

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Nádorová imunoterapie založená na kombinaci TLR signalizace
s aktivací fagocytózy. Studium mechanismů a možností dalšího
zesílení účinku**

Bakalářská práce

Gabriela Krejčová

Školitel: RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice 2016

Krejčová, G., 2016: Nádorová imunoterapie založená na kombinaci TLR signalizace s aktivací fagocytózy. Studium mechanismů a možností dalšího zesílení účinku. [Cancer immunotherapy based on combination of TLR signalling with phagocytosis activation. Bc. Thesis, in Czech.] - 54 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The main goal of this thesis was to improve innate immunity cancer immunotherapy based on the use of TLR agonists combined with activation of phagocytosis. Mechanisms of this therapy were studied as well. Therefore the effect of TGF-beta blockade, tumor infiltration, and Th immune response during the immunotherapy were evaluated.

Prohlášení:

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala 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 elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích 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, 22. 4. 2016

.....

Gabriela Krejčová

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Janu Ženkovi, CSc. za vedení této bakalářské práce, cenné rady a jeho nadšení pro věc. Dále děkuji Mgr. Veronice Caisové za její velikou ochotu, pomoc nejen s průtokovým cytometrem, trpělivost a přátelský přístup. V neposlední řadě si zaslouží obrovský dík má rodina a přítel za veškerou podporu po celou dobu mého studia.

1	Úvod	1
1.1	<i>Nádorové onemocnění</i>	<i>1</i>
1.1.1	Vznik nádorového onemocnění.....	2
1.1.2	Základní typy klasifikace nádorového onemocnění.....	2
1.1.3	Melanom	2
1.1.3.1	Melanom B16-F10	3
1.2	<i>Imunitní systém a nádorová onemocnění.....</i>	<i>3</i>
1.2.1	Mechanismy úniku a obrany nádorů před imunitním systémem.....	4
1.2.2	Složky imunitního systému.....	4
1.2.2.1	Vrozená (nespecifická) imunita.....	5
1.2.2.2	Získaná (specifická) imunita	6
1.2.3	Cytokiny a jejich vztah k nádorovému růstu.....	6
1.3	<i>Možnosti protinádorové terapie.....</i>	<i>8</i>
1.4	<i>Pathogen associated molecular patterns.....</i>	<i>11</i>
1.5	<i>Pattern recognition receptors</i>	<i>11</i>
1.5.1	Sekretované PRRs.....	11
1.5.2	Cytosolické PRRs	12
1.5.3	Membránové PRRs	12
1.6	<i>Nádorová imunoterapie založená na kombinaci TLR signalizace s aktivací fagocytózy.....</i>	<i>15</i>
2	Cíle práce	18
3	Materiál a metody	19
3.1	<i>Chemikálie.....</i>	<i>19</i>
3.2	<i>Laboratorní zvířata.....</i>	<i>20</i>
3.3	<i>Buněčné linie</i>	<i>20</i>
3.4	<i>Příprava buněk B16-F10 pro transplantaci.....</i>	<i>20</i>
3.5	<i>Transplantace melanomu B16-F10.....</i>	<i>21</i>
3.6	<i>Měření velikosti nádorů.....</i>	<i>21</i>
3.7	<i>Příprava terapeutických látek.....</i>	<i>21</i>
3.8	<i>Analýza dat</i>	<i>21</i>
4	Experimenty	23
4.1	<i>Terapie melanomu pomocí KLH a bakterie Listeria monocytogenes</i>	<i>23</i>
4.2	<i>Terapie melanomu pomocí KLH a anti TGF-beta.....</i>	<i>23</i>
4.3	<i>Studium nádorové infiltrace při léčbě tzv. komplexní terapií (Listeria monocytogenes-SMCC + Resiquimod.HCl + mannan-SMCC + POLY I:C).....</i>	<i>24</i>
4.4	<i>Analýza Th stavu nádorového prostředí.....</i>	<i>27</i>
4.4.1	Detekce IFN-gamma v supernatantech z nádorového infiltrátu pomocí ELISA.....	27
4.4.2	Detekce IL-10 v supernatantech z nádorového infiltrátu pomocí ELISA	29
5	Výsledky.....	30
5.1	<i>Terapie melanomu pomocí KLH a bakterie Listeria monocytogenes</i>	<i>30</i>
5.2	<i>Terapie melanomu pomocí KLH a anti TGF-beta.....</i>	<i>32</i>
5.3	<i>Studium nádorové infiltrace při léčbě tzv. komplexní terapií (Listeria monocytogenes-SMCC + Resiquimod.HCl + mannan-SMCC + POLY I:C).....</i>	<i>34</i>
5.4	<i>Analýza Th stavu nádorového prostředí.....</i>	<i>37</i>

5.4.1	Detekce IFN-gamma v supernatantech z nádorového infiltrátu pomocí ELISA.....	37
5.4.2	Detekce IL-10 v supernatantech z nádorového infiltrátu pomocí ELISA	38
5.4.3	Poměr IFN-gamma a IL-10 jakožto ukazatel Th stavu v nádoru	39
6	Diskuze.....	40
7	Závěr	43
8	Seznam použité literatury	44

1 Úvod

Nádorová onemocnění patří k nejobávanějším nemocem. V České republice dosáhla v roce 2007 incidence zhoubných nádorů včetně kožních neoplazií hodnoty 736 na 100 000 mužů a 648 na 100 000 žen. Ročně v České republice umírá na rakovinu více než 27 000 jedinců. Nejčastěji je to nádor kolorekta, prsu, plic a prostaty (Dušek a kol., 2010).

Česká republika je celosvětově první na žebříčku incidence kolorektálního karcinomu (59,1 na 100 000 mužů), přičemž dle dat z roku 2005 figuruje Česká republika na 2. místě mortality kolorektálního karcinomu u žen i mužů (Center a kol., 2009).

Kožní melanom, kterému se věnuje i tato bakalářská práce, postihne 19,5 mužů ze 100 000 a 4 na něj zemřou (Dušek a kol., 2010).

V současné době představují malignity druhou nejčastější příčinu smrti ve Spojených státech amerických a předpokládá se, že do několika let předčí srdeční onemocnění jakožto vedoucí příčinu úmrtí (Siegel a kol., 2015).

Klasickými metodami nádorové terapie jsou chirurgie, radioterapie a chemoterapie. Bohužel tyto metody často nevedou k dosažení dostatečných výsledků. Například hojně používaná chemoterapie je spojena se skutečností, že poškozuje nejen rychle se dělící buňky nádorové, nýbrž i ty zdravé. Rakovinné buňky si na používaná cytostatika tvoří tzv. multidrug resistenci a využívají detoxifikačních mechanismů. Metastáze chemoterapii často unikají, jelikož je nejsme schopni účinně zacílit. Proto v dnešní době zažívá svou renesanci imunoterapie, která v sobě skýtá mnoho nových možností léčby, ať už je to např. použití monoklonálních protilátek, cytokinů nebo dendritických buněk vystavených antigennímu pulzu či v současnosti populární blokace tzv. imunitních checkpointů (PD-1, CTLA-4). Imunoterapie totiž představuje vhodný nástroj, jak ničit rakovinu pomocí mechanismů tělu vlastních a proto se i naše laboratoř vydala tímto směrem.

1.1 Nádorové onemocnění

Nádorová onemocnění je souhrnné označení pro soubor mnoha odlišných chorob, avšak roku 2011 formuloval Hanahan a Weinberg několik společných rysů pro všechna neoplastická onemocnění: neomezený replikační potenciál, soběstačnost v potřebě růstových signálů, necitlivost vůči růst inhibujícím signálům, neschopnost apoptózy, neoangiogeneze, invazivita a metastazování u malignit. Nádorové buňky jsou také charakteristické svým energetickým metabolismem a genetickou nestabilitou, ať už na úrovni nukleotidů či chromozomů, v důsledku čehož dochází k dalšímu hromadění mutací a následnému

polyklonálnímu charakteru nádoru. Velmi důležitým znakem je také únik rakovinných buněk imunitnímu systému a tvorba nádorového mikroprostředí (Hanahan a Weinberg, 2011).

1.1.1 Vznik nádorového onemocnění

Vznik a růst nádorů, nebo-li tumorigeneze, je vícestupňový proces vyžadující akumulaci četných mutací v jediné buňce v klíčových regionech, které přispívají k charakteru neoplazie. Mezi tyto klíčové regiony patří geny regulující buněčný růst, diferenciaci a apoptózu, jako jsou protoonkogeny nebo reparační a tumor supresorové geny (Steen, 2000). Alespoň toto je v dnešní době obecně nejvíce přijímaná hypotéza vzniku nádorového bujení. Dle studie Armitage a Dolla je potřeba takovýchto mutací zapříčiněných např. působením kancerogenů (chemikálie či různé typy radiace) pět až sedm (Armitage a Doll, 1954). Steen také navrhuje, že tato mutace může být v jakémkoli genu přispívajícím k integritě tkáně a není to tedy pouze přímý zásah do onkotických genů. Tvrdí, že nejen mutace, ale také jakékoli poškození vedoucí k porušení mnoha sousedních buněk a následné degradaci celulárního prostředí může zvýšit pravděpodobnost události iniciující maligní transformaci, pokud přetrvává po delší dobu (Steen, 2000).

1.1.2 Základní typy klasifikace nádorového onemocnění

Nádory klasifikujeme dle několika kritérií. Z hlediska jejich biologického chování rozlišujeme nádory nezhoubné, nebo-li benigní a zhoubné, tedy maligní. Tumory benigní se vyznačují expanzivním růstem, ovšem neinvadují okolní tkáně a nemetastazují, ale mohou mít tendenci k vytlačování okolních tkání a orgánů. Tou nebezpečnější variantou jsou maligní nádory, které naopak do okolních tkání invadují, destruují je a metastazují krevními či lymfatickými cévami, tedy zakládají vzdálenější ložiska (Fidler a Kripke, 1977).

Nádory lze také dělit dle jejich tkáňového původu (Su a kol., 2001). Z tohoto pohledu dělíme nádory na epitelální, stromální, neuroektodermální, hematopoetické, germinomy či nádory smíšené. Samozřejmě také rozlišujeme nádory dle jejich lokalizace v těle pacienta, např. rakovina prsu, prostaty, konečníku, plic, děložního čípku či pigmentových buněk kůže.

1.1.3 Melanom

Maligní melanom je nádor vznikající z melanocytů, tedy buněk obsahující kožní pigment melanin. Většinou je lokalizován v kůži, ale zřídka se vyskytuje také v ústech či oku (Singh a Topham, 2003; Milton a Brown, 1965).

Intenzivní vystavování se slunci jak v dětském věku tak v dospělosti zvyšuje riziko vzniku melanocytární neoplazie. Vyšší riziko vzniku melanomu za ekvivalentního pobytu

na slunci bylo zjištěno u osob s fototypem I a II (Autier a Doré, 1998). Přestože mortalita klesá či zůstává nezměněna, incidence melanomu v bílé populaci rychle stoupá kvůli zvýšené expozici slunci či UVB záření, častým venkovním aktivitám, změnám v oblékání, dlouhověkosti, poškození ozonové vrstvy, genetiky a v některých případech supresi imunity (Jemal a kol., 2011; Leiter a Garbe, 2008).

Výskyt melanomu v populaci závisí na geografické zóně. Nejvyšší incidence byla zaznamenána v Austrálii v Queenslandu (56 nových případů za rok na 100 000 mužů a 43 případů na 100 000 žen) (Leiter a Garbe, 2008).

Za jeden z nejdůležitějších prognostických faktorů je společně s mitotickou rychlostí na milimetr čtvereční, množstvím tumor-infiltrujících lymfocytů, anatomickou polohou primárního melanomu, pohlavím pacienta a histologickou regresí považována tloušťka (výška) primárního melanomu - tzv. Clarkův level (Clark a kol., 1989; Büttner a kol., 1995).

Melanom je jeden z nejfatálnějších typů nádorového onemocnění kůže, proto je nesmírně důležité snažit se mu předcházet např. nevycházením v poledních hodinách na přímé slunce či nošením vhodného oblečení v horkých dnech. Důležitou roli zde hraje také sebevyšetření a sledování všech kožních znamének (Manne a kol., 2004).

1.1.3.1 Melanom B16-F10

Od myší linie C57BL/6 byl odvozen spontánní melanom B16. V polovině sedmdesátých let minulého století byly od málo metastazující parentální linie B16-F1 odvozeny další varianty. Za slabě metastazující je označována linie B16-F0, naopak B16-BL6 metastazuje silně.

V průběhu pokusů uvedených v této práci byl využit mezi laboratořemi nejpoužívanější myší melanom B16-F10. Tento kmen melanomových buněk se vyznačuje především svou zvýšenou agresivitou, invazivitou do okolních tkání a vysokou schopností vytvářet plicní metastázy i po mnoha *in vitro* kultivacích (Hart, 1979; Fidler, 1975). Po 5 - 10 dnech je při subkutánní aplikaci buněk B16 vytvořen již zřetelný nádor a po delší době začíná často ve středu nekrotizovat (Overwijk a Restifo, 2001).

1.2. Imunitní systém a nádorová onemocnění

Přestože mezi základní funkce imunitního systému vedle zachování integrity organismu patří také správné rozlišování mezi *vlastním* a *cizím* a následná eliminace *cizího*, v případě spontánního vzniku nádorových onemocnění zde často vzniká potíže. Nádorové buňky imunitním mechanismům bohužel unikají a tedy nejsou eliminovány, jelikož jsou málo imunogenní a osvojili si několik mechanismů úniku imunitnímu dohledu.

1.2.1 Mechanismy úniku a obrany nádorů před imunitním systémem

- Nízká exprese nádorových antigenů, často vedoucí ke tvorbám metastáz (Kim a kol., 1972).
- Antigenní mutace vedoucí k úniku od počáteční imunitní odpovědi a přispívající k heterogenitě nádorových lézí (Stackpole a kol., 1980).
- Snížená (v některých případech až nulová) exprese MHC I molekul brání rozpoznání nádoru imunitním systémem (Hicklin a kol., 1999).
- Expres imunosupresivních faktorů:
 - 1) TGF-beta - negativně ovlivňuje proliferaci, aktivaci a diferenciaci buněk vrozené i získané imunity (Gorelik a kol., 2001). Tento faktor způsobuje přeměnu CD4+ lymfocytů na Treg lymfocyty, které opět produkují TGF-beta, čímž dochází k vytvoření autokrinní smyčky (Facciabene a kol., 2012).
 - 2) VEGF - brání dozrávání dendritických buněk (Gabrilovich a kol., 1996).
 - 3) IL-10 - omezuje funkci T lymfocytů a snižuje expresi MHC I molekul (Matsuda a kol., 1994).
- Maskování epitopů nádorových antigenů sialylací (Pearlstein a kol., 1980).
- Snížená exprese kostimulačních molekul vedoucí k navození tolerance (Chen a kol., 1993).
- Akumulace adenosin produkujících regulačních T lymfocytů (Treg) v nádorovém mikroprostředí (Deaglio a kol., 2007).
- Snižování hladiny Fas receptoru způsobující odolnost nádoru vůči apoptóze (Cascino a kol., 1996).
- Zvyšování hladiny Fas ligandu, který po interakci s Fas receptorem efektorových buněk vede k jejich apoptóze (Taylor a kol., 2003).
- Inhibice komplementu pomocí molekuly CD55 (Loberg a kol., 2006).
- Expres TLR receptorů na povrchu nádorových buněk vedoucí k proliferaci, rezistenci k apoptóze a CTL ataku (např. TLR4 signalizace) (Huang a kol., 2005).

1.2.2 Složky imunitního systému

Přestože imunitní systém funguje jako celek a všechny jeho buňky mezi sebou pomocí signálních molekul vydatně komunikují, dělíme ho na dvě složky. Tou jednou je imunita vrozená, nebo-li nespecifická či neadaptivní a tou druhou imunita získaná a tedy specifická, adaptivní. Obě tyto části mají svou buněčnou i humorální složku.

1.2.2.1 Vrozená (nespecifická) imunita

Nespecifická imunita je vývojově starší a z hlediska ontogeneze je ustanovena již ve stadiu zygoty. V první linii obrany proti cizorodým částicím stojí bariéry anatomické, tedy kůže, řasinkové buňky, mukózní sekrety, ale také bariéry fyziologické, jako je např. pH nebo teplota. Jestliže dojde k překonání těchto bariér, nastupuje do hry buněčná složka vrozené imunity, což jsou monocyty a z nich vznikající makrofágy, granulocyty (neutrofil, eosinofil a basofil), dendritické a NK buňky.

Princip fungování těchto buněk vrozené imunity tkví v rozpoznávání fylogeneticky velmi konzervovaných PAMPs motivů pomocí PRR receptorů, mezi něž patří mimo jiné i TLR receptory (Akira a kol., 2006). Po identifikaci často následuje fagocytóza, jeden z hlavních mechanismů vrozené imunity. Touto schopností likvidace patogenů disponují neutrofil, makrofágy, eosinofil a dendritické buňky, které pohlcují tyto cizorodé částice. Je-li fagocyt zároveň APC, po fagocytóze následuje zpracování a prezentace cizorodých molekul ve spojení s MHC II na svém povrchu specifické imunitě (Greenberg a Grinstein, 2002).

Dalším velmi významným mechanismem vrozené imunity je zánět, tedy souhrn fyziologických reakcí na porušení homeostázy organismu škodlivinami. Vyvolán může být infekčními mikroorganismy či poraněními způsobenými např. ischemií tkáně. Poškozené místo poté vykazuje následující znaky: rubor (začervenání), calor (zvýšená lokální teplota), tumor (otok), dolor (bolest) a konečně také functio laesa (porucha funkce) (Rather, 1971). Zánětu se účastní celá řada buněk imunitního systému a také proteiny akutní fáze, kam patří např. C reaktivní protein (McIntyre a kol., 1997).

Mezi humorální složku vrozené imunity se řadí interferony, proteiny, které produkují virem napadené imunitní buňky, nejvíce plasmocytoidní dendritické buňky. Po navázání interferonu na receptory zdravých, ale také již poškozených, buněk, dochází k navození antivirového stavu. Jedním z interferonů je IFN-gamma, produkován zejména Th1 lymfocyty, které stimulují makrofágy k přeměně na makrofágy aktivované (Nathan a kol, 1983).

Komplement je soustava sérových proteinů a glykoproteinů sloužící k zesílení imunitní odpovědi. K jeho aktivaci je nutná enzymatická kaskáda, po níž získává komplement schopnost vnořit se do fosfolipidové dvojvrstvy či se vázat na okolní buňky a následně je pak poškodit tvorbou membránových porů (Schröder a kol, 1990).

Vrozená imunita v mnohých případech předchází imunitě specifické, ale často stačí k podchycení a likvidaci cizorodých částic sama.

1.2.2.2 Získaná (specifická) imunita

Specifická imunita je výsadou obratlovců (Thompson, 1995). V genetické informaci organismu je zanesena pouze v základech, v průběhu vývoje se genom jednotlivých buněk mění. Mezi její základní vlastnosti patří specifita, diverzita a imunologická paměť.

Buněčná složka získané imunity je tvořena T a B lymfocyty. B i T lymfocyty se tvoří v kostní dřeni, ovšem T lymfocyty poté putují do thymu, kde dochází k expresi receptoru pro antigen a pro rozpoznání antigenu je jeho nutná prezentace v komplexu s MHC molekulami. Dojde-li k rozpoznání, nastává proliferace a diferenciací v efektorovou a paměťovou buňku. Tyto buňky zůstávají v těle po dlouhou dobu a tvoří tak imunitní paměť, kterou vrozená imunita postrádá (Gatinonni a kol. 2011). Setká-li se organismus s tím samým antigenem znovu, dojde k rychlejší a silnější odpovědi imunitního systému.

Th subpopulace lymfocytů (CD4+, helpery) rozpoznává antigeny prezentované APC buňkami ve spojení s MHC II molekulami. Po jejich aktivaci spouští produkci cytokinů a dle jejich funkčního působení diferencují v Th1 či Th2 lymfocyty. Th1 lymfocyty stimulují především buněčnou imunitu, naopak Th2 lymfocyty jsou zodpovědné za aktivaci imunity humorální (Kuchroo a kol., 1995).

Tc lymfocyty (CD8+, cytotoxické) naopak cytokiny a další látky téměř neprodukují, jejich úkolem je cytotoxická likvidace infikovaných či nádorových buněk (Cantor a Boyse, 1975).

B lymfocyt po navázání antigenu proliferuje a diferencuje v paměťovou a plazmatickou buňku, která sekretuje protilátky. Protilátky představují humorální složku specifické imunity a slouží k opsonizaci, aktivaci komplementu a neutralizaci bakteriálních toxinů (Smith a kol., 2005).

1.2.3 Cytokiny a jejich vztah k nádorovému růstu

Cytokiny jsou signální látky bílkovinné povahy, které jsou sekretovány leukocyty a působí na buňky imunitního systému nesoucí receptor pro daný cytokin. Tyto látky po navázání na buněčný receptor způsobí expresi genů vedoucí k proliferaci, aktivaci, diferenciaci či inhibici proliferace buněk nebo sekreci dalších cytokinů (Dranoff, 2004). Tyto složité antagonistické či synergistické interakce a kaskády tvoří tzv. cytokinovou síť. Výsledkem je poté regulace intenzity a trvání imunitní odpovědi. Cytokiny často působí pleiotropně, což znamená, že mohou působit na několik různých druhů buněk, avšak některé jsou redundantní, tedy mohou být nahrazeny jinými. I v nádorovém růstu hrají cytokiny velmi významnou roli, která může být jak supresivní, tak pronádorová. Buď na nádorový

růst působí přímo nebo nepřímo, atrakcí zánětlivých typů buněk a ovlivněním angiogeneze (Salazar-Onfray, 2007).

Interleukin 6 (IL-6) se svými účinky řadí k prozánětlivým cytokinům, může přispívat k progresi i regresi protinádorové odpovědi. V závislosti na modelu aktivuje různé dráhy buněčné proliferace, indukce růstu nádorů, metastáz a rezistenci k chemoterapii v celé škále nádorových buněk (Ogata a kol., 1997).

Interleukin-10 (IL-10) zabraňuje sekreci prozánětlivých cytokinů a je spojován s únikem nádorů imunitnímu systému a jejich následným růstem, s inhibicí diferenciací T lymfocytů a potlačením Th1 odpovědi (Taga a Tosato, 1992; Florentino a kol., 1991). Mimo jiné také zvyšuje metastatický potenciál a snižuje expresi MHC I a MHC II molekul (Matsuda a kol., 1994; de Waal-Malefyt a kol., 1991). IL-10 je sekretován Th a B lymfocyty, makrofágy, monocyty a nádorovými buňkami (de Waal-Malefyt a kol., 1991).

Interleukin 12 (IL-12) naopak působí silně protinádorově, způsobuje jejich regresi a redukuje výskyt metastáz (Brunda a kol. 1993, Nastala a kol., 1994). Indukuje produkci IFN-gamma, stimuluje růst NK buněk a T lymfocytů, navozuje Th1 odpověď a inhibuje neovaskularizaci (Manetti a kol., 1993; Sgadari a kol., 1996). IL-12 hraje kritickou roli v regulaci funkce NK buněk a T lymfocytů v průběhu zánětlivé reakce. Produkován je antigen prezentujícími buňkami, tedy např. buňkami dendritickými (Macatonia a kol., 1995).

Interferon gamma (IFN-gamma) také vyvolává protinádorovou odpověď, a to aktivací adaptivní a vrozené imunity a endogenně chrání organismus před spontánním vznikem nádorů (Dighe a kol., 1993). Přisouzena mu byla antivirová aktivita, stimuluje prezentaci antigenů a má vliv na proliferaci a apoptózu buněk. Podporuje tvorbu Th1 i Tc buněk a aktivaci makrofágů. IFN-gamma interaguje s IFN-gamma receptorem (IFNGR), který se vyskytuje na povrchu téměř všech buněk (Bach a kol., 1977). Na počátku imunitní odpovědi (4-96 hodin) je produkován zejména NK buňkami, avšak tuto funkci poté přebírají CD4+ a CD8+ T lymfocyty (Ikeda, 2002).

Tumor necrosis factor alfa (TNF-alfa) je prozánětlivý cytokin podílející se na destrukci tkáně a zotavení se z poškození, má jak pronádorovou, tak protinádorovou aktivitu (Balkwill, 2002). Může inhibovat opravy DNA a chovat se jako růstový faktor pro nádorové buňky a podporovat angiogenezi, ovšem ve vysokých dávkách destruuje nádorovou vaskularizaci a má na malignity nekrotický efekt. Sekretován je aktivovanými makrofágy, T lymfocyty a nádorovými buňkami (Balkwill, 2002).

Množství exprese různých cytokinů moduluje odpověď imunitního systému. Th1/Th2 model regulace imunitního systému, poprvé popsán roku 1986 Mosmannem s kolegy,

je zajištěn produkcí cytokinů CD4+ buňkami (Mosmann a kol., 1986; Mosmann a Coffman, 1987). Mezi Th1 typ cytokinů patří IL-2, IFN-gamma nebo IL-12, mezi typ Th2 potom IL-4, IL-5, IL-6 a IL-10 (Mosmann a kol., 1986; Cherwinski a kol., 1987). IFN-gamma a další Th1 cytokiny jsou většinou nižší u pacientů s pokročilým stadiem nádoru, naopak IL-4, Th2 marker, může být vyšší (Sato a kol., 1998). U pacientů se zhoubným bujením prostaty byla naměřena hodnota IL-2 (Th1) nízká, naopak IL-10 (Th2) vysoká (Filella a kol., 2000). IL-10 je potvrzeným Th1-supresivním cytokinem a jeho zvýšená koncentrace je běžným faktorem nádorového onemocnění (Kidd, 2003). IL-10 vykazuje spektrum supresivních efektů, např. inhibuje produkci Th1 cytokinů, snižuje funkci APC a NK buněk a celkovou proliferaci T lymfocytů (Huang a kol., 1995). Buňky Th1 aktivují APC buňky a indukují produkci takového typu protilátek, který může zvýšit pohlcení nádorových buněk APC buňkami. Specifické modulování Th1 buněčné odpovědi proti nádorům může vést k efektivní imunoterapii, odpověď Th2 je považována za protilátkovou. Th1 buňky mohou přímo zabíjet buňky nádorové uvolněním cytokinů, které aktivují death receptory právě na povrchu nádorových buněk (Knutson a Disis, 2005). Th1 stav navozuje aktivaci cytotoxických T lymfocytů, NK buněk, makrofágů a monocytů, které pak mohou atakovat nádorové buňky a hrát roli v obraně proti nádorům (Shurin a kol., 1999). V této bakalářské práci byl zjišťován Th stav v nádoru v průběhu terapie pomocí poměru IFN gamma ku IL-10, jelikož Th1 stav je obecně považován za protinádorový, Th2 odpověď za pronádorovou (Knutson a Disis, 2005; Haabeth a kol., 2011; Sredni a kol., 1996).

Cytokiny lze samozřejmě využít v léčbě nádorových onemocnění, ale bohužel s sebou tato terapie často nese celou řadu negativních vedlejších účinků (Margolin a kol., 1989; Gabrilovich a kol., 1996).

1.3 Možnosti protinádorové terapie

V dnešní době je využíváno několika přístupů k léčbě nádorových onemocnění. Kořeny některých typů terapie zasahují hluboko do historie (chirurgická léčba), jiné jsou prozatím ve stadiu klinického testování (imunoterapie). Bohužel ne vždy je cílem dané terapie pacienta vyléčit. V některých případech je záměrem zastavit nebo zpomalit nádorový růst, jindy je to udržení kvality života. Mezi ty nejrozšířenější patří zejména chemoterapie, radioterapie a chirurgická léčba.

Chirurgická léčba je tou nejstarší metodou a dlouho byla jedinou, která se s nádory dokázala potýkat. Tato léčba spočívá v odoperování nádoru, okolní tkáně a spádových mízních uzlin. Její nevýhoda tkví v nemožnosti operace některých nádorů z důvodu jejich

lokalizace a neschopnosti boje s metastázemi. V dnešní době se často využívá její kombinace s chemoterapií či radioterapií (Glehen a kol., 2004).

Princip chemoterapie je založen na podávání cytostatik likvidující rychle se dělící nádorové buňky, ovšem nelze se vyhnout poškození i rychle se dělících buněk zdravých, lokalizovaných v gastrointestinálním epitelu, kostní dřeni, buněk vlasových folikulů či zárodečných buněk. Chemoterapie je schopna léčit také metastáze. Nová generace chemoterapeutik (např. Imatinib) se zdá být více nadějná, její výhodou je vyšší specifita (Verweij a kol., 2004).

Radioterapie využívá zacílení svazků fotonů, elektronů nebo hadronů na primární nádor či metastáze. Často se využívá ke zmenšení nádorové masy před jejím chirurgickým vyjmutím (Kapiteijn a kol., 2001). Její nevýhodou je opět poškození zdravé tkáně a nebezpečí popálení. Bohužel v některých případech může i po mnoha letech dojít ke vzniku sekundární malignity právě z důvodu předešlého vystavení organismu škodlivému ozáření (Relling a kol., 1999).

Imunoterapie využívá přirozených imunitních mechanismů k aktivaci protinádorové imunity či dopravení léčiva k nádoru. Její velkou výhodou je lepší zacílení nádorových buněk a mírnější vedlejší účinky oproti výše zmíněným postupům. Naopak jisté potíže nastávají u pacientů s autoimunitní chorobou a tím pádem je důležité zvážit, pro koho je léčba vhodná (Amos a kol., 2011).

Jednou z metod je využití monoklonálních protilátek, které blokují receptory na povrchu nádorů:

- Ipilimumab (lék Yervoy) je humanizovaná IgG1 protilátka vážící se na membránový protein CTLA-4 (CD 152, cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) a používá se v boji proti metastatickému melanomu (Hodi a kol., 2010). Molekula CTLA-4, patřící do rodiny tzv. imunitních checkpointů, kompetuje s T buněčným kostimulačním proteinem CD28 o molekuly CD80 a CD86, k nimž má ovšem mnohem vyšší afinitu než CD28 a následně tedy dochází k předání inhibičního signálu aktivovaným T lymfocytům. Pokud je ale CTLA-4 blokován, systém vykazuje protinádorovou aktivitu, jelikož se zamezí jeho kontaktu s CD80 a CD86 (Leach a kol., 1996).
- Cetuximab (lék Erbitux) je chimerická (myší/lidská) protilátka proti EGFR (epidermal growth factor receptor). Jejím navázáním dojde k deaktivaci signálních kaskád zodpovědných za buněčný růst. Tento lék slouží zejména k léčbě kolorektálního karcinomu (Saltz a kol., 2004).

- Mezi radioaktivně obohacené monoklonální protilátky patří např. Ibritumomab tiuxetan (lék Zevalin), což je myší monoklonální protilátka s navázaným beta zářičem yttrium-90. Jeho účinky jsou stále předmětem výzkumu a to zejména u folikulárních lymfomů (Shiplea a kol., 2004).

Sipuleucel-T (lék Provenge) je lék založený na protinádorové vakcinaci. Pacientovi jsou odebrány APC buňky, které jsou následně inkubovány s rekombinantním fúzním proteinem PA2024, který obsahuje antigen kyselé prostatické fosfatázy a faktor GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor), který stimuluje zrání imunokompetentních buněk. Tyto kyselé prostatické fosfatázy se nacházejí až na 95% nádorových buňkách prostaty a obohacení o zmíněný antigen napomáhá jejich rozpoznání (Burch a kol., 2004).

Jak již bylo zmíněno výše, v boji proti nádorům lze využít také cytokinů. IFN alfa je v dnešní době používán pro léčbu melanomu, folikulárního lymfomu či vzácného Kaposiho sarkomu (Tur a Brenner, 1998). V terapii maligního melanomu lze uplatnit IL-2 (Rosenberg a kol., 1988).

Terapie dendritickými buňkami je založena na buněčně zprostředkovaných mechanismech. Z pacientovy krve jsou odebrány monocyty, ze kterých lze *in vitro* připravit velké množství dendritických buněk. Tyto dendritické buňky jsou poté vystaveny nádorovým antigenům. Po jejich zpracování a vystavení na povrchu buněk jsou dendritické buňky opět vráceny pacientovi. Tento druh terapie byl zkoušen např. na hepatocelulárním karcinomu (Palmer a kol., 2009). Bylo prokázáno, že i dendritické buňky odebrané z kostní dřeně, vystavené antigennímu pulzu a následně navrácené do organismu vyvolávají protinádorovou aktivitu (Mayordomo a kol., 1995).

Terapie LAK buňkami (lymphokine activated killers) spočívá v odebrání T lymfocytů a NK buněk pacientovi. Poté jsou *in vitro* vystaveny vlivu cytokinů, zejména IL-2. Takto stimulované buňky jsou nakonec vráceny zpět do krevního oběhu pacienta (Monson a kol., 1987).

Podobně se připravují i TIL buňky (tumor infiltrating lymphocytes), avšak s tím rozdílem, že izolované buňky pocházejí z nádoru. Předpokládá se, že tyto buňky jsou nádorově specifické, ale v útlumu kvůli nedostatku kostimulačních signálů. Následně jsou buňky vráceny zpět do organismu (Rosenberg a kol., 1988).

Cestou imunoterapie se vydala i naše laboratoř. Náš přístup k léčbě nádorových onemocnění je založen na mohutné infiltraci buněk imunitního systému do nádoru, která je způsobena intratumorální injekcí bakteriálních motivů fungujících jako PAMPs. Tento mechanismus je kombinován s navázáním takových molekul na nádorové buňky, které

způsobí jejich fagocytózu a likvidaci právě tímto buněčným infiltrátem (Janotová a kol., 2014).

1.4 Pathogen associated molecular patterns

Mikrobiální infekce iniciuje množství reakcí mezi hostitelem a patogenem, mezi kterými hrají klíčovou roli PAMPs. PAMPs jsou konzervované produkty mikrobiálního metabolismu, které jsou často esenciální pro jejich přežití a patogenicitu (Janeway a Medzhitov, 2002) a jsou invariální mezi mikroorganismy dané třídy. Často jsou to komponenty bakteriální stěny, jako je např. LPS gram negativních bakterií, lipoproteiny, peptidoglykany či kyselina lipoteichoová gram pozitivních bakterií nebo flagelin a dsDNA (Medzhitov, 2007). Takto je umožněno rozpoznání mezi "cizím" (a potenciálně nebezpečným) a "vlastním" (Medzhitov, 2007).

1.5 Pattern recognition receptors

PAMPs jsou rozpoznávány pomocí pattern recognition receptors (PRRs), které jsou exprimovány na buňkách vrozené imunity, jako jsou např. dendritické buňky, makrofágy nebo neutrofily (Medzhitov, 2007). Ovšem PRRs nejsou zodpovědné pouze za rozpoznání PAMPs, ale také za rozpoznání endogenních molekul uvolněných z poškozených buněk, tzv. DAMPs (damage associated molecular patterns) (Osamu a Akira, 2010). Ligandy těchto receptorů nejsou unikátní pouze patogenům a proto PRRs rozeznávají i symbiotické organismy. Avšak přestože je lidský organismus kolonizován trilióny symbiotických bakterií, v normálních podmínkách je homeostáza udržována a co více, rozpoznání symbiotických mikroorganismů vrozenou imunitou hraje důležitou roli v udržování intestinální homeostázy (Rakoff-Nahoum a kol., 2004).

1.5.1 Sekretované PRRs

Sekretované receptory jsou proteiny cirkulující v krvi či lymfě, které se vážou na PAMPs mnoha patogenů. Tato interakce poté spouští kaskádu komplementu vedoucí k opsonizaci patogenu a jeho fagocytóze.

Sekretovaným PRR je například **CRP** (C-reactive protein), protein akutní fáze vážící se na fosfolipidy přes fosfocholinové motivy. Může spouštět klasickou cestu aktivace komplementu, stimulovat fagocytózu nebo se vázat na imunoglobulinové receptory (Black a kol., 2004).

Mezi sekretované PRRs patří také **MBL** (mannan binding lectin), plazmatický collectin, který se váže na karbohydráty mikroorganismů (Sheriff a kol., 1994), což může

vyústit v aktivaci komplementu lektinovou cestou (Petersen a kol., 2001).

1.5.2 Cytosolické PRRs

Cytosolické receptory jsou schopny rozlišit intracelulární infekci od extracelulární a škodlivé patogenní mikroorganismy od komensálů, přestože zatím není známo jak (Palm a Medzhitov, 2009).

Mezi cytosolické receptory patří **NLRs** (NOD-like receptors). NOD 1 a NOD 2 rozpoznávají bakteriální infekci detekcí cytosolických peptidoglykanových fragmentů bakteriálních stěn a aktivují imunitní odpověď kritickou pro protekci vůči bakteriím schopným úniku endolysosomu a zásadní pro produkci antimikrobiálních peptidů v intestinálních kryptách. Bylo zjištěno, že NOD 1 receptor rozpoznává peptidoglykan před dipeptid gamma-D-glutamyl-*meso*-diaminopimelickou kyselinu (iE-DAP) (Chamaillard a kol., 2003), NOD 2 receptor přes muramyl dipeptid (MDP). Mutace NOD 2 receptoru bývá spojována s Crohnovou chorobou (Girardin a kol., 2003; Ogura a kol., 2001).

Dalším typem cytoplasmaticky lokalizovaných receptorů jsou **RLRs** (RIG-1-like receptors), které rozeznávají virovou genomickou dsRNA a dsRNA vzniklou jako replikační intermediát ssRNA virů (Osamu a Akira, 2010).

1.5.3 Membránové PRRs

Membránové PRRs jsou ukotveny v buněčné membráně a rozpoznávají PAMPs v extracelulárním prostoru, fagozómech a endozómech (Akira a kol., 2006).

Mezi membránové PRRs se řadí **CLR** (C-type lectin receptors), které se vyskytují na povrchu monocytů, makrofágů, dendritických a Langerhansových buněk. Tyto receptory jsou produkovány jako transmembránové proteiny či sekretovány jako proteiny rozpustné (collectiny, galectiny, ficoliny) a fungují jako aglutininy a opsoniny, které se vážou na mikrobiální karbohydráty a usnadňují tak fagocytózu (Figdor a kol., 2002). Příkladem rozpustných receptorů je např. plicní surfaktant A (SP-A) (Wintergerst a kol., 1989). Většina CLR se váže na mannosylované antigeny, některé i na galaktózu (Drickamer a Dodd, 1999) a to kalcium-dependentním způsobem, při kterém využívají velmi konzervovaných CRDs (carbohydrate recognition domains). Tyto domény obsahují kalcium vázající kapsy, které jsou esenciální pro tuto vazbu (Figdor a kol., 2002).

Mezi tyto CLR patří např. Dectin-1, který se váže na beta glukán hub. Dendritické buňky aktivované přes Dectin-1 nebo Dectin-2 jsou schopné udělit pokyn T lymfocytům k vybuzení imunity proti kvasince *Candida albicans* (Robinson a kol., 2009).

Dalším receptorem řadícím se k CLR je manóзовý receptor, primárně lokalizovaný na povrchu makrofágů a nezralých dendritických buněk, ale nalezen byl také na lidských dermálních fibroblastech a keratinocytech (Sheikh a kol., 2000; Szolnoky a kol., 2001). Manóзовý receptor rozeznává terminální manózu, N-acetylglukosamin a fukóзовé zbytky na glykanech vázaných k proteinu (Figdor a kol., 2002).

Membránovými PRRs jsou také **FPRs** (formyl peptide receptors), hojně exprimované na neutrofilech a monocytech (Le a kol., 2002), ale také např. na fibroblastech (VanCompernelle a kol., 2003) nebo astrocytech (Le a kol., 2000). Tyto receptory zprostředkovávají buněčnou chemotaxi a antimikrobiální odpověď neutrofilů díky vazbě přes N-formylovou skupinu proteinů mikroorganismů (Schiffmann a kol., 1975; Marasco a kol., 1984), avšak v posledních několika letech naměřená data ukazují, že tyto receptory mají mnohem komplexnější funkci, jelikož byly objeveny neformylované ligandy FPR receptorů (Le a kol., 2002).

Mezi nejlépe definované PRRs patří **TLRs** (toll-like receptors), membránové glykoproteiny. Různé TLR receptory rozpoznávají různé molekulární vzory (Tab.1).

Tab.1: TLR a jejich agonisté používané v této práci.

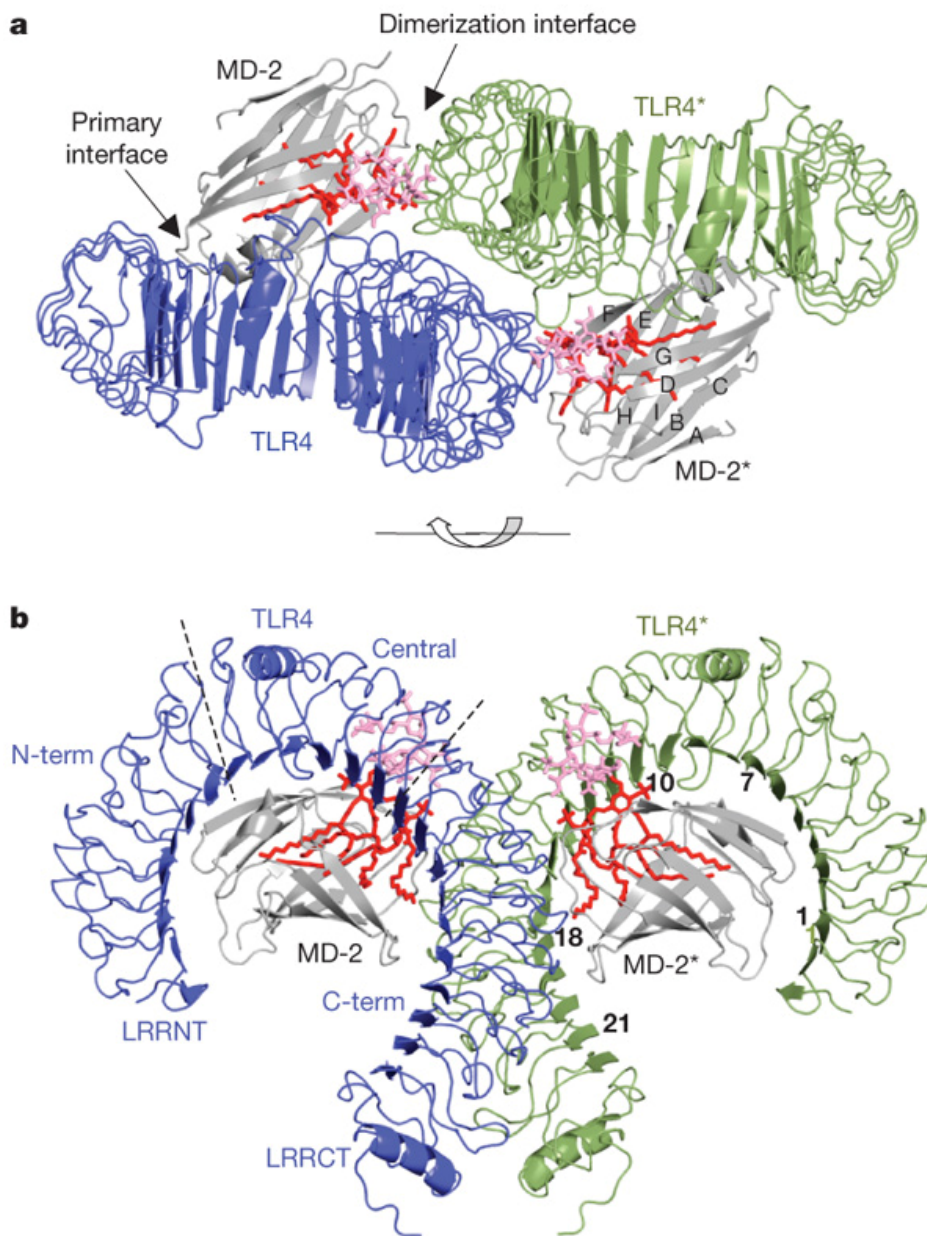
Toll-like receptory a jejich agonisté	
TLR 2	<i>Listeria monocytogenes</i>
TLR 7 u myši TLR 7 a TLR 8 u člověka	R-848
TLR 3	POLY I:C

Na N-terminálním konci jsou TLR receptory bohaté na leucinové repetice (LRRs, leucin-rich repeats) (Bell a kol., 2003). Po C-terminální cytoplasmatické Toll/IL-1R (TIR) doméně, která je homologní se členy IL-1R rodiny (O'Neill a Bowie, 2007), následuje transmembránový helix. TLR receptory svou strukturou připomínají podkovu či písmeno "m" (Jin a Lee, 2008).

U lidí bylo identifikováno deset TLR receptorů, u myši dvanáct (Takeuchi a kol., 2010). Sice se u nich nevyskytuje TLR 10 kvůli přítomnosti stop kodonu v myším TLR 10 genu, ale oproti člověku mají TLR 11, TLR 12 a TLR 13, avšak lidský TLR 10 a myší TLR 12 a TLR 13 nejsou dostatečně charakterizovány a jejich funkce není zcela objasněna (Kawai a Akira, 2010). TLR 1, 2, 4 a 6 jsou primárně exprimovány na povrchu buněk a rozeznávají PAMPs bakterií, protozoí a hub, avšak TLR 3, 7, 8 a 9 jsou exprimovány pouze v endocytárních kompartmentech a primárně rozeznávají PAMPs ve formě

nukleových kyselin virů a bakterií (Akira a kol., 2006).

Prvním objeveným TLR receptorem u člověka byl TLR 4 rozpoznávající bakteriální LPS pomocí koreceptoru MD-2, který je ukotven k povrchu pomocí několika vodíkových vazeb (Obr.1) (Park a kol., 2009).



Obr.1: Struktura TLR4/MD-2/LPS komplexu (Park a kol., 2009).

a) Horní pohled na dimer komplexu TLR4/MD-2/LPS.

b) Boční pohled na TLR4/MD-2/LPS komplex. Lipidová komponenta LPS je zobrazena červeně, vnitřní karbohydrátové jádro růžově.

Bylo zjištěno, že TLR receptory ovlivňují aktivaci odpovědi adaptivní imunity na několika rovinách a to tak, že kontrolují např.:

- selekci antigenů pro prezentaci dendritickými buňkami (Blander a Medzhitov, 2006)
- vyžívání dendritických buněk a produkci cytokinů (Iwasaki a Medzhitov, 2004; Pasare a Medzhitov, 2004)
- náchylnost naivních T lymfocytů k supresi regulačními T lymocyty (Pasare a Medzhitov, 2003).
- odpovědi zprostředkované B lymfocyty (Ruprecht a Lanzavecchia, 2006)

TLR receptory jsou navíc schopné přímo aktivovat paměťové B buňky k produkci protilátek (Bernasconi a kol., 2002).

TLR signalizace je primárně zprostředkována přes navázání různých adaptorových molekul obsahujících TIR doménu, jako je např. MyD88, TRIF nebo TIRAP k TIR doménám TLR receptorů (Osamu a Akira, 2010; Kumar a kol., 2009). Rekrutace těchto molekul aktivuje různé transkripční faktory jako jsou např. NF- κ B, IRF3/7 a MAP kinázy, které indukují produkci prozánětlivých cytokinů a IFN typu 1 (Osamu a Akira, 2010).

1.6 Nádorová imunoterapie založená na kombinaci TLR signalizace s aktivací fagocytózy

Skutečnost, že si Dr. William B. Coley povšiml regrese nádorového onemocnění po bakteriální infekci, se stala významným poznatkem pro přístup k terapii nádorových onemocnění naší laboratoře. Roku 1884 se vyskytl pacient, jehož sarkom byl příliš velký a neoperovatelný a případ byl tudíž považován za ztracený. Avšak nějakou dobu poté se u pacienta vyskytla erysipel způsobená infekcí beta-hemolytickou bakterií *Streptococcus pyogenes* a po několika dnech se nádor začal zmenšovat až úplně vymizel (Coley, 1910). Inspirován tímto případem, využil pro léčbu neoperabilního sarkomu mixu usmrcených bakterií *Streptococcus pyogenes* a *Serratia marcescens*, známého jako Coleyho toxin (Coley, 1891). Přestože v té době buněčné mechanismy působení nebyly známy, výsledky W. Coleyho jsou považovány za počátky imunoterapie nádorového bujení.

Další výsledky, které ovlivnily naši laboratoř, jsou výsledky prof. Zhenga Cui a jeho kolegů. Inspirací nám byl objev z roku 1999, kdy prof. Zheng Cui s kolegy objevil BALB/c myši s SR/CR mutací (spontaneous regression / complete resistance), jejichž buňky imunitního systému byly schopny rozeznat a zlikvidovat nádorové buňky. Tato mutace je dominantní a je přenášena do další generace (Cui a kol., 2003). Dále také dokázal, že za tuto likvidaci nádorových buněk je zodpovědná vrozená imunita, protože když izoloval neutrofilů, makrofágů nebo NK buňky z myši, která nádorový transplantát nepřijala,

a přenesl je do myši s nádorovým onemocněním, nádor začal ustupovat (Cui a kol., 2003; Hicks a kol., 2006).

Přístup naší laboratoře je založen na atrakci buněk imunitního systému do nádorového prostředí, která je zajištěna injekcí PAMPs motivů. Důležitým faktorem je spojení mechanismů s TLR signalizací, pro terapii byly použity agonisti TLR receptorů (*Listeria monocytogenes*, R-848, POLY I:C). Dále je nutno zajistit, aby buňky, které namigrovaly mezi buňky nádorové, je pohltily díky navázání ligandů podporující fagocytózu. Tímto ligandem použitým v této práci je mannan, jehož použití vede k opsonizaci komplementem (Janotová a kol., 2014).

Mannan je lineární polymer manózy, který se vyskytuje jak v buněčné stěně rostlin, tak v buněčné stěně kvasinek (Kobayashi a kol., 1997). Mannan je vázán MBL (mannan binding lectin), po čemž dochází k aktivaci komplementu a opsonizaci fagocytózy (Boxx a kol., 2010).

R-848 (Resiquimod) patří skupiny imidazoquinolinaminů a je ligandem pro TLR 7 u myši a TLR 7 a TLR 8 u lidí (Gorden a kol., 2005). V této terapii je využíván jakožto náhrada za LPS, jelikož LPS, který byl používán dříve (Janotová a kol., 2014), je pro člověka příliš toxický.

POLY I:C (polyinosinic-polycytidylic acid) je syntetickým analogem virální dsRNA a agonistou TLR 3. Po rozpoznání dochází k produkci interferonu, zánětlivých cytokinů a vyzrávání dendritických buněk, které zajistí antigenní prezentaci (Matsumoto a Seya, 2008).

KLH (keyhole limpet hemocyanin) je neobvykle velký metalloprotein izolovaný z hemolymfy měkkýše *Megathura crenulata*. Byly prokázány jeho protinádorové účinky např. na nádoru močového měchýře u myši (Lamm a kol., 1993), ale také byly testovány u lidí (Jurincic a kol., 1988) a jeho kombinace s dalšími látkami byla provedena také na myším modelu B16-F10 (Hulíková a kol., 2010). KLH se také dá využít jako nosič pro vakcíny (Holmberg a Sandmaier, 2004). Peter Yeung s kolegy ukázal, že koadministrace teplem usmrcené *Listeria monocytogenes* a KLH u myši redukovala Th2 cytokiny a zvyšovala produkci IFN gamma (Yeung a kol., 1998).

Anti TGF-beta je protilátka blokuující TGF-beta používaná s cílem zlepšení účinků nádorové imunoterapie, jelikož touto protilátkou je inhibován jeden z mnoha mechanismů nádorů, kterými se brání imunitnímu systému. Blokace TGF-beta signalizace umožňuje generaci protinádorové imunitní odpovědi (Gorelik a kol., 2001).

Listeria monocytogenes je malá gram pozitivní pohyblivá tyčinka způsobující listeriózu a ligand pro TLR 2 (Flo a kol., 2000). Tato bakterie jako adjuvancium moduluje

stav prostředí k protinádorové Th1 odpovědi (Yeung a kol., 1998). V této bakalářské práci byl zkoumán její vliv v případě, kdy je použita nevázaná a v případě, kdy je na buněčný povrch vázána kovalentně.

Nejen tato bakterie, ale i jiné z výše uvedených komponent byly v některých případech na povrch nádorových buněk kovalentně vázány pomocí membránové kotvy SMCC (sukcinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyklohexan-1-karboxylát). Na jednom konci SMCC se nachází NHS esterová funkční skupina, která vykazuje afinitu k aminům a tedy i k námi používaným léčivům (Bieniarz a kol., 1996). Maleinimidová skupina na druhém konci SMCC reaguje s -SH skupinami. Pro správnou vazbu terapeutik přes SMCC kotvu je potřebný výskyt sulfhydrylových skupin na buněčném povrchu. Proto byl hodinu před aplikací samotných léčiv do nádoru injikován TCEP (tris(2-karboxyethyl)fosfin), který způsobuje redukci cystinu na cystein a vytvoření -SH skupin, což zapříčiňuje správnou vazbu léčiv přes SMCC kotvu (Janotová a kol., 2014).

2 Cíle práce

- Možnosti zesílení imunoterapie založené na kombinaci Resiquimodu a kotveného mannanu pomocí ligace dalších TLR receptorů a pomocí KLH.
- Řešení otázky zapojení získané imunity a ovlivnění imunoterapie blokací TGF-beta.
- Studium buněčné infiltrace během nádorové imunoterapie.
- Zjišťování Th1/Th2 stavu imunitní odpovědi v průběhu terapie.

3 Materiál a metody

3.1 Chemikálie

- **Antibiotická/antimykotická směs (amphotericin B, penicilin G, streptomycin)** (Biosera, USA)
- **Anti-Mouse CD45 PerCP-Cy5.5; clone 30-F11** (eBioscience, USA)
- **Anti-Mouse CD3e FITC; clone 145-2C11** (eBioscience, USA)
- **Anti-Mouse CD4 APC; clone GK1.5** (eBioscience, USA)
- **Anti-Mouse CD8a; clone 53-6.7** (eBioscience, USA)
- **Anti-Mouse CD19 APC; clone eBio1D3** (eBioscience, USA)
- **Anti-Mouse NK1.1 PE; clone PK136** (eBioscience, USA)
- **Anti-Mouse Ly-6G (Gr-1) Alexa Fluor 700; clone RB6-8C5** (eBioscience, USA)
- **Anti-Mouse F4/80 Antigen PE-Cy7; clone BM8** (eBioscience, USA)
- **Anti-Mouse CD11c PE; clone N418** (eBioscience, USA)
- **Anti-Mouse MHCII (I-A/I-E) Alexa Fluor 700; clone M5/114.15.2** (eBioscience, USA)
- **DNáza I** (Roche Diagnostics, Německo)
- **EDTA** - kyselina ethylendiamintetraoctová (Sigma-Aldrich, USA)
- **FCS** - fetální bovinní sérum (Sigma-Aldrich, USA)
- **Fluorescenčně značené kalibrační kuličky** - count bright absolute counting beads (Invitrogen, USA)
- **KLH** - hemocyanin z *Megathura crenulata*, s obsahem LPS 4,91 ng/ml (Sigma-Aldrich, USA)
- **KLH** - hemocyanin z *Megathura crenulata*, bez obsahu LPS (ENZO Life Sciences, USA)
- **L-glutamin** (Biosera, USA)
- **Liberáza DL** (Roche Diagnostics, Německo)
- **Listeria monocytogenes (Heat Killed Listeria monocytogenes, HKLM)** (Invivogen, Francie)
- **LPS** - lipopolysacharid z *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich, USA)
- **Mannan** - ze *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich, USA)
- **Mouse IFN gamma Platinum ELISA (extra sensitive)** (eBioscience, Rakousko)
- **Mouse IL-10 ELISA Kit (sandwich ELISA)** (LSBio, USA)

- **Rat anti-Mouse TGF beta monoclonal antibody, clone 1D 11.16.8.** (BioXCell, USA)
- **RPMI 1640** (Sigma- Aldrich, USA)
- **R-848** - Resiquimod (Tocris, Velká Británie)
- **SMCC** - 4-(N-Maleimidomethyl)cyclohexanecarboxylic acid N-hydroxysuccinimid ester (Thermo Scientific, USA)
- **TCEP** - tris(2-Carboxyethyl)phosphine hydrochlorid (Sigma-Aldrich, USA)
- **Trypanová modř** (Sigma-Aldrich, USA)
- **Trypsin** (0,25% trypsin a 0,02 % EDTA v HBSS (Sigma-Aldrich, USA)

3.2 Laboratorní zvířata

Pro pokusy byly použity samice z myšího kmene C57BL/6N z Charles Rivers Laboratories ve stáří 8 týdnů a o váze 18-20 g. Chovány byly jednotlivě v plastických boxech s přístupem ke sterilní vodě a suchým krmným peletám. V místnosti byla udržována teplota 22° C, 65% relativní vlhkost vzduchu a 12/12 fotoperioda.

3.3 Buněčné linie

Buněčná linie melanomu B16-F10 byla kultivována v médiu RPMI 1640 s 10 % FCS (+ amphotericin B 0,25 µg/ml, penicilin G 100 j./ml, streptomycin 100 µg/ml a L-glutamin 292 µg/ml) v termostatu s atmosférou nasycenou vodními parami obsahující 5 % CO₂ a nastaveném na teplotu 37° C.

3.4 Příprava buněk B16-F10 pro transplantaci

Z kultivační nádoby bylo slito přebytečné médium a buňky byly 3x promyty sterilním PBS. Následně k nim bylo přidáno 0,5 ml trypsinizační směsi (0,25% trypsin, 0,02% EDTA v HBSS) a kultivační nádoba byla vložena na jednu minutu do termostatu. Po uplynutí této doby byla trypsinizace zastavena přidáním RPMI 1640 s FCS. Poté byly buňky rozsuspendovány Pasteurovou pipetou a centrifugovány (5 min/160 g/4° C). Po slití supernatantu bylo přidáno RPMI 1640 bez FCS, ve kterém byl pelet rozvolněn. Z takového buněčné suspenze byl odebrán vzorek a smíchán s trypanovou modří v poměru 1:1. V Bürkerově komůrce byly spočítány živé buňky a buněčná suspenze byla naředěna tak, aby výsledná koncentrace buněk odpovídala 4×10^6 buněk/ml.

3.5 Transplantace melanomu B16-F10

Před transplantací melanomových buněk byly myši oholeny na pravém boku a poté jim bylo podkožně (s.c.) injikováno 0,1 ml RPMI 1640 obsahující 4×10^5 buněk B16-F10.

3.6 Měření velikosti nádorů

Velikost nádorů byla měřena pomocí kaliperu každý druhý den. Objem nádoru byl vypočítán dosazením naměřených hodnot do vzorce $V = \pi/6 (AB^2)$, kde A představuje délku a B výšku nádoru v milimetrech.

3.7 Příprava terapeutických látek

Resiquimod.HCl

K Resiquimodu byl přidán ekvivalent 3,5% HCl, čímž vznikl hydrochlorid, který je dobře rozpustný ve vodě.

Listeria monocytogenes-SMCC

Suspenze bakterií *Listeria monocytogenes* (10^{10} /ml PBS) byla smíchána s SMCC v poměru 2,5 mg SMCC/1 ml suspenze. Po 40 minutové inkubaci při pokojové teplotě následovala dialýza proti PBS pomocí dialyzační trubice MWCO 3500 za stálého míchání a při 4° C. Výsledná koncentrace roztoku byla 1 miliarda bakterií *Listeria monocytogenes* s navázaným SMCC/ml PBS.

Mannan-SMCC

Nejprve byl redukční amination (5 dnů, 50° C) mannanu v prostředí borohydridu sodného a octanu amonného připraven mannan-NH₂. Ten následně zreagoval se SMCC na mannan-SMCC (Janotová et al., 2014).

KLH-SMCC

KLH v prostředí PBS reagoval se SMCC v poměru 2 mg KLH / 1 mg SMCC po dobu 40 minut při pokojové teplotě. Roztok byl následně dialyzován proti PBS přes noc za stálého míchání při 4° C přes dialyzační trubici MWCO 3500.

3.8 Analýza dat

Data z experimentů byla statisticky zpracována v programu STATISTICA 12. Statistická významnost byla zjišťována pomocí testu ANOVA pro opakovaná pozorování doplněného o post-hoc Tukeyův test. Analýza přežívání po ukončení terapie byla provedena Log-rank testem a nádorový infiltrát, množství IFN-gamma a IL-10 bylo vyhodnocováno

T-testem. Do vytvořených grafů byly k jednotlivým sloupečkům vloženy SEM (standard error of the mean).

4 Experimenty

4.1 Terapie melanomu pomocí KLH a bakterie *Listeria monocytogenes*

Pro tento experiment bylo použito 30 samic myši C57BL/6N, které byly 12. den po transplantaci buněk B16-F10 náhodně rozděleny do 5 skupin po šesti myších. Každé skupině byla podávána jiná terapeutická směs.

Schéma aplikace terapeutik (skupina a terapeutikum):

- Skupina A - 10^9 *Listeria monocytogenes* + 0,5 mg Resiquimod.HCl / ml 0,2 mM mannan-SMCC v PBS
- Skupina B - 10^9 *Listeria monocytogenes*-SMCC + 0,5 mg Resiquimod.HCl / ml 0,2 mM mannan-SMCC v PBS
- Skupina C - 0,5 mg KLH (Sigma-Aldrich) + 0,5 mg Resiquimod.HCl / ml 0,2 mM mannan-SMCC v PBS
- Skupina D - 0,5 mg KLH-SMCC (Sigma-Aldrich) + 0,5 mg Resiquimod.HCl / ml 0,2 mM mannan-SMCC v PBS
- Skupina K (kontrola) - PBS

Terapie byla zahájena dnem 0, který připadl na 12. den po transplantaci nádorových buněk. V čase 0 byly kaliperem změřeny objemy nádorů a poté bylo jednotlivým skupinám intratumorálně aplikováno 50 μ l TCEP (50 mM roztok TCEP v PBS) pro redukci cystinu na cystein a tudíž lepší vazbu SMCC kotvy do buněčné membrány. Hodinu po aplikaci TCEP byly myším podány samotné léčebné látky, které byly aplikovány též intratumorálně po 50 μ l dle skupiny. Terapie takto probíhala ve čtyřech injekčních pulzech (dny 0, 1, 2,...8, 9, 10,...16, 17, 18,... 24, 25, 26). Objem nádorů byl měřen každý druhý den pokusu pomocí kaliperu (ve dnech, kdy se podávala i léčiva, byly nádory měřeny vždy před aplikací terapeutika). Poté bylo sledováno přežívání myší.

4.2 Terapie melanomu pomocí KLH a anti TGF-beta

K tomuto pokusu bylo použito 36 samic C57BL/6N, kterým byly subkutánně transplantovány melanomové buňky. Dvanáctý den (den 0) po transplantaci byly myši náhodně rozděleny do skupin A-K po šesti kusech.

Schéma aplikace terapeutik (skupina a terapeutikum):

- Skupina A - 0,5 mg Resiquimod.HCl / ml 0,2 mM mannan-SMCC v PBS
- Skupina B - 0,5 mg Resiquimod.HCl + 0,5 mg KLH (bez LPS, ENZO Life Sciences) / ml 0,2 mM mannan-SMCC v PBS

- Skupina C - 0,5 mg Resiquimod.HCl + 4,91 ng LPS / ml 0,2 mM mannan-SMCC v PBS
- Skupina D - 0,5 mg Resiquimod.HCl + 0,5 mg KLH (bez LPS, ENZO Life Sciences) + 4,91 ng LPS / ml 0,2 mM mannan-SMCC v PBS
- Skupina E - 0,5 mg Resiquimod.HCl + 0,5 mg anti TGF-beta protilátky / ml 0,2 mM mannan-SMCC v PBS
- Skupina K (kontrola) - PBS

Dle jednotlivých skupin byly myším intratumorálně injikovány léčebné směsi po 50 μ l ve čtyřech pulzech, přičemž jeden pulz trval tři dny (dny 0, 1, 2,...8, 9, 10,...16, 17, 18,...24, 25, 26). Hodinu před aplikací vlastního terapeutického roztoku bylo myším intratumorálně podáno 50 μ l 50 mM TCEP v PBS. Nádory byly kaliperem měřeny každý druhý den experimentu (vždy před aplikací terapie i TCEP). Po ukončení terapie bylo pozorováno přežívání myši po 100 dní. Po 142 dnech od počátku terapie byla přeživším myším provedena retransplantace stejné dávky nádorových buněk do stejného místa.

4.3 Studium nádorové infiltrace při léčbě tzv. komplexní terapií (*Listeria monocytogenes*-SMCC + Resiquimod.HCl + mannan-SMCC + POLY I:C)

Pro studium nádorového infiltrátu bylo použito 51 myši, kterým byly subkutánně transplantovány melanomové buňky B16-F10. Tyto myši byly 12. den po transplantaci náhodně rozděleny do dvou skupin (24 myši do skupiny A a 24 myši do skupiny K, nádory zbylých tří myši byly analyzovány v den 0). Skupině A byla podávána tzv. komplexní terapie, přičemž skupina K byla kontrolní.

Schéma aplikace terapeutik (skupina a terapeutikum):

- Skupina A - 10^9 *Listeria monocytogenes* + 0,5 mg Resiquimod.HCl / ml 0,2 mM mannan-SMCC v PBS (tzv. komplexní terapie)
- Skupina K (kontrola) - PBS

Terapie probíhala v pulzním režimu (dny 0, 1, 2,...8, 9, 10,...16, 17, 18,...24, 25, 26), přičemž v tyto dny bylo myším intratumorálně aplikováno 50 μ l léčebné komplexní směsi či PBS (dle skupiny). Hodinu před každou aplikací látek bylo do nádorů intratumorálně injikováno 50 μ l TCEP. Nádory byly pomocí kaliperu měřeny každý druhý den. Pro analýzu infiltrace byly vždy po čtyřech dnech (dny 3, 7, 11, 15 a 19) z obou skupin odebrány tři myši. Jedna samice s velkým, jedna se středním a jedna s malým nádorem. Tyto myši byly usmrceny stržením vazů a poté jim byly celé nádory vyjmuty pomocí pinzety a nůžek a omyty v RPMI 1640. Nádory byly rozstříhány na menší kousky a vloženy do 2ml mikrozkrumavek s RPMI 1640, DNase I (c = 0,2 mg/ml) a Liberase DL (c = 0,33 mg/ml).

Tyto mikroskopické zkušební nádoby byly umístěny na jednu hodinu na třepačku (400 kmitů/min) do termostatu nastaveného na 37° C. Následně byly vzorky zcentrifugovány (5 min/160 g/4° C) a supernatanty odebrány v množství 600 µl a zamrazeny v - 80° C pro experiment Detekce IFN-gamma v supernatantech z nádorového infiltrátu pomocí ELISA a Detekce IL-10 v supernatantech z nádorového infiltrátu pomocí ELISA. Pelety byly převedeny přes plastové sítko s póry o velikosti 70 µm do centrifugačních zkumavek a doplněny do 500 µl PBS. Takto zpracované nádorové suspenze byly nanášeny po 10 µl do 96 U jamkové destičky. Ke vzorkům bylo přidáno 10 µl předem připravených směsí fluorescenčně značených monoklonálních protilátek. Od každé nádorové suspenze byly vytvořeny 3 jamky, kdy jedna sloužila vždy jako nebarvená kontrola, druhá jako vzorek značení I. a třetí jako vzorek značení II. (Tab.2). Kontrola těchto protilátek byla provedena na vzorku myších splenocytů každý interval experimentu.

Tab.2: Příprava směsí protilátek s navázaným fluoresceinem pro barvení vzorků.

Značení	Název protilátky a fluoresceinu	Typ buněk	Ředění
I	anti-Mouse CD45 PerCP-Cy5.5	leukocyty	200x
	anti-Mouse CD3e FITC	T-lymfocyty	100x
	anti-Mouse CD4 APC	CD4+ lymfocyty	100x
	anti-Mouse CD8a PE-Cy7	CD8+ lymfocyty	100x
	anti-Mouse NK1.1 PE	NK buňky	100x
II	anti-Mouse CD45 PerCP-Cy5.5	leukocyty	200x
	anti-Mouse Ly-6G (Gr-1) Alexa Fluor 700	granulocyty	100x
	anti-Mouse F4/80 Antigen PE-Cy7	monocyty/ makrofágy	100x
	anti-Mouse CD19 APC	B-lymfocyty	100x
	anti-Mouse CD3e FITC	T-lymfocyty	100x

Takto byly suspenze inkubovány v lednici po dobu 20 minut při 4° C. Poté byla destička promyta centrifugací 2 min/424 g/4° C) přidáním 150 µl PBS. K peletu bylo nakonec přidáno 140 µl PBS a 10 µl přepočítávacích kuliček. Vzorky byly analyzovány pomocí průtokového cytometru BD FACSCantoII (BD Biosciences, USA) se správně nastavenými lasery (Tab.3) v programu BD FACSDiva Software.

Tab.3: Nastavení laserů průtokového cytometru.

Nastavení laserů	
Window Extension	2,00
FSC Area Scaling	0,80
Laser Delay Blue	0,00
Laser Delay Red	30,00
Area Scaling Blue	0,80
Area Scaling Red	1,30

4.4 Analýza Th stavu nádorového prostředí

Tento experiment se sestává ze dvou částí a to z pokusu Detekce IFN-gamma v supernatantech z nádorového infiltrátu pomocí ELISA a z pokusu Detekce IL-10 v supernatantech z nádorového infiltrátu pomocí ELISA.

4.4.1 Detekce IFN-gamma v supernatantech z nádorového infiltrátu pomocí ELISA

Pro tento experiment byly použity supernatanty odebírané při zpracování nádorů v experimentu Studium nádorové infiltrace při léčbě tzv. komplexní terapií (*Listeria monocytogenes*-SMCC + Resiquimod.HCl + mannan-SMCC + POLY I:C). Pro pokus byl využit kit Mouse IFN gamma Platinum ELISA (extra sensitive).

Destička s navázanou anti IFN-gamma protilátkou byla dvakrát promyta 400 µl Washbuffer. Poté byla připravena kalibrační řada v duplikátu ředěním dvojkovou řadou. Do dvou jamek, které sloužily jako blank, bylo napipetováno 100 µl Calibrator diluent. Do dalších jamek bylo napipetováno 80 µl Sample diluent, ke kterému bylo poté přidáno 20 µl vlastních vzorků (tedy supernatantů odebíraných při zpracování nádorů z pokusu Studium nádorové infiltrace při léčbě tzv. komplexní terapií (*Listeria monocytogenes*-SMCC + Resiquimod.HCl + mannan-SMCC + POLY I:C)). Zbytek vzorků byl přenesen do mikrozkušavek a opět zamrazen na - 80° C. Takto byl uchován do následujícího pokusu (Detekce IL-10 v supernatantech z nádorového infiltrátu pomocí ELISA). Následně bylo do všech jamek přidáno 50 µl Biotin-Conjugate (Conjugate solution rozředěný Sample diluent v poměru 1:100). Takto připravená destička byla pokryta adhezivním filmem a inkubována při pokojové teplotě po dobu 2 hodin za mírného třepání. Po uplynutí této doby byla tekutina z jamek odstraněna a jamky byly šestkrát promyty 400 µl Washbuffer. Do všech jamek bylo přidáno 100 µl Streptavidin-HRP (Streptavidin-HRP rozředěný AssayBuffer

v poměru 1:100). Destička byla znovu pokryta adhezivním filmem a inkubována při pokojové teplotě po dobu jedné hodiny za mírného třepání. Poté byla tekutina z destičky opět odstraněna a jamky byly promyty stejným způsobem jako po předchozí inkubaci. Ihned po promytí bylo do všech jamek přidáno 100 μ l TMB Substrate Solution. Následovala další inkubace destičky při pokojové teplotě, která byla dle zabarvení kalibrační řady ve správný čas zastavena rychlým přidáním 100 μ l Stop Solution do každé jamky. Hned poté byla destička měřena na Synergy H1 microplate readeru v programu Gen 5 při 450 nm.

4.4.2 Detekce IL-10 v supernatantech z nádorového infiltrátu pomocí ELISA

Pro tento pokus byly použity tytéž supernatanty odebírané při zpracování nádorů z pokusu Studium nádorové infiltrace při léčbě tzv. komplexní terapií (*Listeria monocytogenes*-SMCC + Resiquimod.HCl + mannan-SMCC + POLY I:C) jako v experimentu Detekce IFN-gamma v supernatantech z nádorového infiltrátu pomocí ELISA. Využit byl kit Mouse IL-10 ELISA Kit (sandwich ELISA).

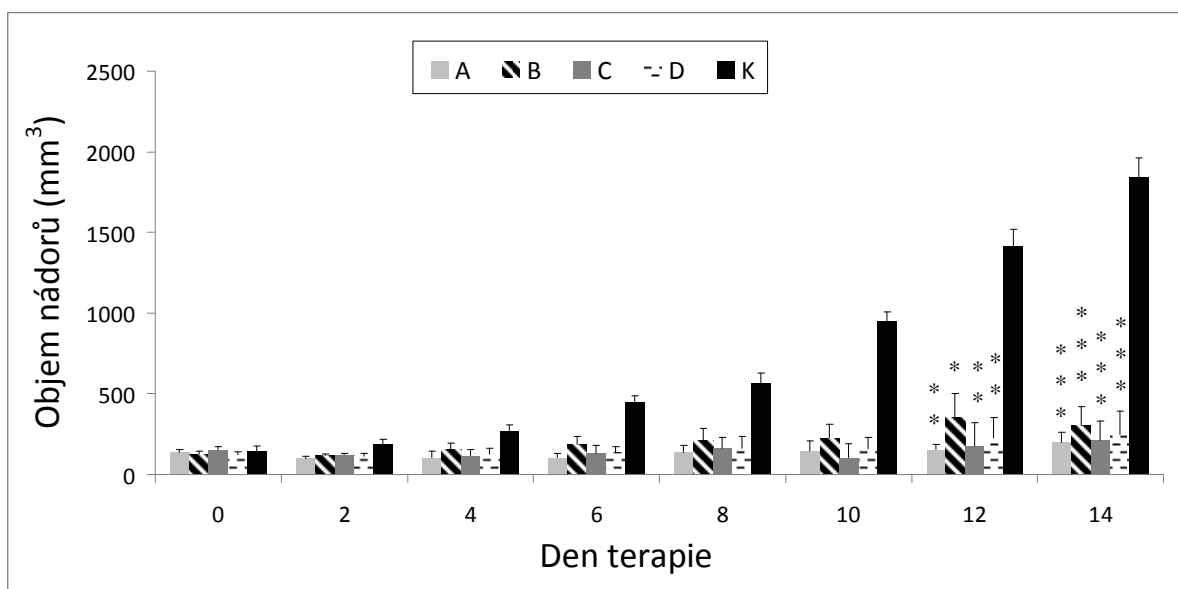
Vzorky byly vyndány z mrazáku a ponechány volně rozmrznout. Následně byly zcentrifugovány (20 min/1000 g/4° C) pro odstranění případných buněk a nečistot, supernatant byl odebrán, přenesen do mikrozkuřavky a 2x naředěn pomocí Sample diluent. Kalibrační řada byla připravována ředěním dvojkovou řadou v mikrozkuřavkách ze Sample diluent a Stock standard (rozpuštěný lyofilizovaný standard v 1 ml Sample diluent, inkubace 10 minut za mírného třepání). Poté byla kalibrační řada přenesena do jamek destičky s navázanou anti IL-10 protilátkou. Do dalších jamek v duplikátech bylo napipetováno 100 µl vzorku. Jako blank bylo použito 100 µl Sample diluent. Destička byla překryta adhezivní folií a inkubována při 37° C po dobu 2 hodin za mírného třepání. Poté byla tekutina z destičky odstraněna a do každé jamky bylo přidáno 100 µl Detection reagent A (1:100 naředěný koncentrovaný Detection reagent A pomocí Assay diluent A). Destička byla znovu překryta filmem, s citem protřepána, aby se promíchal obsah jamek a inkubována jednu hodinu při 37° C za mírného třepání. Následně byla tekutina z destičky odstraněna a jamky byly vysušeny boucháním destičky o savý ubrousek. Poté byla destička třikrát promyta přidáním 350 µl Wash Buffer (deionizovanou vodou 60x naředěný koncentrovaný Wash Buffer), přičemž poslední přidávaný objem byl ponechán v destičce po dobu jedné minuty. Destička byla opět zbavena veškeré tekutiny boucháním o savý ubrousek. Následně bylo do všech jamek přidáno 100 µl Detection reagent B (koncentrovaný Detection reagent B naředěn pomocí Assay diluent B v poměru 1:100). Destička byla překryta folií, s citem lehce protřepána a ponechána inkubovat 1 hodinu při 37° C za mírného třepání. Po inkubaci byla tekutina z destičky odstraněna a jamky byly 5x promyty přidáním 350 µl Wash Buffer. Nakonec bylo do každé jamky přidáno 90 µl Substrate solution a destička byla naposledy překryta adhezivním filmem a ponechána inkubovat v přítmí při 37° C do té doby, než byla reakce dle pozorování intenzity zbarvení kalibrační křivky zastavena rychlým přidáním 50 µl Stop Solution. Vzorky byly měřeny na Synergy H1 microplate readeru v programu Gen 5 při vlnové délce 450 nm.

5 Výsledky

5.1 Terapie melanomu pomocí KLH a bakterie *Listeria monocytogenes*

Úspěšnost terapie a její vliv byl sledován pomocí měření objemu nádorů a přežívání myši. Na Obr.2 je znázorněný vliv léčby na objem nádorů v průběhu terapie.

Z grafu je patrné, že všechny testované směsi látek (skupina A - D) mají pozitivní vliv na redukci nádorového růstu vůči kontrole, tedy u všech směsí byla prokázána statistická významnost od 12. dne léčby.

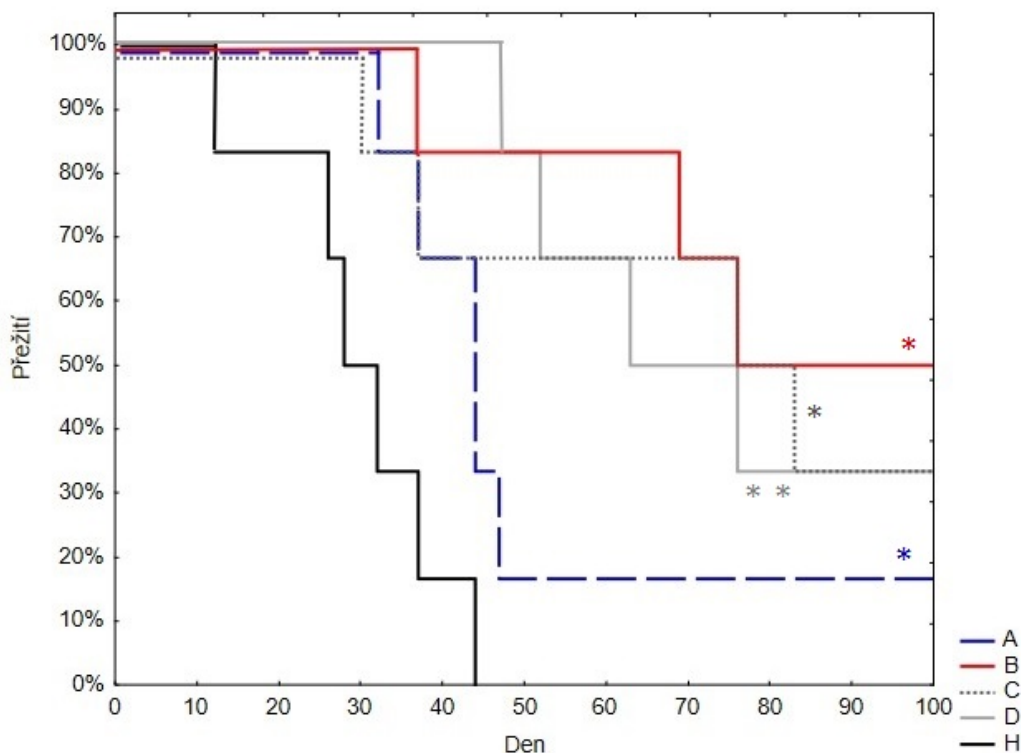


Obr.2: Vliv léčby na melanom B16-F10 v průběhu terapie.

A - *Listeria monocytogenes* + Resiquimod.HCl + mannan-SMCC, **B** - *Listeria monocytogenes*-SMCC + Resiquimod.HCl + mannan-SMCC, **C** - KLH + Resiquimod.HCl + mannan-SMCC, **D** - KLH-SMCC + Resiquimod.HCl + mannan-SMCC, **K** (kontrola) - PBS.

* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.005$, *** $P \leq 0.0005$ vztaženo ke skupině K

Po ukončení terapie bylo sledováno přežívání myší do 100. dne po první aplikaci léčebné směsi. Z těchto dat byly vytvořeny Kaplan - Meier křivky (Obr.3), ze kterých lze soudit, že z pohledu délky přežití se jeví kotvená *Listeria monocytogenes* ve směsi (skupina B) účinněji, než-li nekotvená (skupina A), ovšem tento rozdíl nebyl statisticky významný. Mezi skupinou s kovalentně vázaným (skupina D) a nevázaným (skupina C) KLH nebyl pozorován zásadnější rozdíl v délce přežití myší. Přežití myší ve všech léčených skupinách bylo statisticky významně vyšší ve srovnání s kontrolní skupinou.



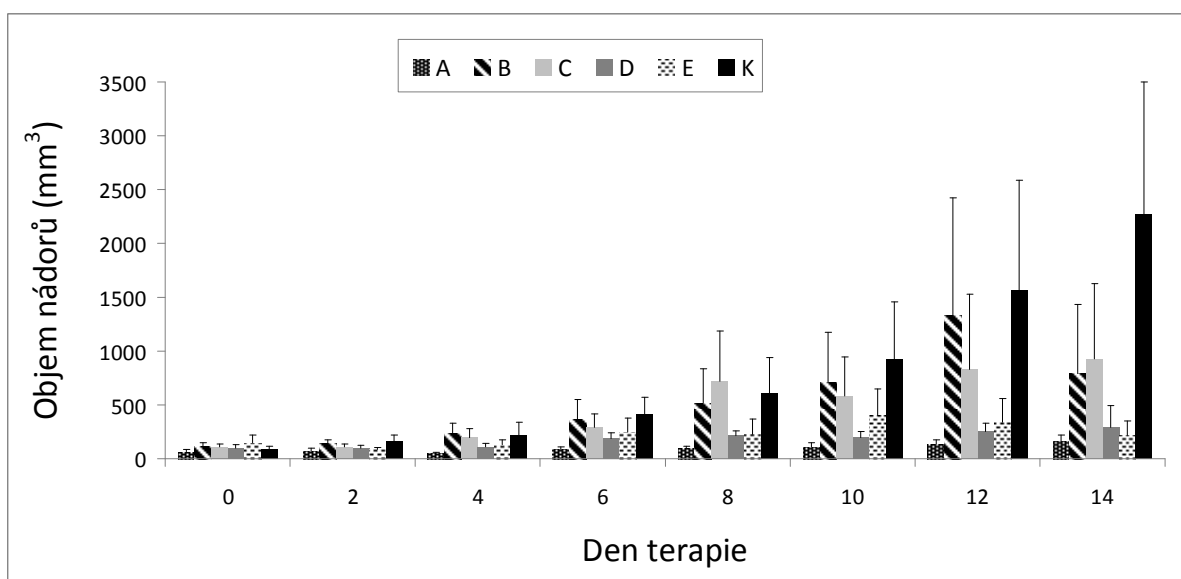
Obr.3: Vliv léčebných směsí s vázanou či nevázanou *Listeria monocytogenes* a vázaným či nevázaným KLH na přežívání myší.

A - *Listeria monocytogenes* + Resiquimod.HCl + mannan-SMCC, **B** - *Listeria monocytogenes*-SMCC + Resiquimod.HCl + mannan-SMCC, **C** - KLH + Resiquimod.HCl + mannan-SMCC, **D** - KLH-SMCC + Resiquimod.HCl + mannan-SMCC, **K** (kontrola) - PBS.

* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ vztaženo ke skupině K

5.2 Terapie melanomu pomocí KLH a anti TGF-beta

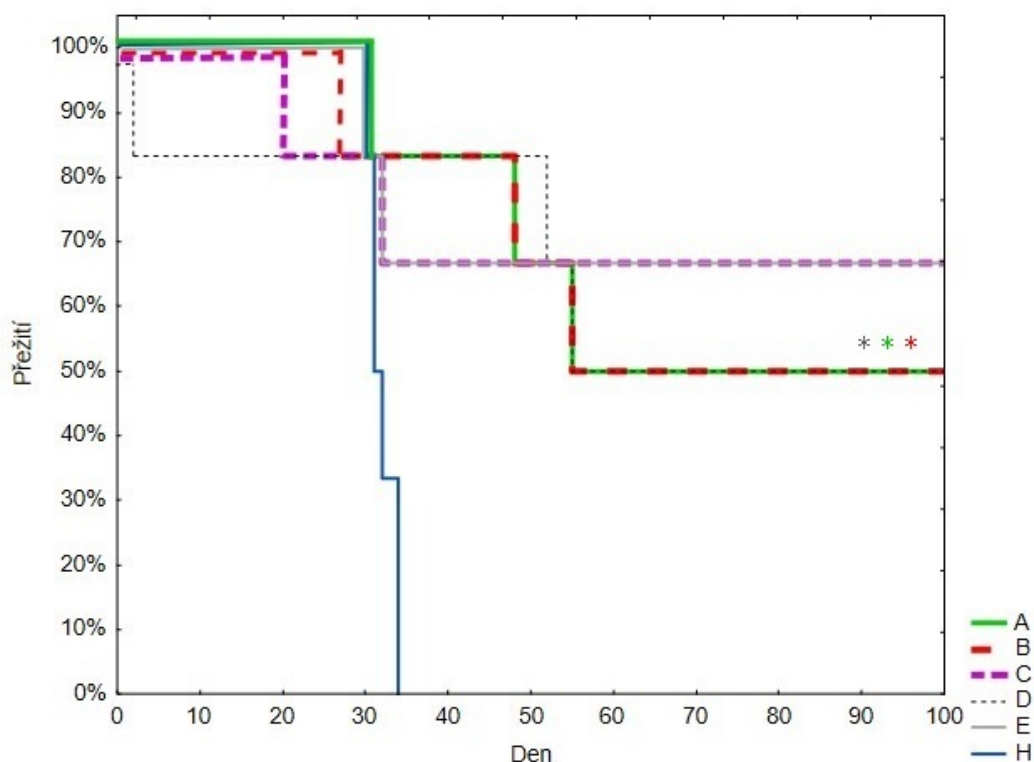
V tomto experimentu byl sledován vliv přidavku anti TGF-beta protilátky a KLH k základní terapeutické směsi Resiquimod.HCl/mannan-SMCC na redukci nádorového objemu a následné přežívání myši po dobu 100 dní od začátku terapie. Jelikož v preparátu KLH od firmy Sigma-Aldrich, použitém v předchozím experimentu, byl detekován LPS, bylo přistoupeno k testování KLH od firmy Enzo Life Sciences, který LPS neobsahuje. Rovněž byl testován samotný LPS v množství, které bylo zjištěno v preparátu firmy Sigma-Aldrich a konečně KLH se stejným přídatkem LPS, který preparát Sigma-Aldrich obsahuje. Jak je zřejmé z Obr.4, největší redukce nádorového růstu bylo dosaženo ve skupině se základní kombinací Resiquimod.HCl/mannan-SMCC a žádný přídatek KLH, LPS, jejich kombinace ani přídatek anti-TGF-beta nevedl ke zesílení účinku základní terapie. Bohužel nebylo u žádné skupiny dosaženo statistické významnosti, pravděpodobně z důvodu velkých směrodatných odchylek.



Obr.4: Vliv terapie na objem melanomu B16-F10.

A - Resiquimod.HCl + mannan-SMCC, **B** - Resiquimod.HCl + mannan-SMCC + KLH (bez LPS), **C** - Resiquimod.HCl + mannan-SMCC + LPS (4,91 ng/ml), **D** - Resiquimod.HCl + mannan-SMCC + KLH (bez LPS) + LPS (4,91 ng/ml), **E** - Resiquimod.HCl + mannan-SMCC + anti TGF-beta protilátka, **K** (kontrola) - PBS.

Co se týče přežití, tak 50 % přežití dané základní terapeutickou směsí (skupina A) přídatkem KLH bez LPS ovlivněno nebylo (skupina B) a ani přídavek LPS v kombinaci s KLH se neprojevil (skupina D). Přidání samotného LPS k základní terapeutické směsi zvýšilo přežití na 66%, tento rozdíl však nebyl statisticky významný. U skupiny A, B a D bylo dosaženo statistické významnosti oproti skupině K (Obr.5).



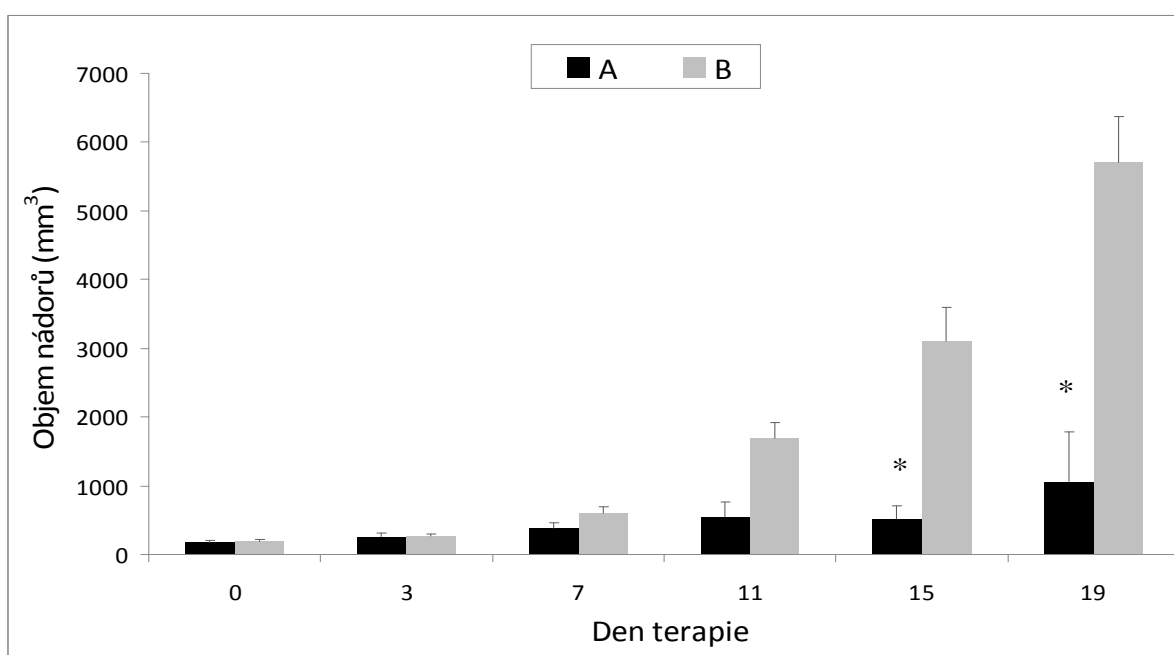
Obr.5: Vliv léčebných směsí s KLH a anti TGF-beta protilátkou na délku přežití.

A - Resiquimod.HCl + mannan-SMCC, **B** - Resiquimod.HCl + mannan-SMCC + KLH (bez LPS, ENZO), **C** - Resiquimod.HCl + mannan-SMCC + LPS (4,91 ng/ml), **D** - Resiquimod.HCl + mannan-SMCC + KLH (bez LPS, ENZO) + LPS (4,91 ng/ml), **E** - Resiquimod.HCl + mannan-SMCC + anti TGF-beta protilátka, **K** (kontrola) - PBS
 $*P \leq 0.05$ vztaženo ke skupině K

Po 142 dnech od začátku terapie byla provedena podkožní retransplantace nádorových buněk všem přeživším myším (10 myší). Tyto buňky se ujaly pouze jedné myši ze skupiny A a jedné ze skupiny C (20 %).

5.3 Studium nádorové infiltrace při léčbě tzv. komplexní terapií (*Listeria monocytogenes*-SMCC + Resiquimod.HCl + mannan-SMCC + POLY I:C)

V tomto pokusu byl sledován leukocytární infiltrát uvnitř nádoru a objemy nádorů v průběhu tzv. komplexní terapie, kterou představuje směs bakterie *Listeria monocytogenes*, Resiquimodu.HCl, mannanu-SMCC a POLY I:C. Na Obr.6 je znázorněn vliv této léčby na redukci nádorového růstu v průběhu terapie, přičemž je patrné, že patnáctý a devatenáctý den terapie bylo dosaženo statistické významnosti redukce objemu nádorů u léčené skupiny oproti kontrole (skupina K). Dále již nebylo možné v analýze nádorového infiltrátu pokračovat, jelikož u skupiny A došlo k vyléčení myši a vymizení nádorů.



Obr.6: Objemy nádorů v průběhu tzv. komplexní terapie.

A - *Listeria monocytogenes* + Resiquimod.HCl + mannan-SMCC + POLY I:C, **K** (kontrola) - PBS.

* $P \leq 0.0005$ vztaženo ke skupině K

Na Obr.7 je graficky zpracováno složení nádorového infiltrátu ve dnech 0, 3, 7, 11, 15 a 19. Tmavě šedý sloupeček ve dni 0 znázorňuje skupinu tří myší, kterým nebyla podána ani léčba ani kontrolní PBS. Z grafu lze vyčíst, že po léčebném pulzu populace **CD45+** buněk (leukocyty) vždy poklesla a naopak před terapeutickým pulzem vzrostla ještě na vyšší hodnotu, než jaká byla naměřena před pulzem. Větší množství buněk **CD45+** oproti kontrole bylo pozorováno u skupiny A, tedy u myší léčených tzv. komplexní terapií, přičemž vrcholu bylo dosaženo 15. den terapie.

Změny v množství buněk **CD3+** (lymfocyty) v průběhu terapie více méně kopírují změny leukocytů (buňky **CD45+**), pouze s tím rozdílem, že ode dne 11 se u kontrolní skupiny množství těchto buněk téměř nemění.

Dále byly analyzovány jednotlivé subpopulace lymfocytů:

Buňky **CD4+** (Th lymfocyty) tvoří převážnou část lymfocytárního infiltrátu, u kontrolní skupiny se jejich množství příliš nemění, u léčené skupiny počty opět klesají či stoupají v závislosti na pulzech terapie.

Buňky **CD8+**, představující Tc lymfocyty, se pohybují pouze v řádu několika málo stovek na mm^3 , u léčené skupiny bylo jejich maxima dosaženo 7. den terapie.

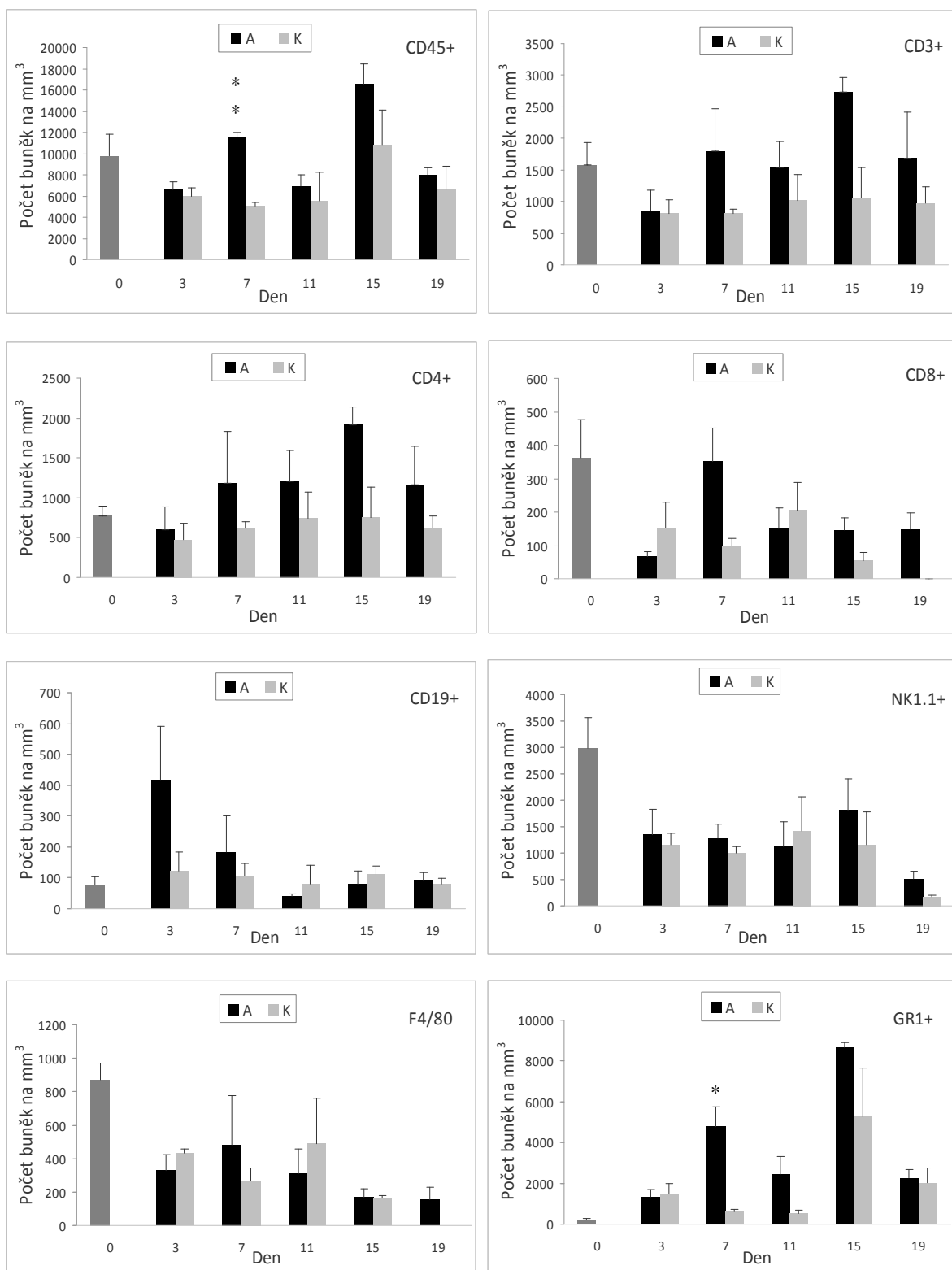
Posledním analyzovaným typem lymfocytů byly **CD19+** buňky (B lymfocyty), jejichž množství se pohybuje pouze kolem sta buněk na mm^3 jak u léčené, tak u kontrolní skupiny, proto jejich analýza nemá příliš velkou výpovědní hodnotu. U léčené skupiny byl zaznamenán jejich nárůst v den 3, tedy po prvním pulzu terapie, kdy se množství těchto buněk vyšplhalo na cca 400 buněk/ mm^3 .

Buňky **NK1.1+** (NK buňky) byly v největším množství přítomny u skupiny tří myší, kterým nebyly injikovány žádné látky a jejichž melanomy byly analyzovány v den 0. Ani u léčené skupiny A, ani u kontrolní skupiny K se počty NK buněk v průběhu experimentu nikterak výrazněji neměnily, až 19. den byl zaznamenán jejich pokles o 71,5% u skupiny A a o 77,5% u skupiny K.

U monocytů/makrofágů (**F4/80**) byl též zaznamenán pokles oproti dnu 0, přičemž 3. a 11. den terapie dokonce jejich množství lehce převažovalo u neléčené skupiny K oproti skupině léčené tzv. komplexní terapií. Počty buněk **F4/80** se držely v řádu stovek na mm^3 , proto nelze z jejich množství vyvozovat žádné závěry.

Vůbec největší zastoupení v nádorovém infiltrátu zaujímají granulocyty (**GR1+**), jejichž množství bylo v den 0, kdy ještě nebyla do melanomu aplikována žádná látka, pouze cca. 200 buněk/ mm^3 . V den 3, tedy po prvním pulzu terapie, se jejich množství zvýšilo jak u skupiny A, tak u skupiny K, ovšem 7. den terapie došlo u léčené skupiny A k dalšímu nárůstu na téměř 5000 buněk/ mm^3 , naopak u skupiny K byl zaznamenán jejich pokles o více

než polovinu. V den 15 dosáhl granulocytární infiltrát svého maxima (téměř 9000 buněk/mm³ u skupiny A, více než 5000 buněk/mm³ skupiny K).



Obr.7: Nádorová infiltrace CD45+ buněk, CD3+ buněk, CD4+ buněk, CD8+ buněk, CD19+ buněk, NK1.1+ buněk, F4/80+ buněk a GR1+ buněk u skupiny A (tzv. komplexní terapie) a kontrolní skupiny K (PBS) v průběhu terapie.

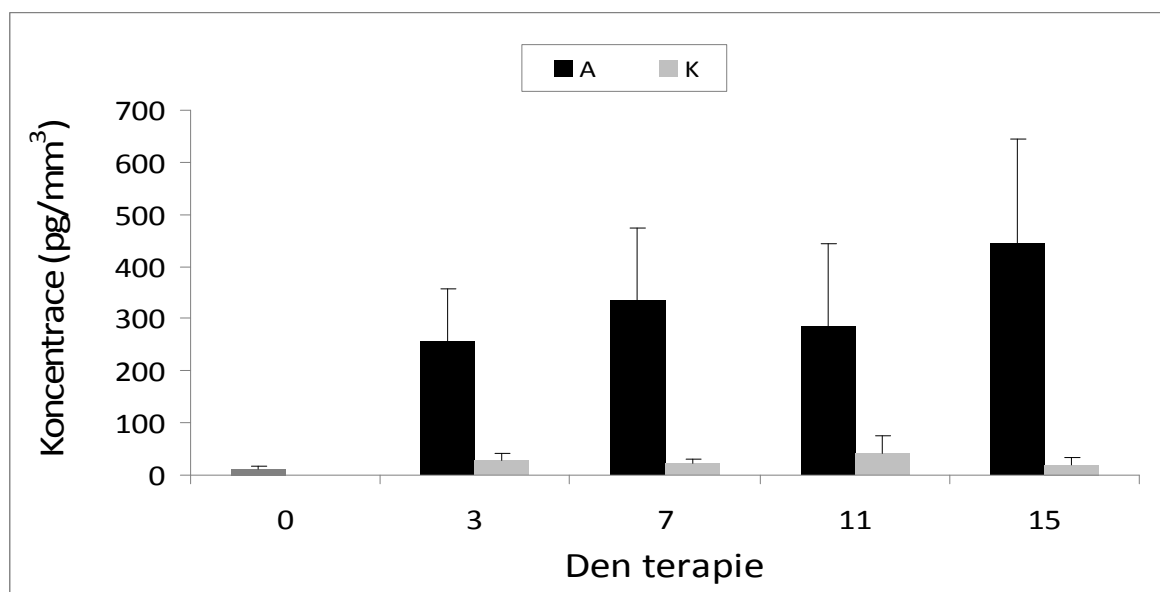
*P < 0,05, **P < 0,005 vztaženo ke skupině K

5.4 Analýza Th stavu nádorového prostředí

5.4.1 Detekce IFN-gamma v supernatantech z nádorového infiltrátu pomocí ELISA

V tomto experimentu byl extracelulárně detekován IFN-gamma produkovaný v nádoru jakožto informace o stavu Th1 či Th2 odpovědi v nádorovém prostředí v průběhu terapie. Využity byly supernatanty odebrané v průběhu pokusu Studium nádorové infiltrace při léčbě tzv. komplexní terapií (*Listeria monocytogenes*-SMCC + Resiquimod.HCl + mannan-SMCC + POLY I:C) při zpracování nádorů.

Z naměřených hodnot absorbancí standardu v duplikátu byl vypočten jejich průměr, od kterého byl poté odečten blank. Z těchto dat a koncentrací standardu byla vytvořena kalibrační křivka, ze které byly odečítány koncentrace naměřeného IFN-gamma v jednotlivých vzorcích v pg/mm^3 (Obr.8). Ačkoli nebylo dosaženo statistické významnosti léčené skupiny vůči skupině kontrolní, a to jak v přepočtu na mm^3 tak na celý objem nádoru, lze si všimnout, že hodnoty koncentrace IFN-gamma u léčené skupiny A jsou oproti kontrolní skupině K znatelně vyšší.

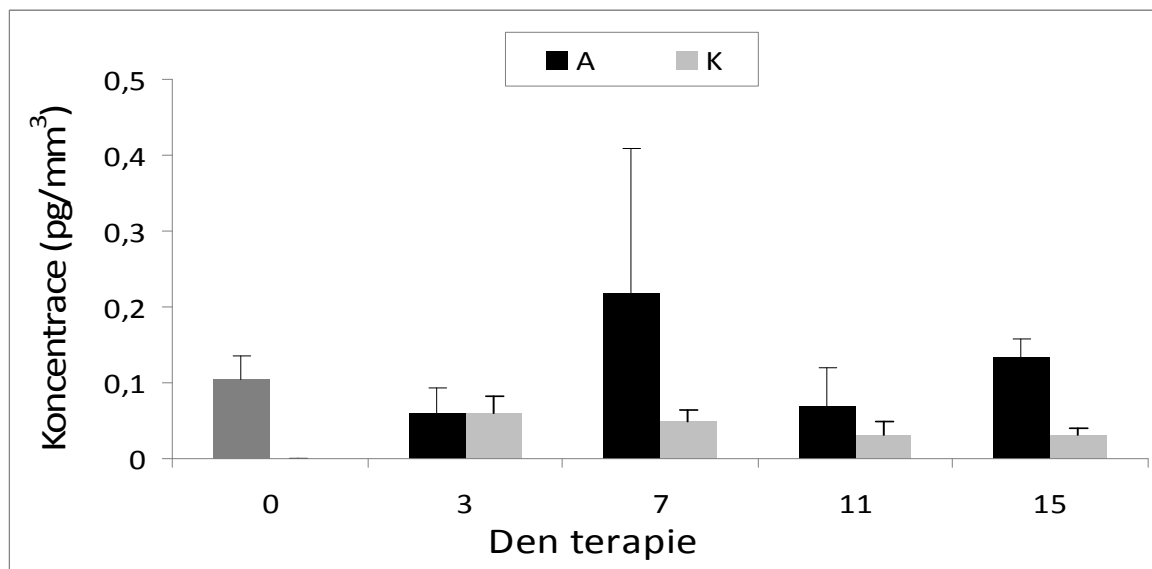


Obr.8: Koncentrace IFN-gamma v pikogramech v přepočtu na mm^3 nádoru.

A - *Listeria monocytogenes* + Resiquimod.HCl + mannan-SMCC + POLY I:C,
K (kontrola) - PBS.

5.4.2 Detekce IL-10 v supernatantech z nádorového infiltrátu pomocí ELISA

V tomto experimentu bylo stanovováno množství produkovaného IL-10 v prostředí nádoru jakožto informace o stavu Th1 či Th2 odpovědi v průběhu terapie (Obr.9). Pro tento pokus byly použity tytéž supernatany jako v pokusu Detekce IFN-gamma v supernatantech z nádorového infiltrátu pomocí ELISA, tedy supernatanty odebrané při zpracování nádorů z experimentu Studium nádorové infiltrace při léčbě tzv. komplexní terapií (*Listeria monocytogenes*-SMCC + Resiquimod.HCl + mannan-SMCC + POLY I:C).

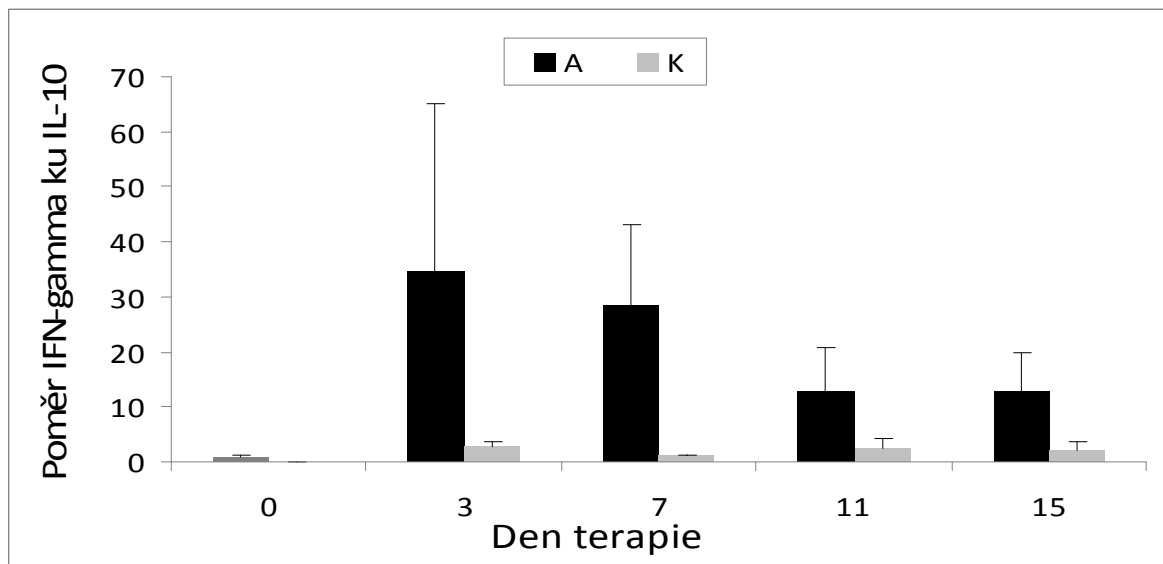


Obr.9: Koncentrace IL-10 v pikogramech v přepočtu na mm³ nádoru.

A - *Listeria monocytogenes* + Resiquimod.HCl + mannan-SMCC + POLY I:C,
K (kontrola) - PBS.

5.4.3 Poměr IFN-gamma a IL-10 jakožto ukazatel Th stavu v nádoru

Po vypočítání koncentrací IL-10 na mm^3 pro jednotlivé nádory (Obr.9) byly tyto hodnoty dány do poměru s koncentrací IFN-gamma (Obr.8) jakožto ukazatel Th stavu (Obr.10). Z grafu je zřejmé, že v den 0 byla v nádoru Th2 odpověď (IFN-gamma:IL-10 = 0,77:1), ovšem již 3. den terapie se poměr změnil tak, že nastal stav Th1 (IFN-gamma:IL-10 = 34,5:1), který byl udržován i nadále.



Obr.10: Poměr IFN-gamma ku IL-10 u léčené a kontrolní skupiny v přepočtu na mm^3 v průběhu terapie.

A - *Listeria monocytogenes* + Resiquimod.HCl + mannan-SMCC + POLY I:C,
K (kontrola) - PBS.

6 Diskuze

Imunoterapie je v dnešní době vnímána jako nadějný přístup k léčbě nádorových onemocnění. Tato bakalářská práce navazuje na několikaletý výzkum našeho týmu pod vedením RNDr. Jana Ženky, CSc., který si klade za cíl vyvinout účinný lék pro léčbu nádorových onemocnění, jenž by našel uplatnění v lidské onkologii.

Cílem této práce bylo pokusit se zlepšit působení kombinace látek, které námi byly používány doposud, a to použitím dalších TLR agonistů, KLH či blokad TGF-beta. Dále bylo pozorováno složení buněčného infiltrátu a míra zapojení získané imunity v protinádorovém působení společně se sledováním Th1/Th2 stavu odpovědi v průběhu imunoterapie.

Pokus č. 1 této práce navazuje na snahu kolegyně Kumžákové nahradit LPS kovalentně vázanou bakterií *Listeria monocytogenes*, jelikož její buněčná stěna LPS neobsahuje, a to v kombinaci s též kovalentně kotveným mannanem, R-848 a POLY I:C (Kumžáková, 2015). V této práci byla sledována vhodnost použití kotveného či nekotveného TLR 2 agonisty, tedy *Listerie monocytogenes*. Synergii TLR receptorů s ligandy spojenými s fagocytózou popsal Underhill a Ganter (Underhill a Ganter, 2004). Tom s kolegy prosazuje kovalentní kotvení terapeutik k povrchu nádorových buněk, jelikož je tak zvýšena aktivita dendritických buněk proti nádorům a zároveň dle výsledků svých experimentů zdůrazňují důležitost použití vícero chemicky konjugovaných PAMPs pro zvýšení efektivity léku, protože tak dochází k navýšení aktivace imunitního systému. Prokázali, že kovalentní konjugace vícero PAMPs motivů k potencionálním TAA (tumor-associated antigens) může zvyšovat aktivaci imunitního systému primingem naivních T lymfocytů (Tom a kol., 2013). Pozorování redukce nádorového růstu použitím kovalentně kotvené a nekotvené *Listeria monocytogenes* v této práci neprokázalo, že by jedna z možností byla jednoznačně přínosnější, ovšem křivky přežití ukazují, že z hlediska délky přežívání je kotvená *Listeria monocytogenes* účinnější (50 % jedinců se dožilo hranice 100 dní), přestože toto tvrzení není statisticky významné.

Použití KLH v pokusu č. 2 přímo navazuje na pokus č. 1, kde byl prokázán jeho pozitivní vliv na redukci nádorového růstu, ať už bylo KLH kovalentně kotvené či nekotvené. Avšak po analýze KLH od firmy Sigma-Aldrich bylo zjištěno, že obsahuje 4,91 ng/ml LPS a tedy bylo potřeba ověřit, zda jeho pozitivní vliv není způsoben právě tímto obsahem LPS. Proto bylo využito KLH od firmy Enzo Life Sciences, které LPS neobsahovalo. Bohužel významnost pozitivního účinku KLH bez obsahu LPS na redukci

nádorového růstu prokázána nebyla a jeho pozitivní účinky prokázané v prvním experimentu přisuzují spíše LPS v něm obsaženém, byť se vyskytovalo v malém množství. Vysvětlením, proč KLH neúčinkoval tak, jak jsme doufali, by mohla být skutečnost, že KLH není TLR ligandem a tudíž neindukuje tvorbu prozánětlivých cytokinů a nepodporuje vyžrávání dendritických buněk. Ovšem zásadní je, že KLH je antigen a samotný proto indukuje stav Th2 (Yeung a kol., 1998; Falcone a Bloom, 1997). Z tohoto pohledu je tedy vhodnějším přístupem použití TLR agonistů, nikoli KLH.

V tomto experimentu byl také sledován příspěvek blokace TGF-beta protilátkou. Ani tato inhibice se nezdá být pro naši terapii velmi přínosnou, možným důvodem může být fakt, že myší model B16-F10 je imunogenní pouze slabě a výskyt Treg lymfocytů je zde nízký (Ženka, ústní sdělení) a proto není inhibice TGF-beta v tomto případě tolik potřebná. Další možnou spekulací je, že pod vlivem prozánětlivých cytokinů (IL-1, IL-6) diferencují naivní T lymfocyty v Th17 lymfocyty (Kimura and Kishimoto, 2010) spíše než v Treg a tudíž je zde málo TGF-beta a není ho potřeba blokovat. Ovšem u skupiny s přidáním anti TGF-beta protilátkou bylo dosaženo 67% přežití, ačkoli tato skutečnost nebyla statisticky významná.

Za ukazatele míry zapojení získané imunity v experimentu č. 2 lze pokládat sledování úspěšnosti či neúspěšnosti retransplantace melanomu B16-F10. Přestože se v minulosti naše laboratoř zabývala zejména působením vrozené imunity na redukci nádorů, uvědomujeme si, že i imunita získaná zde hraje významnou roli. Jelikož se nádorové buňky ujaly pouze u 20 % myší, lze předpokládat, že vrozená imunita předala informaci imunitě získané, došlo k uložení informace do paměťových buněk a tedy se lze na naši léčbu dívat též z pohledu vakcinace. Toto je další výhodou terapie bez LPS, která způsobovala rychlé vyléčení, nikoli pozvolné, což mělo za následek, že se získaná imunita nestihla zapojit (Ženka, ústní sdělení).

Sledování nádorového infiltrátu v průběhu terapie ukázalo, že největší zastoupení zde mají granulocyty, což se shoduje s výsledky kolegyně Kovářové, která pro léčbu použila Zymosan-SMCC, kdy po 48 hodinách od intratumorální injekce léčebné látky vystoupilo množství granulocytů na cca 3200 na mm^3 (Kovářová, 2015). Z celkového leukocytárního buněčného infiltrátu zaujímají buňky získané imunity zhruba 15 %, u kolegyně Kovářové to byla pouze 2 %, což potvrzuje naši hypotézu o vhodnosti užití vícero TLR agonistů, čímž se zajistí komplexní TLR signalizace a vyžrávání dendritických buněk. Také Janotová s kolegy prokázala, že v nádorovém infiltrátu převládají granulocyty a to při léčbě hydrofobně kotveným mannanem s LPS, laminarinem-BAM s LPS, f-MLFKK-BAM s LPS a LPS samotným, kdy se jejich maximální množství vyšplhalo na cca 12000 na mm^3 po 24 hodinách u skupiny f-MLFKK-BAM. U léčby mannan-BAM a v menší míře u léčby

mannan-BAM s LPS byl zaznamenán také částečný nárůst B lymfocytů a NK buněk (Janotová a kol., 2014). Kolegyně Jačková použila pro léčbu melanomu B16-F10 *Mycobacterium tuberculosis*-SMCC a i ona zaznamenala největší podíl granulocytů na leukocytárním infiltrátu (Jačková, 2015). Tento pokus tedy prokázal, jaké buňky imunitního systému a v jaké míře se vyskytují v nádorové masě a mohou být potenciálně zodpovědné za její likvidaci. Dle výsledků Janotové s kolegy lze usuzovat, že použití LPS vyúsťuje ve vyšší množství granulocytárního infiltrátu, ale opět docházím k závěru, že s použitím *Listerie monocytogenes* má terapie delší průběh a více se blíží vakcinačnímu schématu, dojde k zapojení získané imunity a nehrozí zde nastolení tolerance vyvolané nadměrnou dávkou antigenu jako tomu může být u LPS (Janotová a kol., 2014).

Dle poměru IFN-gamma ku IL-10 bylo stanovováno Th prostředí uvnitř nádorů. Z výsledků vyplývá, že před započatím léčby vládl v nádoru stav Th2, čili pronádorový, ovšem již třetí den se stav změnil na Th1, tedy protinádorový. Toto zjištění je velice významné, jelikož potvrzuje, že je naše terapie dostatečně účinná v aktivaci imunitního systému proti nádorovým buňkám a je tak potenciálně vhodným imunoterapeutikem. Důvodem, proč na počátku experimentu převládal v nádoru stav Th2, může být skutečnost, že v nádorovém mikroprostředí je tendence k supresi produkce IL-12, což často vyúsťuje ve sníženou Th1 aktivitu, která by normálně mobilizovala imunitní odpověď proti nádorovým antigenům (Kidd, 2003). Terapeutika R-848 i POLY I:C vedou k produkci IL-12, který způsobuje nastolení stavu Th1, který je charakterizován mimo jiné IFN-gamma, pod jehož vlivem se naivní dendritické buňky stávají buňkami DC1s, které pak produkují hojně množství IL-12 a takto řídí a dále stabilizují Th1 polarizaci (Ria a kol., 1998).

7 Závěr

- Byl studován účinek kotvené a nekotvené bakterie *Listeria monocytogenes* na redukci nádorového růstu a přežívání jedinců.
- Bylo zjištěno, že pozitivní vliv KLH na redukci nádorového růstu byl způsoben LPS v něm obsaženém.
- Byla provedena retransplantace melanomových buněk vyléčeným jedincům a dle těchto výsledků bylo usouzeno, že se procesu boje proti nádorům zapojuje i získaná imunita.
- Blokace TGF-beta protilátkou nebyla pro terapii příliš přínosná.
- Byl studován buněčný infiltrát nádoru v průběhu imunoterapie založené na použití TLR agonistů a mannanu metodou průtokové cytometrie. Největší zastoupení zde měly granulocyty.
- Bylo stanovováno množství IFN-gamma a IL-10 v nádoru v průběhu léčby. Imunoterapie založená na kombinaci vícero TLR agonistů a aktivací fagocytózy vede k nastolení protinádorové Th1 imunitní odpovědi.

8 Seznam použité literatury

Akira S., Uematsu S., Takeuchi O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124: 783-801.

Amos S.M., Duong C.P., Westwood J.A., Ritchie D.S., Junghans R.P., Darcy P.K., Kershaw M.H. (2011). Autoimmunity associated with immunotherapy of cancer. *Blood*, 118: 499-509.

Armitage P., Doll R. (1954). The age distribution of cancer and a multi-stage theory of carcinogenesis. *British Journal of Cancer*, 8: 1-12.

Autier P., Doré J. F. (1998). Influence of sun exposures during childhood and during adulthood on melanoma risk. *International Journal of Cancer*, 77: 533-537.

Bach E.A., Aguet M., Schreiber R.D. (1977). The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annual Review of Immunology*, 15: 563-91.

Balkwill F. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? (2002). *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 13: 135-41.

Bell J.K., Mullen G.E., Leifer C.A., Mazzoni A., Davies D.R., Segal D.M. (2003). Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends in Immunology*, 24: 528-533.

Bernasconi N.L., Traggiai E., Lanzavecchia A. (2002). Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science*, 298: 2199-2202.

Bieniarz C., Husain M., Barnes G., King C.A., Welch C.J. (1996). Extended length heterobifunctional coupling agents for protein conjugations. *Bioconjugate Chemistry*, 7: 88-95.

Black S., Kushner I., Samols D. (2004). C-reactive Protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 279: 48487-48490.

Blander J.M., Medzhitov R. (2006). Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. *Nature*, 440: 808-812.

Boxx G.M., Kozel T.R., Nishiya C.T., Zhang M.X. (2010). Influence of mannan and glucan on complement activation and C3 binding by *Candida albicans*. *Infection and Immunity*, 78: 1250-1259.

Bruna M.J., Luistro L., Warriar R.R., Wright R.B., Hubbard B.R., Murphy M., Wolf S.F., Gately M.K. (1993). Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors. *The Journal of Experimental Medicine*, 178: 1223-1230.

Burch P.A., Croghan G.A., Gastineau D.A., Jones L.A., Kaur J.S., Kylstra J.W., Richardson R.L., Valone F.H., Vuk-Pavlović S. (2004). Immunotherapy (APC8015, Provenge) targeting prostatic acid phosphatase can induce durable remission of metastatic androgen-independent prostate cancer: a Phase 2 trial. *Prostate*, 60: 197-204.

Büttner P., Garbe C., Bertz J., Burg G., d'Hoedt B., Drepper H., Guggenmoos-Holzmann I.,

Lechner W., Lippold A., Orfanos C. E., et al. (1995). Primary cutaneous melanoma. Optimized cutoff points of tumor thickness and importance of clark's level for prognostic classification. *Cancer*, 75: 2499-2506.

Cantor H., Boyse E.A. (1975). Functional subclasses of T-lymphocytes bearing different Ly antigens. I. The generation of functionally distinct T-cell subclasses is a differentiative process independent of antigen. *The Journal of Experimental Medicine*, 141: 707-718.

Cascino I., Papoff G., De Maria R., Testi R., Ruberti G. (1996). Fas/Apo-1 (CD95) receptor lacking the intracytoplasmic signaling domain protects tumor cells from Fas-mediated apoptosis. *The Journal of Immunology*, 156: 13-17.

Center M. M., Jemal, A., Smith R. A., Ward E. (2009). Worldwide Variations in Colorectal Cancer. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 59: 366-378.

Clark W. H., Elder D. E., Guerry D. P., Braitman L. E., Trock B. J., Schultz D., Synnestvedt M., Halpern A. C. (1989). Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *Journal of the National Cancer Institute*, 81: 1893-1904.

Coley W.B. (1891). II. Contribution to the Knowledge of Sarcoma. *Annals of Surgery*, 14: 199-220.

Coley W.B. (1910). The treatment of inoperable sarcoma by bacterial toxins (the mixed toxins of the Streptococcus erysipelas and the Bacillus prodigiosus). *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 3: 1-48.

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 6682-6687.

de Waal-Malefyt R., Haanen J., Spits H., Roncarolo M.G., Velde A., Figdor C., Johnson K., Kastelein R., Yssel H., de Vries J.E. (1991). Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *The Journal of Experimental Medicine*, 174: 915-924.

de Waal-Malefyt R., Abrams J., Bennett J., Figdor C., y de Vries J. (1991). Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, 174: 1209-20.

Deaglio S, Dwyer K.M., Gao W., Friedman D., Usheva A., Erat A., Chen J.F., Enjyoji K., Linden J., Oukka M., Kuchroo V.K., Strom T.B., Robson S.C. (2007). Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *The Journal of Experimental Medicine*, 204: 1257-1265.

Dighe A.S., Richards E., Old L.J., Schreiber R.D. (1994). Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity*, 1: 447-456.

Dranoff G. (2004). Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature Reviews*

Cancer, 4: 11-22.

Drickamer K., Dodd R.B. (1999). C-Type lectin-like domains in *Caenorhabditis elegans*: predictions from the complete genome sequence. *Glycobiology*, 9: 1357-1369.

Dušek L., Mužík J., Gelnarová E., Fínek J., Vyzula R., Abrahámová J. (2010). Cancer incidence and mortality in the Czech Republic. *Klinická onkologie*, 23: 311-324.

Facciabene A., Motz G.T., Coukos G. (2012). T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis. *Cancer Research*, 72: 2162-2171.

Falcone M, Bloom BR. (1997). A T helper cell 2 (Th2) immune response against non-self antigens modifies the cytokine profile of autoimmune T cells and protects against experimental allergic encephalomyelitis. *The Journal of Experimental Medicine*, 185: 901-907.

Fidler I. J. (1975). Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival *in vivo*. *Cancer Research*, 35: 218-224.

Fidler I. J., Kripke M. L. (1977). Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science*, 197: 893-89.

Figdor C.G., van Kooyk Y., Adema GJ. (2002). C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nature Reviews Immunology*, 2: 77-84.

Filella X., Alcover J., Zarco M.A., Beardo P., Molina R., Ballesta A.M. (2000). Analysis of type T1 and T2 cytokines in patients with prostate cancer. *Prostate*, 44: 271-274.

Flo T.H., Halaas O., Lien E., Ryan L., Teti G, Golenbock D.T., Sundan A., Espevik T. (2000). Human toll-like receptor 2 mediates monocyte activation by *Listeria monocytogenes*, but not by group B streptococci or lipopolysaccharide. *The Journal of Immunology*, 164: 2064-2069.

Florentino D.F., Zlotnik A., Vieira P., Mosmann T.R., Howard M., Moore K.W., O'Garra A. (1991). IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *The Journal of Immunology*, 146: 3444-3451.

Gabrilovich D. I., Chen H. L., Girgis K. R., Cunningham H. T., Meny G. M., Nadaf S., Kavanaugh D., Carbone D. P. (1996). Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nature Medicine*, 2: 1096-1103.

Gabrilovich D.I., Cunningham H.T., Carbone D.P. (1996). IL-12 and mutant P53 peptide-pulsed dendritic cells for the specific immunotherapy of cancer. *Journal of immunotherapy with emphasis on tumor immunology: official journal of the Society for Biological Therapy*, 19: 414-418.

Gattinoni L., Lugli E., Ji Y., Pos Z., Paulos C.M., Quigley M. F., Almeida J.R., Gostick E., Yu Z., Carpenito C., Wang E., Douek D.C., Price D.A., June C.H., Marincola F.M., Roederer M., Restifo N.P. (2011). A human memory T-cell subset with stem cell-like properties. *Nature Medicine*, 17: 1290-1297.

Girardin S.E., Boneca I.G., Viala J., Chamaillard M., Labigne A., Thomas G., Philpott D.J., Sansonetti P.J. (2003). Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *The Journal of Biological Chemistry*, 278: 8869-8872.

Glehen O., Kwiatkowski F., Sugarbaker P.H., Elias D., Levine E.A., De Simone M., Barone R., Yonemura Y., Cavaliere F., Quenet F., Gutman M., Tentes A.A., Lorimier G., Bernard J.L., Bereder J.M., Porcheron J., Gomez-Portilla A., Shen P., Deraco M., Rat P. (2004). Cytoreductive surgery combined with perioperative intraperitoneal chemotherapy for the management of peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer: a multi-institutional study. *Journal of Clinical Oncology*, 22: 3284-3292.

Gorden K.B., Gorski K.S., Gibson S.J., Kedl R.M., Kieper W.C., Qiu X., Tomai M.A., Alkan S.S., Vasilakos J.P. (2005). Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8. *The Journal of Immunology*, 174: 1259-1268.

Gorelik L., Flavell R. A. (2001). Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells. *Nature Medicine*, 7: 1118-1122.

Greenberg S., Grinstein S. (2002). Phagocytosis and innate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 14: 136-145.

Haabeth O.A., Lorvik K.B., Hammarström C., Donaldson I.M., Haraldsen G., Bogen B., Corthay A. (2011). Inflammation driven by tumour-specific Th1 cells protects against B-cell cancer. *Nature Communications*, 2: 240.

Hanahan D., Weinberg R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144: 646-74.

Hart I. R. (1979). The selection and characterization of an invasive variant of the B16 melanoma. *The American Journal of Pathology*, 97: 587-600.

Hicklin D.J., Marincola F. M., Ferrone S. (1999). HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story. *Molecular Medicine Today*, 15:178-86.

Hicks A.M., Riedlinger G., Willingham M.C., Alexander-Miller M.A., Von Kap-Herr C., Pettenati 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.

Hodi F.S., O'Day S.J., McDermott D.F., Weber R.W., Sosman J.A., Haanen J.B., Gonzalez R., Robert C., Schadendorf D., Hassel J.C., Akerley W., van den Eertwegh A.J., Lutzky J., Lorigan P., Vaubel J.M., Linette G.P., Hogg D., Ottensmeier C.H., Lebbé C., Peschel C., Quirt I., Clark J.I., Wolchok J.D., Weber J.S., Tian J., Yellin M.J., Nichol G.M., Hoos A., Urba W.J. (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *The New England Journal of Medicine*, 363: 711-723.

Holmberg L.A., Sandmaier B.M. (2004). Vaccination with Theratope (STn-KLH) as treatment for breast cancer. *Expert Review of Vaccines*, 3: 655-663.

Huang B., Zhao J., Li H., He K., Chen Y., Mayer L., Unkeless J. C., Xiong H. (2005). Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance. *Cancer Research*, 65: 5009-5014.

Huang M., Wang J., Lee P., Sharma S., Mao J.T., Meissner H., Uyemura K., Modlin R., Wollman J., Dubinett S.M. (1995). Human non-small cell lung cancer cells express a type 2 cytokine pattern. *Cancer Research*, 55: 3847-3853.

Hulíková K., Grobárová V., Krivohlavá R., Fišerová A. (2010). Antitumor activity of N-acetyl-D-glucosamine-substituted glycoconjugates and combined therapy with keyhole limpet hemocyanin in B16F10 mouse melanoma model. *Folia Microbiologica*, 55: 528-532.

Chamaillard M., Hashimoto M., Horie Y., Masumoto J., Qiu S., Saab L., Ogura Y., Kawasaki A., Fukase K., Kusumoto S., Valvano M.A., Foster S.J., Mak T.W., Nuñez G., Inohara N. (2003). An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nature Immunology*, 4: 702-707.

Chen L., Linsley P.S., Hellström K.E. (1993). Costimulation of T cells for tumor immunity. *Immunology Today*, 14: 483-486.

Cherwinski H.M., Schumacher J.H., Brown K.D., Mosmann T.R. (1987). Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. *The Journal of Experimental Medicine*, 166: 1229-1244.

Ikeda H., Old L.J., Schreiber R.D. (2002). The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 13: 95-109.

Iwasaki A., Medzhitov R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunology*, 5: 987-995.

Janeway C.A. Jr., Medzhitov R. (2002). Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*, 20: 197-216.

Janotová T., Jalovecká M., Auerová M., Švecová I., Bruzlová P., Maierová V., Kumžáková Z., Cunátová Š., Vlčková Z., Caisová V., Rozsypalová P., Lukáčová K., Vácová N., Wachtlová M., Salát J., Lieskovská J., Kopecký J., Ženka J. (2014). The use of anchored agonists of phagocytic receptors for cancer immunotherapy: B16-F10 murine melanoma model. *PLoS one*, 9: e85222.

Jemal A., Saraiya M., Patel P., Cherala S. S., Barnholtz-Sloan J., Kim J., Wiggins C. L., Wingo P. A. (2011). Recent trends in cutaneous melanoma incidence and death rates in the United States, 1992-2006. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 65: 17-25.

Jin M.S., Lee J.O. (2008). Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes. *Immunity*, 29: 182-191.

Jurincic C.D., Engelmann U., Gasch J., Klippel K.F. (1988). Immunotherapy in bladder cancer with keyhole-limpet hemocyanin: a randomized study. *The Journal of Urology*, 139: 723-726.

- Kapiteijn E., Marijnen C.A., Nagtegaal I.D., Putter H., Steup W.H., Wiggers T., Rutten H.J., Pahlman L., Glimelius B., van Krieken J.H., Leer J.W., van de Velde C.J. (2001). Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer. *The New England Journal of Medicine*, 345: 638-646.
- Kawai T., Akira S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*, 11: 373-383
- Kidd P. (2003). Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic*, 8: 223-246.
- Kim U., Baumler A., Carruthers C., Bielat K. (1972). Immunological escape mechanism in spontaneously metastasizing mammary tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72: 1012-1016.
- Kimura A., Kishimoto T. (2010). IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *European Journal of Immunology*, 40: 1830-1835.
- Knutson K.L., Disis M.L. (2005). Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 54: 721-728.
- Kobayashi H., Suzuki J., Tanaka S., Kiuchi Y., Oyamada H., Iwadate N., Suzuki H., Shibata N., Suzuki S., Okawa Y. (1997). Structure of a cell wall mannan from the pathogenic yeast, *Candida catenulata*: assignment of ¹H nuclear magnetic resonance chemical shifts of the inner alpha-1,6-linked mannose residues substituted by a side chain. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 341: 70-74.
- Kuchroo V.K., Das M.P., Brown J.A., Ranger A.M., Zamvil S.S., Sobel R.A., Weiner H.L., Nabavi N., Glimcher L.H. (1995). B7-1 and B7-2 Costimulatory Molecules Activate Differentially the Th1/Th2 Developmental Pathways: Application to Autoimmune Disease Therapy. *Cell*, 80: 707-718.
- Kumar H., Kawai T., Akira S. (2009). Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochemical Journal*, 420: 1-16.
- Lamm D.L., DeHaven J.I., Riggs D.R., Delgra C., Burrell R. (1993). Keyhole limpet hemocyanin immunotherapy of murine bladder cancer. *Urological Research*, 21: 33-37.
- Le Y., Hu J., Gong W., Shen W., Li B., Dunlop N.M., Halverson D.O., Blair D.G., Wang J.M. (2000). Expression of functional formyl peptide receptors by human astrocytoma cell lines. *Journal of Neuroimmunology*, 111: 102-108.
- Le Y., Murphy P.M., Wang J.M. (2002). Formyl-peptide receptors revisited. *Trends in Immunology*, 23: 541-548.
- Leach D.R., Krummel M.F., Allison J.P. (1996). Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science*, 271: 1734-1736.
- Leiter U., Garbe C. (2008). Epidemiology of melanoma and nonmelanoma skin cancer - the role of sunlight. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 624: 89-103.
- Loberg R.D., Day L.L., Dunn R., Kalikin L.M., Pienta K.J. (2006). Inhibition of decay-

- accelerating factor (CD55) attenuates prostate cancer growth and survival in vivo. *Neoplasia*, 8: 69-78.
- Macatonia S.E., Hosken N.A., Litton M., Vieira P., Hsieh C.S., Culpepper J.A., Wysocka M., Trinchieri G., Murphy K.M., O'Garra A. (1995). Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *The Journal of Immunology*, 154: 5071-5079.
- Manetti R., Parronchi P., Giudizi M.G., Piccinni M.P., Maggi E., Trinchieri G., Romagnani S. (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. *The Journal of Experimental Medicine*, 177: 1199-11204.
- Manne S., Fasanella N., Connors J., Floyd B., Wang H., Lessin S. (2004). Sun protection and skin surveillance practices among relatives of patients with malignant melanoma: prevalence and predictors. *American Journal of Preventive Medicine*, 39: 36-47.
- Marasco W.A., Phan S.H., Krutzsch H., Showell H.J., Feltner D.E., Nairn R., Becker E.L., Ward P.A. (1984). Purification and identification of formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine as the major peptide neutrophil chemotactic factor produced by *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 259: 5430-5439.
- Margolin K.A., Rayner A.A., Hawkins M.J., Atkins M.B., Dutcher J.P., Fisher R.I., Weiss G.R., Doroshov J.H., Jaffe H.S., Roper M. (1989). Interleukin-2 and lymphokine-activated killer cell therapy of solid tumors: analysis of toxicity and management guidelines. *Journal of Clinical Oncology*, 7: 486-498.
- Matsuda M., Salazar F., Petersson M., Masucci G., Hansson J., Pisa P., Zhang Q. J., Masucci M. G., Kiessling R. (1994). Interleukin 10 pretreatment protects target cells from tumor - and allo-specific cytotoxic T cells and downregulates HLA class I expression. *The Journal of Experimental Medicine*, 180: 2371-2376.
- Matsumoto M., Seya T. (2008). TLR3: interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60: 805-812.
- Mayordomo J.I., Zorina T., Storkus W.J., Zitvogel L., Celluzzi C., Falo L.D., Melief C.J., Ildstad S.T., Kast W.M., Deleo A.B., Lotze M.T. (1995). Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity. *Nature Medicine*, 1: 1297-1302.
- McIntyre C., Harper I., Macdougall I.C., Raine A.E., Williams A., Baker L.R. (1997). Serum C-reactive protein as a marker for infection and inflammation in regular dialysis patients. *Clinical Nephrology*, 48: 371-374.
- Medzhitov R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, 449: 819-826.
- Milton G. W., Brown L. M. M. (1965). Malignant melanoma of the nose and mouth. *British Journal of Surgery*, 52: 484-493.
- Monson J.R., Ramsden C.W., Giles G.R., Brennan T.G., Guillou P.J. (1987). Lymphokine activated killer (LAK) cells in patients with gastrointestinal cancer. *Gut*, 28: 1420-1425.

- Mosmann T.R., Coffman R.L. (1987). Two types of mouse helper T-cell clone: Implications for immune regulation. *Immunology Today*, 8: 223-226.
- Mosmann T.R., Cherwinski H., Bond M.W., Giedlin M.A., Coffman R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *The Journal of Immunology*, 136: 2348-2357.
- Nastala C.L., Edington H.D., McKinney T.G., Tahara H., Nalesnik M.A., Brunda M.J., Gately M.K., Wolf S.F., Schreiber R.D., Storkus W.J. (1994). Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in association with IFN-gamma production. *The Journal of Immunology*, 153:1697-1706.
- Nathan C.F., Murray H.W., Wiebe M.E., Rubin B.Y. (1983). Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *The Journal of Experimental Medicine*, 158: 670-689.
- Ogata A., Chauhan D., Teoh G., Treon S.P., Urashima M., Schlossman R.L., Anderson K.C. (1977). IL-6 triggers cell growth via the Ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade. *The Journal of Immunology*, 159: 2212-21.
- Ogura Y., Bonen D.K., Inohara N., Nicolae D.L., Chen F.F., Ramos R., Britton H., Moran T., Karaliuskas R., Duerr R.H., Achkar J.P., Brant S.R., Bayless T.M., Kirschner B.S., Hanauer S.B., Nuñez G., Cho J.H. (2001). A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 411: 603-606.
- O'Neill L.A., Bowie A.G. (2007). The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*, 7: 353-364.
- Osamu T., Akira S. (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*, 140: 805-820.
- Overwijk W. W., Restifo N. P. (2001). B16 as a mouse model for human melanoma. *Current Protocols in Immunology*, 39: 20.1.1 - 20.1.29.
- Palm N.W., Medzhitov R. (2009). Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunological Reviews*, 227: 221-233.
- Palmer D.H., Midgley R.S., Mirza N., Torr E.E., Ahmed F., Steele J.C., Steven N.M., Kerr D.J., Young L.S., Adams D.H. (2009). A phase II study of adoptive immunotherapy using dendritic cells pulsed with tumor lysate in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 49: 124-132.
- Park B.S., Song D.H., Kim H.M., Choi B.S., Lee H., Lee J.O. (2009). The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature*, 458: 1191-1195.
- Pasare C., Medzhitov R. (2003). Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science*, 229: 1033-1036.
- Pasare C., Medzhitov R. (2004). Toll-dependent control mechanisms of CD4 T cell activation. *Immunity*, 12: 733-741.

Pearlstein E., Salk P.L., Yogeewaran G., Karpatkin S. (1980). Correlation between spontaneous metastatic potential, platelet-aggregating activity of cell surface extracts, and cell surface sialylation in 10 metastatic-variant derivatives of a rat renal sarcoma cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77: 4336-4339.

Petersen S.V., Thiel S., Jensen L., Steffensen R., Jensenius J.C. (2001). An assay for the mannan-binding lectin pathway of complement activation. *Journal of Immunological Methods*, 257: 107-116.

Rakoff-Nahoum S., Paglino J., Eslami-Varzaneh F., Edberg, S., Medzhitov R. (2004). Recognition of commensal microflora by Toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*, 118: 229-241.

Rather L. J. (1971). Disturbance of function (functio laesa): the legendary fifth cardinal sign of inflammation, added by Galen to the four cardinal signs of Celsus. *Bulletin of the New York Academy of Medicine*, 47: 303-322.

Relling M.V., Rubnitz J.E., Rivera G.K., Boyett J.M., Hancock M.L., Felix C.A., Kun L.E., Walter A.W., Evans W.E., Pui C.H. (1999). High incidence of secondary brain tumours after radiotherapy and antimetabolites. *The Lancet*, 354: 34-39.

Ria F., Penna G., Adorini L. (1998). Th1 cells induce and Th2 inhibit antigen-dependent IL-12 secretion by dendritic cells. *European Journal of Immunology*, 28: 2003-2016.

Robinson M.J., Osorio F., Rosas M., Freitas R.P., Schweighoffer E., Gross O., Verbeek J.S., Ruland J., Tybulewicz V., Brown G.D., Moita L.F., Taylor P.R., Reis e Sousa C. (2009). Dectin-2 is a Syk-coupled pattern recognition receptor crucial for Th17 responses to fungal infection. *The Journal of Experimental Medicine*, 206: 2037-2051.

Rosenberg S.A., Packard B.S., Aebersold P.M, Diane Solomon D., Topalian S.L., Toy S.T., Simon P., Lotze M.T., Yang J.C., Seipp C.A., Simpson C., Carter C., Bock S., Schwartzentruber D., Wei J.P., White D.E. (1988). Use of Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Interleukin-2 in the Immunotherapy of Patients with Metastatic Melanoma. *The New England Journal of Medicine*, 319: 1676-1680.

Ruprecht C.R., Lanzavecchia A. (2006). Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells. *European Journal of Immunology*, 36: 810-816.

Salazar-Onfray F., López M.N., Mendoza-Naranjo A. (2007). Paradoxical effects of cytokines in tumor immune surveillance and tumor immune escape. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 18: 171-182.

Saltz L.B., Meropol N.J., Loehrer P.J. Sr., Needle M.N., Kopit J., Mayer R.J. (2004). Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *Journal of Clinical Oncology*, 22: 1201-1208.

Sato M., Goto S., Kaneko R., Ito M., Sato S., Takeuchi S. (1998). Impaired production of Th1 cytokines and increased frequency of Th2 subsets in PBMC from advanced cancer patients. *Anticancer Research*, 18: 3951-3955.

- Sgadari C., Angiolillo A.L., Tosato G. (1996). Inhibition of angiogenesis by interleukin-12 is mediated by the interferon-inducible protein 10. *Blood*, 87: 3877-3882.
- Sheikh H., Yarwood H., Ashworth A., Isacke C.M. (2000). Endo180, an endocytic recycling glycoprotein related to the macrophage mannose receptor is expressed on fibroblasts, endothelial cells and macrophages and functions as a lectin receptor. *Journal of Cell Science*, 113: 1021-1032.
- Sheriff S., Chang C.Y., Ezekowitz R.A. (1994). Human mannose-binding protein carbohydrate recognition domain trimerizes through a triple alpha-helical coiled-coil. *Nature Structural & Molecular Biology*, 1: 789-794.
- Shipley D.L., Spigel D.R., Carrell D.L., Dannaher C., Greco F.A., Hainsworth J.D. (2004). Phase II trial of rituximab and short duration chemotherapy followed by 90Y-ibritumomab tiuxetan as first-line treatment for patients with follicular lymphoma: A Minnie Pearl Cancer Research Network phase II trial. *Journal of Clinical Oncology*, 22:(14S): abstract 6519.
- Shurin M.R., Lu L., Kalinski P., Stewart-Akers A.M., Lotze M.T. (1999). Th1/Th2 balance in cancer, transplantation and pregnancy. *Springer Seminars in Immunopathology*, 21: 339-359.
- Schiffmann E., Showell H.V., Corcoran B.A., Ward P.A., Smith E., Becker E.L. (1975). The isolation and partial characterization of neutrophil chemotactic factors from *Escherichia coli*. *The Journal of Immunology*, 114: 1831-1937.
- Schröder G., Brandenburg K., Brade L., Seydel U. (1990). Pore formation by complement in the outer membrane of gram-negative bacteria studied with asymmetric planar lipopolysaccharide/phospholipid bilayers. *The Journal of Membrane Biology*, 118: 161-170.
- Siegel R. L., Miller K. D., Jemal A. (2015). Cancer Statistics, 2015. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65: 5-29.
- Singh A. D., Topham A. (2003). Incidence of uveal melanoma in the United States: 1973-1997. *Ophthalmology*, 110: 956-961.
- Smith T.J., Lou J., Geren I.N., Forsyth C.M., Tsai R., Laporte S.L., Tepp W.H., Bradshaw M., Johnson E.A., Smith L.A., Marks J.D. (2005). Sequence variation within botulinum neurotoxin serotypes impacts antibody binding and neutralization. *Infection and Immunity*, 73: 5450-5457.
- Sredni B., Tichler T., Shani A., Catane R., Kaufman B., Strassmann G., Albeck M., Kalechman Y. (1996). Predominance of TH1 Response in Tumor-Bearing Mice and Cancer Patients Treated With AS 101. *Journal of the National Cancer Institute*, 88: 1276-1284.
- Stackpole C. W., Cremona P., Leonard C., Stremmel P. (1980). Antigenic modulation as a mechanism for tumor escape from immune destruction: identification of modulation-positive and modulation-negative mouse lymphomas with xenoantisera to murine leukemia virus gp70. *The Journal of Immunology*, 125: 1715-1723.
- Steen H. B. (2000). The origin of oncogenic mutations: where is the primary damage? *Oncogenesis*, 21: 1773-17.
- Su A. I., Welsh J. B., Sapinoso L. M., Kern S. G., Dimitrov P., Lapp H., Schultz P. G., Powell

- S. M., Moskaluk C. A., Frierson H. F., Jr., Hampton G. M. (2001). Molecular classification of human carcinomas by use of gene expression signatures. *Cancer Research*, 61: 7388-7393.
- Szolnoký G., Bata-Csörgö Z., Kenderessy A.S., Kiss M., Pivarcsi A., Novák Z., Nagy Newman K., Michel G., Ruzicka T., Maródi L., Dobozy A., Kemény L. (2001). A mannose-binding receptor is expressed on human keratinocytes and mediates killing of *Candida albicans*. *The Journal of Investigative Dermatology*, 117: 205-213.
- Taga K., Tosato G. (1992). IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production. *The Journal of Immunology*, 148: 1143-1148.
- Takeuchi O., Akira S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140: 805-820.
- Taylor D.D., Gercel-Taylor C., Lyons K S., Stanson J., Whiteside T. L. (2003). T-Cell Apoptosis and Suppression of T-Cell Receptor/CD3- ζ by Fas Ligand-Containing Membrane Vesicles Shed from Ovarian Tumors. *Clinical Cancer Research*, 9: 5113-5119.
- Thompson C.B. (1995). New insights into V(D)J recombination and its role in the evolution of the immune system. *Immunity*, 3: 531-539.
- Tom J.K., Mancini R.J., Esser-Kahn A.P. (2013). Covalent modification of cell surfaces with TLR agonists improves & directs immune stimulation. *Chemical Communications*, 49: 9618-9620.
- Tur E., Brenner S. (1998). Classic Kaposi's sarcoma: low-dose interferon alfa treatment. *Dermatology*, 197: 37-42.
- VanCompernelle S.E., Clark K.L., Rummel K.A., Todd S.C. (2003). Expression and function of formyl peptide receptors on human fibroblast cells. *The Journal of Immunology*, 171: 2050-2108.
- Verweij J., Casali P.G., Zalcberg J., LeCesne A., Reichardt P., Blay J.Y., Issels R., van Oosterom A., Hogendoorn P.C., Van Glabbeke M., Bertulli R., Judson I. (2004). Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumours with high-dose imatinib: randomised trial. *The Lancet*, 364: 1127-1134.
- Wintergerst E., Manz-Keinke H., Plattner H., Schlepper-Schäfer J. (1989). The interaction of a lung surfactant protein (SP-A) with macrophages is mannose dependent. *European Journal of Cell Biology*, 50: 291-298.
- Yeung, V.P., Gieni R.S., Umetsu D.T., DeKruyff R.H. (1998). Heat-killed *Listeria monocytogenes* as an adjuvant converts established murine Th2-dominated immune responses into Th1-dominated responses. *The Journal of Immunology*, 161: 4146-4152.