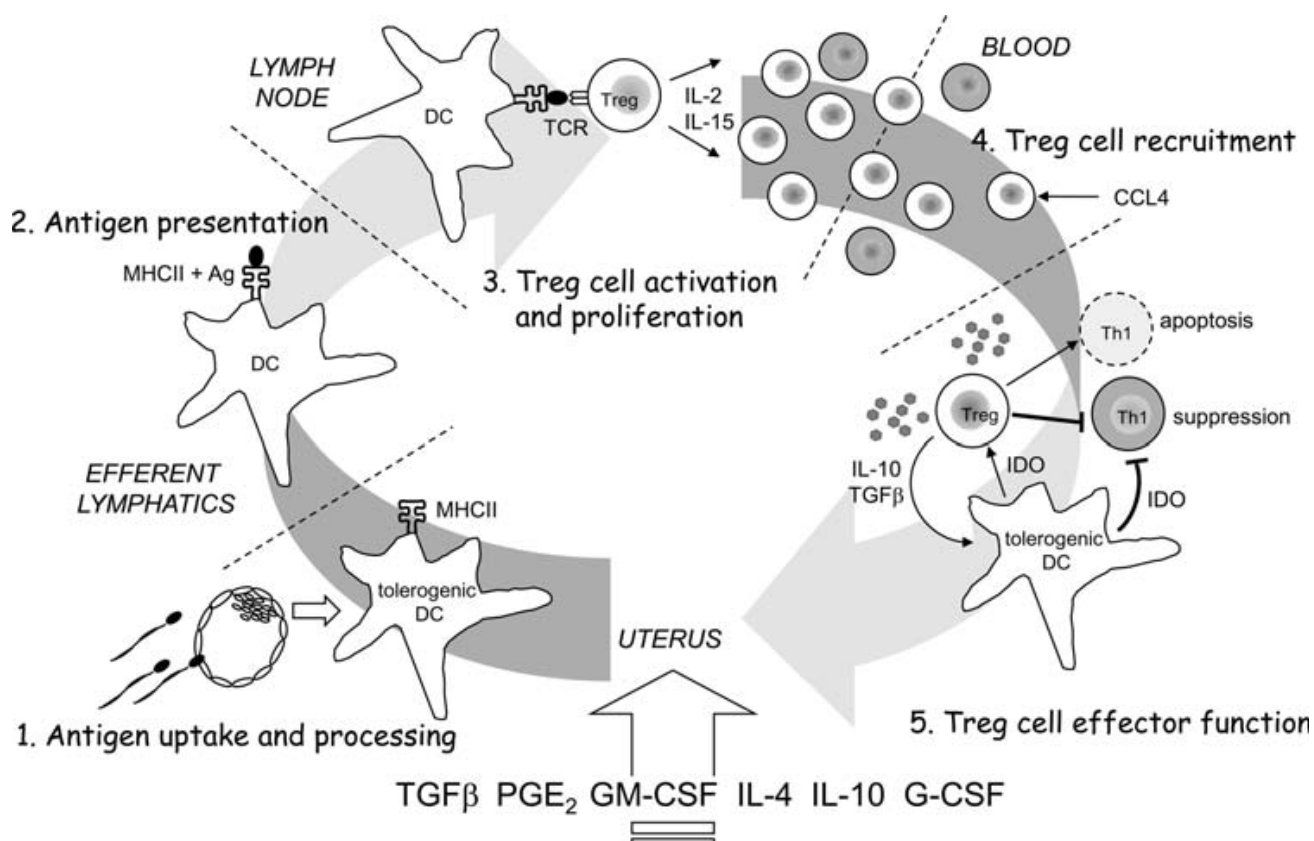
IDO je tryptofan katabolizující enzym exprimovaný trofoblastem. Degradace tryptofanu, produkce toxických metabolitů, posměnění APC buněk a Treg jsou mechanismy, které vyvolávají supresi t buněk. Chemickou inhibicí IDO dojde u myši k T-buněčně závislému odmítnutí semialogenních plodů. Genetickou eliminací IDO však k odmítnutí nedošlo. Tento enzym také chrání Treg buňky před útokem imunitního systému, které jsou velmi důležité v úspěšném těhotenství (Petroff 2005).

Buňky trofoblastu vytváří FasL. Interakcí s receptory na mateřských lymfocytech dochází k apoptóze těchto lymfocytů. To by mohlo přispívat k imunitní privilegovanosti placenty během těhotenství. Mutace v lpr (defekt ve funkci FasL) neměla žádný vliv na výsledek těhotenství. Ale u myši gld (postrádají fungující FasL) došlo k extensivní infiltraci lymfocytů a buněčné smrti na rozhraní placenty a decidua (Kanellopoulos-Langevin et al. 2003).

Makrofágy mají také svůj podíl na úspěšném průběhu těhotenství. Klasicky aktivované makrofágy produkují prozánětlivé cytokiny (IL-1, IL-6, IL-12) a aktivují Th1 buňky. v placentě se ale nachází alternativně aktivované makrofágy, které produkují cytokiny jako IL-10 a antagonistu IL-1-R. Tím snižují zánětlivou odpověď a inhibují aktivaci Th1 buněk.

Crry (komplementový receptor související s genem/proteinem Y) je další cestou, jak je regulováno úspěšné těhotenství. Je to inhibitor C3 a C4 komponenty v komplementové kaskádě. Narušení tohoto inhibitoru v trofoblastu a obklopující tkáni decidua vedlo k progresivnímu zhoršení myších embrií a nakonec k smrti plodu (de Lemos 2002).

Studie na myších modelech ukázaly, že u normálního těhotenství přiměřené působení Treg buněk způsobí potlačení útoku mateřských Th1 buněk na semialogenní zárodek. Přítomnost Treg buněk je nezbytná v prvních dnech těhotenství a také v době před implantací embrya. Mechanismy, kterými Treg buňky vyvíjejí potlačující reakce jsou nyní ve stadiu určování. Jako všechny t buňky i Treg buňky, aby byly schopné vykonávat supresivní funkci, musí být aktivovány, viz Obr. 5. k aktivaci je nutné setkání TCR s příbuzným antigenem a přítomnost IL-2. Antigenem řízená proliferace je zřejmá v lymfatických uzlinách dělohy a může se také vyskytovat ve tkáni decidua, kde je hojné množství zralých myeloidních DC buněk schopných prezentovat antigeny buněk trofoblastu.



Obr. 5: Model klíčových kroků aktivace a expanze Treg buněk, získání supresivní funkce vedoucí k toleranci mezi matkou a plodem (Guerin et al. 2009).

3.6 Mechanismy navození tolerance nádoru

Interakce mezi imunitním systémem a maligními buňkami hraje významnou roli při vzniku nádorů. Selhání imunitního systému v rozpoznání a odmítnutí transformovaných buněk může vést k rozvoji rakoviny. Nádory využívají velmi mnoho způsobů, jak předejít odmítnutí imunitním systémem (Igney a Krammer 2002).

3.6.1 Mechanismy úniku nádorů před imunitním systémem

Předpokládáme, že nádorové buňky produkují proteiny, které normální buňky nevytvářejí. Tyto proteiny nazýváme TAA a TSA. Předpokladem pro rozpoznání TAA nebo TSA je jejich prezentace prostřednictvím MHC třídy I. Bylo dokázáno, že mnoho nádorových buněk

exprimuje na svém povrchu méně MHC i v porovnání s normální tkání, ze které vznikly. Tak nedochází k lýzi transformovaných buněk zprostředkované CTL (Bubanovic 2004).

Mnoho důkazů ukazuje, že NK buňky přednostně napadají buňky, jejichž exprese MHC i je snížena nebo zcela zrušena. Nádorové buňky se před nimi brání zvýšenou expresí proteinu HLA-G. Je to unikátní, neklasická (třída Ib) MHC molekula třídy I. Interakcí HLA-G a inhibičních receptorů NK buněk (LIR-2 a KIR2DL4) dochází k inhibici cytolyzy NK buňkami. Navíc HLA-G může nepřímo přispívat k potlačení cytolyzy, zprostředkované NK buňkami, prostřednictvím zvýšené regulace HLA-E (Sheu a Shih 2010).

Kromě KIR receptorů mají NK buňky ještě dvě isoformy lektinu podobných receptorů CD94/NKG2A a CD94/NKG2B. Receptory NKG2 strukturu MHC i rozpoznávají nepřímo, specificky váží rozštěpený peptid z vedoucích sekvencí molekul třídy Ia, vázaných ve žlábků molekul třídy Ib. Třída Ib u lidí je HLA-E. v případě chybějícího MHC i může nastat zabíjení NK buňkami (Diefenbach a Raulet 2001).

U mnoha typů rakoviny byla demonstrována exprese FasL. Exprese FasL na povrchu t lymfocytů je důležitá ve zprostředkování buněčné smrti nádorových buněk, vytvářejících Fas. Nicméně mnoho rakovinných buněk si vyvinulo odolnost proti Fas/FasL zprostředkované apoptóze. Exprese FasL na nádorových buňkách spolu s faktem, že mnoho nádorů je odolných proti Fas/FasL zprostředkované apoptóze, podporuje hypotézu, že nádory používají FasL ke spuštění preventivního útoku proti aktivovaným t lymfocytům jako cestu, jak se vyhnout svému zničení. a tudíž FasL pomáhá nádorovým tkáním být imunoprivilegovaným místem. Několik studií ale ukázalo, že FasL na nádorových buňkách může být prozánětlivý. Transplantované nádorové buňky, které vyjadřují FasL byly rychle odmítnuty u myši, v porovnání s nádory, nemající tuto molekulu. Odmítnutí bylo většinou způsobeno infiltrací neutrofilů. Nicméně různé nádory tvoří různé mikroprostředí, charakterizované přítomností nebo chyběním různých cytokinů. Jedna studie ukázala, že přidáním TGFβ1 do nádorového mikroprostředí zabránilo útoku neutrofilů na nádor (Lu B. et Finn 2008).

Rakovinné buňky produkují množství cytokinů a chemokinů, které mají potlačující účinek na buňky imunitního systému. Neodpovídavost imunitního systému u pacientů s rakovinou je přisuzována vylučování imunopresivních cytokinů. IL-10 má schopnost inhibovat aktivaci

imunitních buněk mnoha způsoby, jako je třeba inhibice prezentace antigenů a tvorba IL-12. IL-10 také inhibuje diferenciaci, zrání a funkci dendritických buněk a také zvyšuje spontánní apopózu a interferuje tak s indukcí protinádorové odpovědi. IL-10 chrání rakovinné buňky před CTL snížením HLA třídy I, II a ICAM-I. TGF- β je dalším cytokinem, který inhibuje aktivaci, proliferaci a aktivitu lymfocytů. Může také indukovat produkci IL-10. PGE₂ je dalším faktorem, který je exprimován nádorovými buňkami. Zvyšuje produkci IL-10 makrofágy a inhibuje produkci IL-12 (Kim et al. 2005).

Dalším mechanismem, který je zodpovědný za snížení odpovědi t buněk (CD4+CD25- a CD8+) proti nádorům je přítomnost regulačních buněk (Treg). Objevuje se stále více důkazů o jejich přítomnosti i v periferní krvi a během infiltrace nádorů lymfocyty. Treg buňky jsou obecně charakterizovány fenotypem CD4+CD25+. Mohou vznikat přirozeně selekcí v thymu nebo indukci v periférii s expresí markeru CD25 po imunosupresivním působení cytokinů IL-10, TGF- β nebo obou současně. Na rozdíl od myši u člověka je exprese CD25 variabilní. v současné době se k indentifikaci Treg buněk používá jejich specifický marker transkripční faktor foxp3 (Assudani et al. 2007).

3.7 Srovnání mechanismů zajišťujících toleranci u jednotlivých imunoprivilegovaných míst

Tab. I: Tabulka některých mechanismů tolerance u imunoprivilegovaných míst a u nádorů, pokus o srovnání

Oko	Mozek	Trofoblast	Varlata	Nádor
ACAID	BRAID	HLA G		HLA G
Nízká exprese MHC	Nízká exprese MHC a kostimulačních molekul	Vliv MIP-1 α na vznik speciálních NK buněk	Inhibice prozánětlivých cytokinů androgeny	Nízká exprese MHC
Treg		Treg		Treg
Blood-ocular barrier	Blood-brain barrier	Relativní oddělení od imunitního systému matky	Blood testis barrier	
PD-L1 poskytující kostimulační signál T-lymfocytům	Přímé imunosupresivní působení neuronů na gliové buňky	PD-L1 poskytující kostimulační signál T-lymfocytům	Potlačení aktivace žírných buněk	
		Alternativně aktivované makrofágy, produkující IL10	Produkce IL-6	Produkce TGF-beta, IL-10, IL12
		Crry inhibitor složek komplementu		

Tab. II: Tabulka imunosupresivních faktorů imunoprivilegovaných míst (Nieder Korn 2006)

Faktor	Efekt	Oko	Mozek	Trofoblast
TGF- β	potlačuje aktivaci T buněk, NK buněk, makrofágů; vyvolává toleranci indukující APC	ano	ano	ano
IDO	vyčerpává tryptofan a nechává hladovět T buňky	ano	?	ano
SFasL	potlačuje nábor a aktivaci neutrofilů	ano	?	?
CRP	inhibuje komplementovou kaskádu	ano	?	ano
VIP	inhibuje aktivaci a proliferaci T buněk; inhibuje DTH	ano	ano	ano
CGRP	inhibuje zpracování prozánětlivých faktorů makrofágy	ano	ano	ano
SOM	potlačuje produkci inf- γ aktivovanými T buňkami; indukuje produkci α -MSH	ano	ano	ano
α -MSH	inhibuje DTH a uvolňování zánětlivých faktorů makrofágy; inhibuje aktivaci neutrofilů; indukuje CD4+,CD25+ Treg buňky	ano	ano	ano
MIF	potlačuje aktivitu NK buněk	ano	ano	ano

V uvedených tabulkách (Tab. I a Tab. II) můžeme jasně vidět, že mnoho mechanismů přispívajících k navození imunologické tolerance je shodných. Analýzou patologických stavů, kdy dojde k prolomení těchto mechanismů u přední komory oční, mozku, varlat a trofoblastu, bychom mohli najít způsob, jak prolomit i stav nádorové tolerance.

4. Mechanismy porušení tolerance u jednotlivých imunoprivilegovaných míst

4.1 Oko

U rd myší starších 12 měsíců byla pozorována ztráta kapacity nitrooční tekutiny k podpoření ACAID, která měla být vyvolána vstříknutím rozpustného bílkovinného antigenu. Porovnáním různých myší s degenerací sítnice a myší starších než 12 měsíců bylo dokázáno, že věk ani degenerace sítnice nejsou příčinou zrušení ACAID. u starších rd myší byla ztráta ACAID doprovázena značným snížením hladin TGF- β 2 v nitrooční tekutině (Welge-Lüben et al. 1999).

Během zkoumání interakcí hostitele a různých nádorových linií, spadajících do kategorie tkání s více menšinovými H nekompatibilitami, byla prodloužená privilegovanost pozorována u všech histologických kategorií nádorů s výjimkou t buněčných lymfomů. Navíc kapacita těchto nádorů, udržovat imunitní privilegovanost, může být zrušena, když je t lymfom vpraven do přední komory oka. Tento efekt je přisuzován lymfokinům, vylučovaným nádorem, jako je IL-2. v jeho přítomnosti došlo k rozvinutí DTH reakce (Nieder Korn a Streilein 1986).

Buňky P815 (mastocytom) vpravené Balb/c myším bez sleziny do přední komory oční místo ACAID vyvolaly silnou DTH reakci. Nitrooční nádor tak podstupuje imunitní odmítnutí, charakterizované ischemickou nekrózou, která vyústuje v atrofii postiženého oka. Tato forma vyústění není jedinečná u aloštěpů alogenních nádorů, vyskytuje se také u vysoce imunogenních syngenních nádorů. P91 (mutant mastocytomu P815) exprimuje silné tumorspecifické antigeny, které vyvolávají silné DTH odpovědi po nitrooční transplantaci DBA/2 myším i v přítomnosti netknuté sleziny. Imunitní odmítnutí i v tomto případě vyústuje v atrofii (Nieder Korn 2009).

Druhá cesta, kdy dojde k odmítnutí nádoru, je nezávislá na DTH reakci a nezpůsobuje vedlejší zranění očních tkání. Ad5E1 je adenovirem transformovaná nádorová buněčná linie. Odmítnutí imunitním systémem je závislé na CD4+ t buňkách a INF- γ , ale nevyžaduje CD8+ cytotoxické lymfocyty, perforin, TNF- α , NK buňky, B buňky ani FasL (Wang et al. 2003).

Nitrooční záněty EIU (endotoxinem indukovaná uveitida) a EAU (experimentální autoimunní uveoretinitida) jsou schopny narušit důležité parametry imunitní privilegovanosti, od prolomení bariéry krev-oko, přes ztrátu imunosupresivního mikroprostředí až po zrušení ACAID - u myši s EAU po vpravení ovalbuminu (Ohta et al. 1999).

4.2 Mozek

Rostoucí množství důkazů ze studií na hlodavcích naznačuje, že zhroucení imunitní privilegovanosti přispívá ke vzniku roztroušené sklerózy.

Intracerebrálně vpravený IL-12 do CNS indukoval odmítnutí gliomu převážně působením CD8 t buněk nezávisle na působení interferonu γ . Důležitými faktory úspěšného odmítnutí byly místo, trvání a čas exprese IL-12 (Vetter et al. 2009).

4.3 Varlata

Ačkoliv jsou varlata imunoprivilegovaným orgánem, může v nich vzniknout zánět, asociovaný se sníženou plodností nebo neplodností. Experimentální autoimunní orchitis je orgánově specifický model autoimunity, charakterizovaný přítomností infiltrátů intersticiálních lymfomononukleárních buněk a vážným poškozením semenotvorných kanálků vyúsťujícím v aspermatogenezi a neplodnost. Jedním z možných vysvětlení by mohlo být neadekvátní vysoké množství Treg buněk či přítomnost vysokých hladin TNF- α , IL-6 a IL-12, které mohou podstatně zhoršit supresivní funkci Treg buněk (Jacobo et al. 2009).

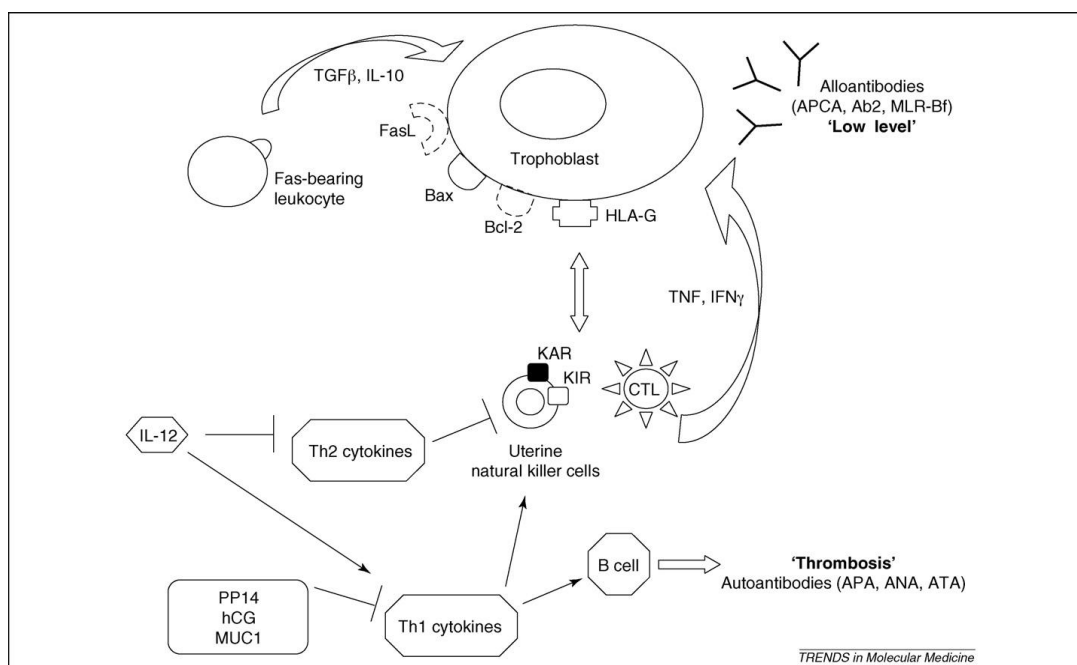
4.4 Trofoblast

V některých případech mohou být mechanismy imunitní tolerance narušeny a může tak dojít k imunologicky zprostředkovanému potratu (IMA). Typ imunologického mechanismu závisí na době, ve které těhotenství probíhá. Za předčasný potrat (do třináctého dne těhotenství) je zodpovědný buňkami zprostředkovaný imunitní mechanismus. Tento mechanismus zahrnuje

imunokompetentní deciduální buňky a jejich produkci rozpustných faktorů nebo cytokinů. Po proniknutí stromatu blastocysty a deciduální reakci děložní tkáně může být IMA způsoben i humorálním mechanismem, produkcí otcovských anti protilátek hlavního histokompatibilního komplexu nebo dokonce autoimunní poruchou, vedoucí k produkci autoprotilátek (antifosolipidové, antinukleární, polyklonální aktivace B buněk) (Giacomucci et al. 1994).

V séru a deciduu pacientů s opakujícím se potratem byly zjištěny zvýšené hladiny cytokinů a rozpustných receptorů pro cytokiny. To naznačuje, že imunitní mechanismus může být důležitý. Efektorová odpověď t buněk může být funkčně rozdělena do dvou podskupin Th1 a Th2. Právě přebytek cytokinů odvozených od Th1 buněk byl dokázán u stimulovaných krevních buněk trofoblastu pacientů s RM. Takovým cytokinem je IL-12. Ten je zásadním pro zrání fenotypu Th1 in vivo a in vitro (Wilson et al. 1997).

Při snížené expresi HLA-G jsou aktivovány Th 1 buňky. Ty uvolňují cytokiny jako $\text{INF-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$, $\text{TNF-}\beta$ a IL-2, které mohou inhibovat růst a metabolickou aktivitu lidského placentárního trofoblastu (Baek et al. 2007), viz Obr. 6.



Obr. 6: Potenciální imunologické mechanismy zapojené v opakované těhotenské ztrátě (Baek et al. 2007).

4.5 Zobecnění poznatků z porušení tolerance u jednotlivých imunoprivilegovaných míst, návrhy pro nádorovou terapii.

Způsobů narušení tolerance není mnoho. Dotýkají se zásahu na úrovni cytokinů, případně jsou prováděny aplikací specifických antigenů s adjuvans (experimentální autoimunní orchitis), nebo vyvoláním zánětu použitím endotoxinu (EIU). Terapie nádorů založená na pokud možno lokální eliminaci TGF-beta nebo blokaci jeho receptorů byla již mnohonásobně studována s částečnými výsledky (Saunier 2006, Penninson a Pasche 2007).

Vzhledem k tomu, že jak z výše uvedeného vyplývá, je tolerance nádorů zabezpečena širokou plejádou regulačních mechanismů zejména na úrovni získané imunity, jeví se jako perspektivnější věnovat se možnosti ataku na úrovni vrozené imunity. Uvedený příklad se silným narušením tolerance a zhroucením celého systému aplikací endotoxinu (lipopolysacharidu) ukazuje na reálnost této cesty.

5. Terapie nádorů stimulací vrozené imunity.

Vrozená imunita byla po mnoho let považována za oddělený subjekt od přirozené imunity a měla druhořadý význam v hierarchii imunitních funkcí. Nedávné studie obrany hostitele proti mikrobiálním patogenům však ukázaly, že typ vytvořené efektorové odpovědi je závislý nejen na získané imunitě ale stejně tak na odpovědi vrozené imunity (Medzhitov a Janeway 1997).

Výše byly popsány některé mechanismy získané imunity, které používají imunotolerantní místa a nádory. Dokáže se s nádory vypořádat imunita vrozená? Na nádorech se nenachází žádné motivy, charakteristické pro bakterie či houby. Proto není důvod, aby vrozená imunita zaútočila. Profesor Cui ale dokázal, že vrozená imunita dokáže rakovinné buňky účinně zničit (viz kapitola 5.2).

Systém vrozené imunity používá k rozpoznání antigenů různé druhy PRR receptorů, které jsou exprimovány na buněčném povrchu, ve vnitrobuněčných oddílech nebo jsou sekretované do krevního řečiště a tkáňových tekutin (Medzhitov a Janeway 2002).

5.1 Pattern recognition receptors

Jejich funkcí je rozpoznat PAMPs, což jsou molekuly nezbytné pro přežití mikrobiálních patogenů, ale nejsou produkovány hostitelem. Rozpoznání těchto vzorů vede k expresi cytokinů, chemokinů a kostimulačních molekul, které odstraní patogeny. Dále k aktivaci APC buněk a ke specifické aktivaci získané imunity (Pedraza et al. 2010).

5.1.1 Druhy PRRs

PRR se dělí na solubilní, signální a fagocytární. Mezi solubilní patří např. CRP a MBL. Do signálních patří třináct TLR receptorů, dále receptory NOD. Do fagocytárních počítáme scavengerové receptory, MR, formyl peptidové receptory a Dectin1 (receptor pro beta glukan) (Gordon et al. 2002, Abrahams 2010, Brown 2005).

5.2 SR/CR myši

Velice zásadním příspěvkem v oblasti úvah o použití vrozené imunity jsou práce týmu prof. Cui Prof. Cui objevil myši s tzv. SR/CR mutací. CR znamená „cancer rezistant“, těmto myším se dosud nepodařilo transplantovat žádnou nádorovou linii, jsou odolé. To se však týká věku do 4 měsíců. Pak se transplantované nádory ujmou, rozrostou, ale záhy dojde k druhému jevu, nádory se spontánně odhojí („spontaneous regression“, SR) (Cui et al. 2003). Nejpozoruhodnější vlastností je, že pomocí NK, PMN i makrofágů lze tuto úžasnou odolnost přenést i na normální myši s nádory. Po přenesení uvedených buněk došlo k vyléčení myši, zmizení nádoru (Hicks et al. 2006). Je tedy zřejmé, že pozoruhodná rezistence SR/CR myši je dána vrozenou imunitou a že vrozená imunita má obrovskou schopnost likvidovat nádory i v pokročilém stádiu vývoje. Jak z prací vyplývá, není tato schopnost u mutantních myši dána nějakou hyperreaktivitou vrozené imunity, ale tím, že buňky vrozené imunity jsou schopny rozpoznat nádorové buňky jako cizí.

Domníváme se, že za zmíněnou mutací SR/CR se skrývá reexprese zapomenutého genu pro nějaký, dosud neznámý TLR. u člověka však zatím nelze upravit jeho genom tak, aby příslušný receptor detekoval nádorové buňky, tak jako je tomu u uvedené mutace. Třeba na to jít z opačného konce, je tedy potřeba navázat agonisty známých TLR receptorů přímo na nádorové buňky, aby mohly být rozpoznány buňkami vrozené imunity. Pouhá přítomnost těchto agonistů v těle podporuje nespecifický zánět, který jako takový nádorový růst pouze podporuje (cytokiny) (Tsan 2006).

5.3 Toll-like receptory

Role těchto receptorů spočívá v aktivaci fagocytů a tkáňových dendritických buněk, na kterých se TLR nachází, aby mohly reagovat na patogeny sekrecí chemokinů a cytokinů a dále v expresi kostimulačních molekul, potřebných k aktivaci získané imunity (Janeway et al. 2005). Reakce vrozené imunity začínají tím, že TLR rozpoznají specifické mikrobiální komponenty, široce exprimovaných bakteriemi, prvoky a viry. Jsou to membránové glykoproteiny typu I, charakterizované cytoplazmickou TIR signální doménou a externí antigen rozpoznávající doménou, zahrnující 19-25 tandemových motivů bohatých na

opakující se leuciny (LRR). u lidí lze rozdělit 10 funkčních TLR podle jejich subcelulární lokalizace. TLR 1, 2, 4, 5, 6 a 10 jsou exprimovány na povrchu buněk, ostatní TLR ve vnitrobuněčných oddílech téměř všech typů buněk, hlavně v endozomech a endoplazmatickém retikulu (Kanzler et al. 2007).

5.3.1 TLR a jejich agonisté

Přehled TLR a jejich agonistů udává Tab. III

Tab. III: TLR a jejich agonisté (Ospelt a Gay 2009).

TLR	Exogenní ligandy
TLR1	Tri-acetylované lipopeptidy, poriny
TLR2	Lipopetidy, peptidoglykany, glykolipidy, polysacharidy, viry, celé bakterie
TLR3	dsRNA
TLR4	LPS (lipid A)
TLR5	flagelin
TLR6	di-acetylované lipopeptidy
TLR7	ssRNA
TLR8	ssRNA
TLR9	CpG DNA
TLR10	?

5.4 Umístění agonisty TLR na povrch nádorových buněk

Prvním způsobem je pomocí transdukce onkolytických virů vnést gen kódující agonistu TLR do nádorových buněk. a zajistit pomocí signálních sekvencí uchycení toho agonisty na membráně nádorových buněk.

Druhým způsobem je na jakéhokoliv agonistu TLR navázat biotin a pomocí onkolytických virů vnést do nádorových buněk gen pro avidin nebo streptavidin. Systém avidin-biotin se využívá pro svoji vysokou afinitu v mnoha oblastech biotechnologií. Avidin a streptavidin jsou mimořádně stabilní molekuly a jejich schopnost vázat biotin může přežít drsné reakční podmínky (Diamandis a Christopoulos 1991). Výhodou této metody je možnost použít více TLR agonistů a možnost je měnit v průběhu terapie. Vnesení genu pro avidin do HeLa buněk bylo již vyzkoušeno, avidin se exprimoval a byl schopen vázat biotin (Walker et al. 1996).

Třetím způsobem je navázat agonistu TLR na jiný vhodný nosič. Jednou z možností je použití poly-L-lysinu jako nosiče. Ten disponuje výrazným kladným nábojem a může se tak vázat na záporný náboj nádorových buněk. Je známý nejen svou biokompatibilitou, ale také snadnou konjugací s bioaktivními molekulami (Li et al. 2009). Na poly-L-lysin je také možné snadno navázat peptidy, začínající formylmethioninem. Tyto peptidy přitahují buňky vrozené imunity (Dürr et al. 2006).

5.5 Jaké agonisty TLR použít?

V případě prvního způsobu by bylo nejlepší volbou použití flagelinu. Oproti ostatním není tak komplikovaný. Jeho molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí od 28600 Da do 63200 Da (McDonough a Smith 1976). Receptor, který ho váže je TLR5 (Feuillet et al. 2006). TLR5 rozpoznává konstantní část molekuly flagelinu (Smith et al. 2003).

U druhého způsobu je možné využít nejrůznější agonisty TLR, jedinou podmínkou je možnost biotinizovat.

Ve třetím případě je důležité, aby nám přenášená molekula příliš neovlivnila celkový náboj. Měla by být malá. Jednou z možností by bylo použití složky beta glukanu, skládající se ze 4-5 glukóz, navázaných beta 1,3 glykosidickou vazbou (Jamois et al. 2005).

5.6 Jaké onkolytické viry použít?

Měly by být nepatogenní, se zachovanou možností replikace a přednostně se množit v nádorových buňkách. v úvahu připadá atenuovaný Newcastle disease virus (Galanis et al. 2001). Ten se 10 000 krát lépe množí v nádorových buňkách než v buňkách normálních (Bar-Eli et al. 1996). Použit by se mohl i Sendai virus citlivý na trypsin. Pomocí trypsinogenu by se dalo dosáhnout většího zesílení targetingu, v důsledku aktivace v místě nádoru. Byly provedeny účinné genové transdukce do primárně kultivovaných buněk a tkání (Yonemitsu et al. 2000, Masaki 2001). Je považován za nepatogenní pro člověka a navíc se replikuje v cytoplasmě a nepředstavuje riziko integrace do genomické DNA (Huang 2009).

Pomocí těchto virů je třeba příslušné geny vpravit do nádorových buněk, zařídit jejich expresi a vyloučení a ukotvení proteinu v membráně.

5.7 Uspořádání in vivo experimentu

Aby se viry účinně dostaly do nádorových buněk a nebyly předčasně likvidovány, potlačila by se imunita hostitele podáním cyklofosfamidu (Röllinghoff et al. 1977). Viry nesoucí gen pro agonisty TLR by se vpravily přímo do nádoru, do jeho blízkosti či do zásobující cévy. Dále by se použil trypsinogen, který by nám napomohl lokálně aktivovat jak Sendai virus tak i NDV (Leeuw et al. 2003). Základem bude sledovat transdukcí genů agonistů TLR, aby byly exprimovány na povrchu nádorových buněk. v případě flagelinu bude vnesen přímo gen, v případě avidinu bude následovat aplikace nějakého agonisty TLR (možno i flagelinu) s vázaným biotinem.

6. Závěr

- Imunotolerance v imunoprivilegovaných místech a nádorech je zajištěna existencí širokého rejstříku imunosuprimačních mechanismů, do značné míry identických.
- Je známo jen poměrně malé množství prolomení tolerance v imunoprivilegovaných místech a vzhledem k tomu, že imunotolerance je u nádorů zajištěna současně mnoha způsoby především v rovině získané imunity, jeví se použití těchto poznatků jako nereálné.
- Dojde-li k tomu, že vrozená imunita rozezná nádor jako cizí, je schopna ho s neobyčejnou intenzitou zlikvidovat.
- Vzhledem k tomu, že vrozená imunita zpravidla nedokáže nádor definovat jako cizí, nabízí se možnost nádor pro vrozenou imunitu identifikovat instalací PAMPs.
- Jsou diskutovány vhodné molekulární motivy a způsoby jejich instalace na nádorové buňky s cílem vyvolání cíleného a účinného imunitního útoku.

7. Seznam použité literatury

- Abrahams V. M. 2010.** The role of the Nod-like receptor family in trophoblast innate immune responses. *Journal of reproductive immunology*. 88:112-117.
- Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 1998.** Základy buněčné biologie. *Espero publishing s.r.o. Praha*. ISBN 80-902906-2-0.
- Ashour H. M., Seif T. M. 2007.** The role of B cells in the induction of peripheral t cell tolerance. *Journal of leukocyte biology*. 82:1033-1039.
- Assundani D. P., Horton R. B., Mathieu M. G., McArdle S. E., Rees R. C. 2007.** The role of CD4+ t cell help in cancer immunity and the formulation of novel cancer vaccines. *Cancer immunology and immunotherapy*. 56:70-80.
- Baek K., Lee E., Kim Y. 2007.** Recurrent pregnancy loss: the key potential mechanisms. *Trends in molecular medicine*. 13:310-317.
- Bandhyopadhyay S., Soto-Nieves N., Macián F. 2007.** Transcriptional regulation of t cell tolerance. *National institutes of health*. 19:180-187.
- Bar-Eli, Giloh H., Schlesinger M., Zakay-Rones Z. 1996.** Preferential cytotoxic effect of Newcastle disease virus on lymphoma cells. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 122:409-415.
- Benson J. L., Niederkorn J. Y. 1992.** Immune privilege in the anterior chamber of the eye: alloantigens and tumor-specific antigens presented into the anterior chamber simultaneously induced suppression and activation of delayed hypersensitivity to the respective antigens. *Immunology*. 77:189-195.
- Billingham R. E., Ferrington L. W., Silvers W. K. 1960.** Cheek pouch of the Syrian hamster and tissue transplantation immunity. *Science*. 139:1488.
- Brown G. D. 2005.** Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nature reviews immunology*. 6:33-43.

Bubanovic I. 2004. Origin of anti-tumor immunity failure in mammals. *Kluwer academic/plenum publishers*. ISBN 0-306-48630-X.

Campbell N. A., Reece J. B. 2008. Biology. *Benjamin Cummings*. ISBN 0-805-368-442.

Cui Z., Willingham M. C., Hicks A. M., Alexander-Miller M. A., Howard T. D., Hawkins G. A., Miller M. S., Weir H. M., Du W., DeLong C. J. 2003. Spontaneous regression of advanced cancer: identification of a unique genetically determined, age-dependent trait in mice. *Proceeding of the national academy of the national sciences*. 100:6682-6687.

Carson M. J., Doose J. M., Melchior B., Ploix C. C. 2006. CNS immune privilege: hiding in plain sight. *National institutes of health*. 213:48-65.

De Lemos M. 2002. How your mother tolerated you for nine months. *BioTeach online journal*. 1:27-30.

Diamandis E. P., Christopoulos T. K. 1991. The biotin-(strep)avidin system: principles and applications in biotechnology. *Clinical chemistry*. 37:625-636.

Diefenbach A., Raulet D. H. 2001. Strategies for target cell recognition by natural killer cells. *Immunological reviews*. 181:170-184.

Dürr M. C., Kristian S. A., Otto M., Matteoli G., Margolis P. S., Trias J., van Kessel K. P., van Strijp J. A., Bohn E., Landmann R., Peschel A. 2006. Neutrophil chemotaxis by pathogen-associated molecular patterns – formylated peptides are crucial but not the sole neutrophil attractants produced by *Staphylococcus aureus*. *Cellular microbiology*. 8:207-217.

Ferenčík M., Rovenský J., Mat'ha V. 2004. Ilustrovaný imunologický slovník. *Galén*. ISBN 80-7262-243-9.

Feuillet V., Medjane S., Mondor I., Demaria O., Pagni P. P., Galán J. E., Flavell R. A., Alexopoulou L. 2006. Involvement of Toll-like receptor 5 in the recognition of flagellated bacteria. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*. 103:12487-12492.

Fijak M., Meinhardt A. 2006. The testis in immune privilege. *Immunological reviews*. 213:66-81.

Filippini A., Riccioli A., Padula F., Lauretti P., D'Alessio A., De Cesaris P., Gandini L., Lenzi A., Ziparo E. 2001. Immunology and immunopathology of the male genital tract. Control and impairment of immune privilege in the testis and in semen. *Human reproduction*. 7:444-449.

Galanis E., Vile R., Russell S. J. 2001. Delivery systems intended for in vivo gene therapy of cancer: targeting and replication competent viral vectors. *Critical reviews in oncology/hematology*. 38:177-192.

Giacomucci E. 1994. Immunologically mediated abortion (IMA). *The journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 49:107-121.

Gordon S. 2002. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell press*. 111:927-930.

Guerin L. R. 2009. Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: a new target for infertility treatment? *Human reproduction update*. 15:517-535.

Hicks A. M., Riedlinger G., Willingham M. C., Alexander-Miller M. A., Kap-Herr C. V., Pettentati M. J., Sanders A. M., Weir H. M., Du W., Kim J., Simpson A. J. G., Old L. J., Cui Z. 2006. Transferable anticancer innate immunity in spontaneous regression/complete resistance mice. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*. 103:7753-7758.

Hořejší V., Bartůňková J. 1998. Základy imunologie. *Triton*. ISBN 80-85875-73-X.

Huang J., Inoue M., Hasegawa M., Tomihara K., Tanaka T., Chen J., Hamada H. 2009. Sendai viral vector mediated angiopoietin-1 gene transfer for experimental ischemic limb disease. *Angiogenesis*. 12:243-249.

Chen X. 2006. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is involved in promoting the development of anterior chamber-associated immune deviation. *Immunology letters*. 107: 140-147.

- Igney F. H., Krammer P. H. 2002.** Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *Journal of leukocyte biology*. 71:907-920.
- Jacobo P., Guazzone V. A., Jarazo-Dietrich S., Theas M. S., Lustig L. 2009.** Differential changes in CD4+ and CD8+ effector and regulatory t lymphocyte subsets in the testis of rats undergoing autoimmune orchitis. *Journal of reproductive immunology*. 81:44-54.
- Jamois F., Ferrières V., Guégan J. P., Yvin J. C., Plusquellec D., Větvicka V. 2005.** Glucan-like synthetic oligosaccharides: iterative synthesis of linear oligo- β -(1,3)-glucans and immunostimulatory effects. *Glycobiology*. 15:393-407.
- Janeway Ch. A., Travers P., Walport M., Shlomchik M. J. 2005.** Immunobiology: the immune system in health and disease. *Garland publishing*. ISBN 0-8153-4101-6.
- Kanellopoulos-Langevin C., Caucheteux S. M., Verbeke P., Ojcius D. M. 2003.** Tolerance of the fetus by the maternal immune system: role of inflammatory mediators at the fetomaternal interface. *Reproductive biology and endocrinology*. 1:121.
- Kanzler H., Barrat F. J., Hessel E. M., Coffman R. L. 2007.** Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nature medicine*. 13:552-559.
- Kim R., Emi M., Tanabe K. 2005.** Cancer cell immune escape and tumor progression by exploitation of anti-inflammatory and pro-inflammatory responses. *Cancer biology & therapy*. 4:924-933.
- Krejsek J., Kopecký O. 2004.** Klinická imunologie. *Nucleus HK*. ISBN 80-86225-50-X.
- Kuby J., Kindt T. J., Goldsby R. A., Osborne B. A. 2007.** Kuby immunology. *W. H. Freeman*. ISBN 1-4292-0211-4.
- Leeuw O. S., Hartog L., Koch G., Peeters B. P. H. 2003.** Effect of virus cleavage site mutations on virulence of Newcastle disease virus: non-virulent cleavage site mutants revert to virulence after one passage in chicken brain. *Journal of general virology*. 84: 475-484.

Li R., Cui X., Lu Z., Li C. M. 2009. Fabrication of oriented poly-L-lysine/bacteriorhodopsin-embedded purple membrane multilayer structure for enhanced photoelectric response. *Journal of colloid and interface science*. 344:150-157.

Liu B., Nash J., Runowitz C., Swede H., Stevens R., Li Z. 2010. Ovarian cancer immunotherapy: opportunities, progresses and challenges. *Journal of hematology & oncology*. 3:1-11.

Lu B., Finn O. J. 2008. T-cell death and cancer immune tolerance. *Cell death and differentiation*. 15:70-79.

Masaki I., Yonemitsu Y., Komori K., Ueno H., Nakashima Y., Nakagawa K., Fukumura M., Kato A., Hasan M. K., Nagai Y., Sugimachi K., Hasegawa M., Sueishi K. 2001. Recombinant Sendai virus-mediated gene transfer to vasculature: a new class of efficient gene transfer vector to the vascular system. *The journal of the federation of american societies for experimental biology*. 15:1294-1296.

McDonough M. W., Smith S. E. 1976. Molecular weight variation among bacterial flagellins. *Microbios*. 16:49-59.

Medzhitov R., Janeway Ch. A. 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Current opinion in immunology*. 9:4-9.

Medzhitov R., Janeway Ch. A. 2002. Innate immune recognition. *Annual review of immunology*. 20:197-216.

Mitra R., Singh S., Khar A. 2003. Antitumor immune responses. *Expert reviews in molecular medicine*. 5:1-22.

Miyagawa F., Gutermuth J., Zhang H., Katz S. I. 2010. The use of mouse models to better understand mechanisms of autoimmunity and tolerance. *Journal of autoimmunity*. 35:192-198.

Niederhorn J. Y. 2006. See no evil, hear no evil, do no evil: the lessons of immune privilege. *Nature immunology*. 7:354-359.

- Nieder Korn J. Y. 2009.** Immune escape mechanisms of intraocular tumors. *Progress in retinal and eye research.* 28:329-347.
- Nieder Korn J. Y., Streilein J. W. 1986.** Lymphoma allografts abrogate immune privilege within the anterior chamber of the eye. *Investigative ophthalmology & visual science.* 27:1235-1243.
- Ohta K., Wiggert B., Taylor A. W., Streilein J. W. 1999.** Effects of experimental ocular inflammation on ocular immune privilege. *Investigative ophthalmology & visual science.* 40:210-218.
- Ospelt C., Gay S. 2009.** TLRs and chronic inflammation. *The international journal of biochemistry & cell biology.* 42:495-505.
- Pedraza S. T., Betancur J. G., Urcuqui-Inchima S. 2010.** Viral recognition by the innate immune system: the role of pattern recognition receptors. *Colombia médica.* 41:377-387.
- Penninson M. a Pasche B. 2007.** Targeting transforming growth factor- β signaling. *Current opinion in oncology.* 19:579-585.
- Petroff G. M. 2005.** Immune interaction at the maternal-fetal interface. *Journal of reproductive immunology.* 68:1-13.
- Poole A. J., Claman H. N. 2004.** Immunology of pregnancy: Implications for the mother. *Clinical reviews in allergy and immunology.* 26:161-170.
- Roitt I., Male D., Brostoff J., Roth D. B. 2006.** Immunology seventh edition. *Mosby elsevier.* ISBN 0-323-03399-7.
- Röllinghoff M., Starzinski-Powitz A., Pfizenmaier K., Wagner H. 1977.**
Cyclophosphamide-sensitive t lymphocytes suppress the in vivo generation of antigen-specific cytotoxic t lymphocytes. *The journal of experimental medicine.* 145:455-459.
- Saunier E. F., Akhurst R. J. 2006.** TGF beta inhibition for cancer therapy. *Current cancer drug targets.* 6:565-578.
- Shepro D., Kula N., Halkett A. E. 1963.** The role of the cheek pouch in effecting transplantation immunity in the hamster. *The journal of experimental medicine.* 117:749-754.

- Sheu J., Shih M. 2010.** HLA-G and immune evasion in cancer cells. *Journal of the formosan medical association.* 109:248-257.
- Schvab M. 2008.** Encyclopedia of cancer. *Springer.* ISBN 978-3-540-47648-1.
- Smith K. D., Andersen-Nisse E., Hayashi F., Strobe K., Bergman M. A., Barrett S. L. R., Cookson B. T., Aderem A. 2003.** Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nature immunology.* 4:1247-1253.
- Sprent J., Kishimoto H. 2001.** The thymus and central tolerance. *The royal society.* 356:609-616.
- Streilein J. S. 2008.** Immune regulation and the eye. *Trends in immunology.* 29:548-554.
- Streilein J.W. 1995.** Unraveling immune privilege. *Science.* 270:1158.
- Stříž I., Veselá I. Tegis-old.cz [online]. 2004 [cit. 2011-01-06].** t regulační buňky a jejich úloha v imunitních reakcích. Dostupné z WWW: <<http://www.tegis-old.cz/alergie/aler104/08.htm>>.
- Tsan M. 2006.** Toll-like receptors, inflammation and cancer. *Seminars in cancer biology.* 16:32-37.
- Vetter M., Hofer M. J., Roth E., Pircher H. P., Pagenstecher A. 2009.** Intracerebral interleukin 12 induces glioma rejection in the brain predominantly by CD8+ t cells and independently of interferon-gama. *Journal of neuropathology and experimental neurology.* 68:525-534.
- Walker L., Kulomaa M. S., Bebok Z., Parker W. B., Allan P., Logan J., Huanq Z., Reynolds R. C., King S., Sorscher E. J. 1996.** Development of drug targeting based on recombinant expression of the chicken avidin gene. *Journal of drug targeting.* 4:41-49.
- Wang S., Boonman Z. F. H. M., Li H., He Y., Jager M. J., Toes R. E. M., Niederkorn J. Y. 2003.** Role of TRAIL and IFN- γ in CD4+ t cell-dependent tumor rejection in the Anterior Chamber of the Eye. *The journal of immunology.* 171:2789-2796.

Welge-Lüssen U., Wilsch C., Neuhardt T., Streilein J. W., Lütjen-Drecoll E. 1999. Loss of anterior chamber-associated immune deviation (ACAID) in aged retinal degeneration (rd) mice. *Investigative ophthalmology & visual science*. 40:3209-3214.

Wenkel H. 2000. Systemic immune deviation in the brain that does not depend on the integrity of the blood-brain barrier. *The journal of immunology*. 164:5125-5131.

Wilson R., McInnes I., Leung B., McKillop J. H., Walker J. J. 1997. Altered interleukin 12 and nitric oxide levels in recurrent miscarriage. *European journal of obstetrics and gynecology and reproductive biology*.75:211-214.

Yonemitsu Y., Kitson Ch., Ferrari S., Farley R., Griesenbach U., Judd D., Steel R., Scheid P., Zhu J., Jeffery P. K., Kato A., Hasan M. K., Nagai Y., Masaki I., Fukumura M., Hasegawa M., Geddes G. M., Alton E. W. F. W. 2000. Efficient gene transfer to airway epithelium using recombinant Sendai virus. *Nature biotechnology*.18:970-973.