

IMUNOLOGIE NÁDORŮ – SOUČASNÝ STAV A POZNATKY Z 1. MEZINÁRODNÍ KONFERENCE ZÁKLADNÍ A KLINICKÉ IMUNOGENOMIKY.

ČÁST I – INTERAKCE NÁDORU A IMUNITNÍHO SYSTÉMU

TUMOUR IMMUNOLOGY – PRESENT STATUS AND LESSONS FROM THE 1ST INTERNATIONAL CONFERENCE ON BASIC AND CLINICAL IMUNOGENOMICS.

PART I – INTERACTION BETWEEN THE TUMOUR AND THE IMMUNE SYSTEM

HATINA J.

UNIVERSITA KARLOVA, LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI, ÚSTAV BIOLOGIE

Souhrn: Vývoj nádoru je automaticky provázen spontánní imunitní odpovědí. Nádorové buňky exprimují řadu nádorových antigenů, které umožňují specifické rozpoznání buňkami imunitního systému. Jako nádorové antigeny vystupují jednak nové proteinové sekvence, které jsou výsledkem somatické mutagenese, chyb ve splicingu atp. onkogenů a tumorových supresorových genů (tumor-specifické antigeny), nebo normální buněčné proteiny nadměrně exprimované v nádorových buňkách, ať už jako pozůstatek expresního profilu výchozího buněčného typu nádoru či jakožto výsledek globálních změn v expresi genomu provázejících vývoj a progresi nádorů (tumor-asociované antigeny). Identifikace nádorových antigenů byla tradičně založena na imunologických metodikách, nové nádorové antigeny jsou v současnosti ovšem charakterizovány nejčastěji s využitím metodik moderní molekulární biologie, zejména charakterizací specifického expresního profilu nádorových buněk. Vztah imunitního systému a nádoru představuje komplexní vzájemnou interakci, která prochází během vývoje nádoru několika stádii. Počáteční kontrolní funkce imunitního systému, která charakterizuje fázi imunitního dozoru a fázi rovnováhy, je ztracena v dalších etapách vývoje nádoru, které se projevují únikem z imunitní kontroly. Tento únik je samozřejmým předpokladem vývoje nádoru do stavu klinické detekovatelnosti a je založen na dvou skupinách mechanismů – nádorem indukované imunosupresi a ztrátě rozpoznávacích antigenních struktur z povrchu nádorových buněk. Nádorem indukovaná imunosuprese může být výsledkem exprese specifických signálních molekul na povrchu nádorových buněk (fasL) či sekrece specifických cytokinů, zejména TGF- β a IL-10, jejichž působení charakterizuje systemická imunosuprese, nebo se tato imunosuprese může zakládat na změnách v diferenciaci pomocných T-lymfocytů ve smyslu poměru Th1 a Th2 subsetů. Na interakci nádoru a imunitního systému se účastní celá řada dalších specializovaných populací leukocytů, vedle cytotoxických T-lymfocytů, které představují hlavní efektorovou populaci protinádorové imunity, se dále jedná zejména o tumor-asociované makrofágy a regulační supresorové T-lymfocyty. Rozeznání a odpověď na různé nádorové antigeny ze strany imunitního systému probíhá s velmi rozdílnou efektivitou, jejímž výsledkem je imunodominance některých antigenů. Imunitní systém působí jako významný selekční prvek vývoje imunorezistentních variant nádorových buněk v rámci procesu immunoeditingu.

Klíčová slova: nádorové antigeny, imunitní dozor, únik z imunitní kontroly, nádorem indukovaná imunosuprese, regulační T-lymfocyty, Th2/Th2 polarizace

Summary: Tumour development is generally accompanied by a spontaneous immune response towards the developing tumour. Tumour cells bear a lot of tumour antigens, which are specifically recognized by immune cells. Tumour antigens are either new protein sequences resulting from somatic mutagenesis, splicing errors etc. in oncogenes and tumour suppressor genes (tumour-specific antigens), or normal cellular proteins overexpressed or aberrantly expressed by the tumour. These latter tumour-associated antigens are either a remnant of genes expressed in a cell type, from which the tumour originates, or result from global changes in the expression of genome along the tumour development and progression. Identification of tumour antigens has been traditionally based on immunological techniques, new tumour antigens are nowadays more frequently identified, however, by means of molecular biology and especially genomics. The relationship between the tumour and the immune system is best characterized in terms of a complex mutual interaction, which takes different forms as the tumour is initiated and develops. Three stages are generally distinguished. Initially, the immune system manages to control the tumorigenic process, either by eliminating initiated tumour cells (immune surveillance) or by keeping the tumour cell population at a constant, tiny number (equilibrium). Development of clinical cancer implies previous loss of this immune control (escape). Two groups of processes underlie the escape of tumour cells – tumour-induced immunosuppression and loss of immune recognition structures from escaping tumour cells. The tumour-induced immunosuppression can result from expression of specific signalling molecules on the surface of tumour cells (fasL), secretion of specific immunosuppressive cytokines (TGF- β , IL-10), or from changes in differentiation of helper T-lymphocytes along the Th1/Th2 paradigm. Various other specialized leukocyte populations are involved in the complex interaction between the tumour and the immune system, notably cytotoxic T-lymphocytes, which provide the main effector antitumour population, tumour associated macrophages and regulatory T-cells. Different tumour antigens tend to induce the immune response with markedly different efficacy, resulting in immunodominance of some antigens. Besides, the immune system might be regarded as an important selection pressure driving the development of tumour escape variants, a process termed immunoediting.

Key words: tumour antigens, immune surveillance, escape from immune control, tumour-induced immunosuppression, regulatory T-cells, Th1/Th2 polarization

Ve dnech 3.-7. října 2004 se v Budapešti sešel 1. kongres klinické a experimentální imunogenomiky. Jednalo se o velký, obecně zaměřený kongres pokrývající celou šíři současné imunologie, s metodickým důrazem ne moderní postupy molekulární biologie a obzvláště genomiky. Imunologie nádorů představovala jen relativně malou část náplně kongresu, ovšem jednotlivé příspěvky byly zvoleny tak důmyslně, že ve svém celku pokrývaly převážnou část disciplíny. Jejich přehled, doplněný o nezbytný molekulárně biologický a imunologický kontext, který na tomto místě přináším, může proto poskytnout cenný průřez současnou nádorovou imunologií.

Imunologie nádorů

Imunologie nádorů je nesmírně komplexní hraniční disciplínou mezi dvěma obory, jejichž komplexita sama o sobě již bere dech - onkologii a imunologii. Jejím cílem je odedávna nalezení klíče k pochopení vztahu nádoru a imunitního systému a využití této znalosti pro efektivní léčbu nádorů. Nádorová imunologie má velmi dlouhou historii a za jejího zakladatele se pokládá Paul Ehrlich, který poprvé přišel s hypotézou aktivního monitorování tkání a orgánů ze strany imunitního systému s cílem včas zachytit a zničit transformované buňky; tato hypotéza byla posléze v 60. letech formulována do koncepce imunitního dozoru (1). Ze strany praktických onkologů přispěl k základům oboru zejména William Coley, který na základě pozorování spontánní remise nádorů u pacientů prodávajících horečnatou infekci provedl zřejmě první zdářilou imunoterapii, a to nespecifickou aktivací imunitního systému supernatanty z bakteriálních kultur (2, 8). Pro teoretické základy oboru mělo klíčovou roli vypracování metodik transplantace nádorů v rámci inbredních myších kmenů ve 40. a 50. letech, kdy se podařilo poprvé nade vší pochybnost demonstrovat, že transplantovaný nádor indukuje specifickou imunitní odpověď (3). Tento posun od přirozené ke specifické imunitní odpovědi musel mít pak logicky za následek postupnou charakterizaci nádorových antigenů a znalost nádorových antigenů zase nemůže vést nikam jinam než k pokusům využít těchto antigenů pro žádoucí stimulaci imunitního systému odpovídající vakcinací (4).

Nádorové antigeny

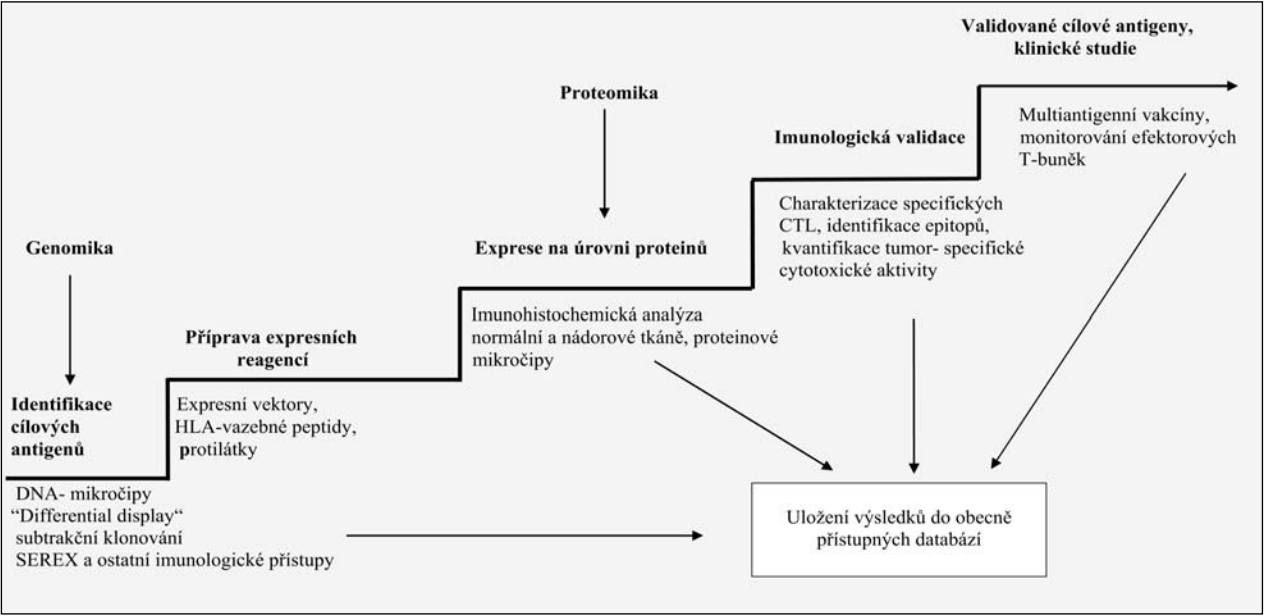
Rozeznání nádorových buněk specifickým imunitním systémem implikuje existenci specifických nádorových antigenů, které jsou imunitnímu systému prezentovány ve formě komplexů peptidových fragmentů nádorových antigenů a proteinů hlavního histokompatibilitního komplexu (MHC) a které jsou po aktivaci příslušné imunitní odpovědi cílem obou základních efektorových větví specifické imunitní odpovědi, tj. humorální imunity, jejímiž antigenními receptory jsou imunoglobuliny produkované B-lymfocyty, a buněčné imunity, u níž antigen rozeznávají T-buněčné receptory (TCR) na povrchu aktivovaných T-lymfocytů, v případě protinádorové imunity zejména cytotoxických T-lymfocytů (CTL) (5). Nádorové antigeny byly na molekulární úrovni charakterizovány v době relativně nedávné, tj. až od 90. let, a v mnoha ohledech se v této otázce stal jakýmsi průkopnickým systémem maligní melanom, a to z několika příčin - relativně vysoké incidence onemocnění, relativní přístupnosti populace tumor-infiltrujících lymfocytů (TIL) a poměrně schůdné možnosti kultivace melanomových buněčných linií *in vitro* (6). Při popisu nádorových antigenů je užitečné rozlišovat dvě velké kategorie - tumor-asociované antigeny (TAA) a tumor-specifické antigeny (TSA). U první kategorie asociovaných antigenů se jedná o normální buněčné proteiny, které jsou z nějakého důvodu exprimovány s vyšší četností u určité kategorie nádorů, ale jejich exprese je vždy rovněž zaznamenána u většího či menšího rozsahu normálních buněčných typů. Patří sem zejména tzv. liniově-specifické či diferenciací antigeny, tj. proteiny specifické pro buněčný typ, ze kterého se vyvíjí nádor (např. melanomové antigeny MART-1/Melan A, gp100, tyrozináza

a tyrozináza-příbuzné proteiny TRP-1 a TRP-2, taktéž exprimované v normálních melanocytech). Druhou velkou skupinu tumor-asociovaných antigenů tvoří onkospermatogonální antigeny (cancer/testis antigens), které jsou fyziologicky exprimovány v průběhu spermatogeneze a aberantně aktivovány v průběhu nádorové transformace. Předpokládá se, že podstatou jejich aktivace v průběhu tumorigeneze je globální demethylace genomu, která je důležitou součástí procesů imortalizace a genomické nestability nádorových buněk. Mezi onkospermatogonální antigeny patří genové rodiny MAGE-1, -2 a -3, CAGE, GAGE, SAGE, XAGE, NY-ESO-1 a PRAME; tyto antigeny nebývají vyhraněně specifické jen pro určité typy nádorů. Příbuznou skupinu představují onkofetální antigeny, které jsou kromě nádorů detekovány i v průběhu embryonálního a fetálního vývoje a mezi jejichž typické zástupce patří carcinoembryonální antigen (CEA) a antigen OFA/ILRP (immature laminin receptor protein). Expresse nádorově-asociovaných antigenů je tedy buď „zdeděná“ z normálního diferenciací programu výchozího buněčného typu, nebo pramení z globálních změn v regulaci exprese genomu (1-8). Nádorově-specifické antigeny oproti tomu představují proteiny, které nejsou exprimovány mimo nádor a zpravidla jsou i kauzálně spjaté s procesem karcinogeneze. Patří sem zejména mutačně změněné onkogeny a tumorové supresorové geny, jakož i proteinové sekvence, jejichž exprese pramení z narušení mechanismů genové regulace (např. kódované introny, k jejichž expresi dochází v důsledku poruch sestřihu). Zvláštní skupinu nádorových antigenů pak představují antigeny virové, u virově-indukované tumorigeneze, a antigeny klonální, tj. např. povrchové imunoglobuliny a T-buněčné receptory u nádorů vycházejících z B- a T-lymfocytů (3, 7).

Identifikace a charakterizace nádorových antigenů tradičně vycházela z imunologických technik, kdy nádorem indukované imunologické efektoři byly použity ke screeningu expresních či peptidových knihoven; tento postup bývá někdy souborně označován jako reverzní imunologie. Takto byly identifikovány a charakterizovány jak nádorově specifické, tj. mutované antigeny (např. ribozomální protein L9, helikáza p68, β -katenin, cyklin-dependentní kináza 4 aj.), tak nádorově asociované antigeny, např. rodin MAGE a NY-ESO-1 (3, 9). Zvláště tento posledně jmenovaný se ukázal jako velice cenný svou imunogenicitou ve smyslu indukce buněčné imunitní odpovědi, ovšem jeho izolace proběhla screenováním expresní knihovny sérem získaným z onkologických nemocných, tj. na základě samovolné humorální imunitní odpovědi (tzv. metodika SEREX - viz dále) (2). Tato souběžná humorální a buněčná imunitní odpověď ovšem zdaleka nemusí být pravidlem a řada imunitních regulačních mechanismů působí proti tomuto souběhu. Úplně opačný postup identifikace nádorových antigenů vychází z molekulárně biologické analýzy nádorů, kdy vysoce frekventní mutace či expresní změny v klíčových onkogenech či tumorových supresorových genech jsou zkoumány z hlediska jejich antigenicity. Zatímco imunologické využití mutací v *ras*-onkogenu či mutací a následně stabilizované exprese p53-tumorového supresorového proteinu se ukazuje zatím jako problematické, telomeráza se ukázala jako velmi dobrý antigenní cíl, jak je rozvedeno dále. Současné přístupy k identifikaci a charakterizaci nových nádorových antigenů s využitím metod genomiky a proteomiky představil ve svém příspěvku Dr. Laszlo Radvanyi (Aventis Pasteur, Toronto) (Obr. 1, tab.1) (2).

Uplatnění nejnovějších postupů genomiky a proteomiky v současné experimentální onkologii představuje dosti širokou problematiku přesahující možnosti tohoto příspěvku; na tomto místě chci pouze dosti povrchně zmínit základní principy analýzy prostřednictvím tzv. DNA-čipů (DNA-microarrays). Jedná se o na určitý pevný podklad (nylon, sklo) roboticky nanesené fragmenty DNA, které jsou hybridizovány s populací značených cDNA molekul, získanou izolací mRNA z příslušné tkáně či orgánu, reverzně přepsanou na cDNA a popř. ampli-

Obr. 1. Současné přístupy k identifikaci nádorových antigenů. Nádorový antigen musí být s vysokou preferencí exprimován nádorovými buňkami. Takové proteiny lze odhalit moderními molekulárně biologickými přístupy, jako jsou metodiky identifikace diferencially exprimovaných genů, ať už v podobě DNA-mikročipů nebo např. postupem „differential display“ či subtrakčního klonování. Výsledky získané na genové úrovni je nutné ověřit na úrovni proteinu a z takto identifikovaných nádorově-specificky exprimovaných proteinů jsou potom v řadě kroků postupně identifikovány ty, které představují skutečné nádorové antigeny, tj. jsou prezentovány nádorovými buňkami a jsou schopny zprostředkovat cytotoxicitu protinádorových efektorových T-lymfocytů. Na tuto imunologickou validaci pak navazuje formulování protinádorových vakcín a jejich klinické testování. V celém průběhu tohoto procesu jsou údaje ukládány do obecně přístupných databází a dále zpracovávány bioinformatickými přístupy. Upraveno podle ref. 2.



fikovanou prostřednictvím polymerizační řetězové reakce (PCR). Při analýze se mohou uplatnit dva základní scénáře. Prvním klasickým uspořádáním je použití tzv. „cDNA-microarrays“, kdy na daný podklad jsou naneseny fragmenty cDNA-molekul známých genů. Ze srovnávaných buněčných populací, např. nádorových a odpovídajících normálních buněk, jsou připraveny populace cDNA-molekul, které jsou fluorescenčně značeny odlišnými fluorofory (např. cDNA připravená z nádorových buněk zeleně a z normálních buněk červeně). Obě cDNA populace jsou potom smíchány v poměru 1:1 a hybridizovány na příslušný cDNA-mikročip. Z poměrů červeného a zeleného fluorescenčního signálu na hybridizovaném mikročipu lze potom identifikovat geny, specificky nadměrně či naopak redukovane exprimované v příslušných dvou buněčných populacích (10, 11). Druhým možným uspořádáním jsou oligonukleotidové čipy, například fy Affimetrix. V tomto případě jsou přímo na daném pevném podkladu syntetizovány oligonukleotidové sondy pro jednotlivé geny, obvy-

kle kolem 25 nukleotidů dlouhé. Přitom každý zkoumaný gen je zachycen několika sondami odvozenými z různých oblastí genu a ke každému oligonukleotidu s dokonalou shodou vůči známé sekvenci genu (PM-oligonukleotidy – perfect match) jsou syntetizovány oligonukleotidy se sekvenční odchylkou uprostřed (MM-oligonukleotidy – mismatch). Toto uspořádání skýtá principiálně jinou možnost experimentální analýzy, než je tomu u cDNA-čipů. Hybridizace k PM a MM-oligonukleotidům totiž poskytuje unikátní hybridizační vzor, který je přímo závislý na koncentraci příslušné sondy (tedy mRNA v analyzovaném vzorku) a tímto způsobem lze tedy odvodit přímo relativní expresní hladiny jednotlivých genů v jediném analyzovaném vzorku (12). Dr. Radvanyi použil právě toto druhé experimentální uspořádání, tj. na zakázku dělané oligonukleotidové čipy fy Affimetrix, jejichž pomocí screenoval 54 vzorků karcinomu prsu oproti 150 normálním dospělým tkáním a buněčným typům, představujícím v současnosti nejrozsáhlejší reprezentativní profil normální genové exprese u člověka. Výsledkem byla izolace pěti nových genů specifických pro vysoký podíl nádorových vzorků (označených jako BFA4, BFA5, BFY3, BCZ4 a BCY1). Jedním z kritérií pro selekci uvedených nádorově specifických genů z pohledu možné terapeutické protinádorové vakcinace je vzájemně se doplňující expresní profil v nádorech (např. BAF4 a BFY3 jsou v různých nádorech alternativně exprimovány); pomocí takto vzájemně se doplňujících nádorově specifických genů kolektivně pokrývajících rozhodující část nádorových vzorků je možné koncipovat multiantigenní vakciny, účinné vůči velkému podílu nádorů. Z funkčního hlediska je mezi těmito 5 nádorově specifickými geny zřejmě nejzajímavější BCZ4, který je totožný s genem pro N-acetyltransferázu NAT-1, propůjčující rezistenci vůči doxorubicinu, a BCY1, což je RNA-vazebný protein podle všeho regulující motilitu a proliferaci nádorových buněk (imunohistochemická analýza exprese v izolované rostoucí koloniích buněčné linie odvozené z nádoru prsu BT474 odhalila specifickou expresi na okrajích kolonie, což je zřejmě ekvivalent té části nádoru, která aktivně invaduje do okolí). V současnosti probíhá imunologická validace takto definovaných potenciál-

Tab. 1. Ideální vlastnosti nádorového antigenu z hlediska návrhu protinádorové vakciny.

Nadměrná exprese v >95 % buněk pozitivně klasifikovaného nádoru a v >50% analyzovaných klinických nádorů (analyzováno imunohistochemicky)
Expresse v životně důležitých normálních tkáních nesmí být detekovatelná, exprese v ostatních orgánech (gonády, kůže) je přípustná
Vysoká imunogenicitá, indukce buněčné imunitní odpovědi jak na úrovni CD8 ⁺ tak i CD4 ⁺ T-lymfocytů u normálních osob i onkologických pacientů
Stabilní exprese v primárním nádoru i metastázách
Úroveň exprese je minimálně ovlivněna chemo- a imunoterapií
Může být snadno kombinován s jinými antigeny v rámci multiantigenních vakcín, nevykazuje imunodominanci vůči jiným antigenům
Expresse není dotčena rozsáhlejší variabilitou na úrovni splicingu, popř. na dalších expresních úrovních

Upraveno podle ref. 2.

ních nádorových antigenů, to znamená, že je třeba odhalit, jestli jsou peptidy těchto proteinů prezentovány (obecně a zejména nádorovými buňkami), jestli je možné izolovat klonů cytotoxických T-lymfocytů schopných rozeznat takto prezentované antigeny a jestli jsou tyto cytotoxické T-lymfocyty schopny zabít prezentující nádorové buňky. Řadu těchto experimentů lze provádět *in vitro* (například velmi výhodná je v této fázi imunologické validace thymomová buněčná linie T2, která nese mutaci v genu pro peptidový transportér TAP-1, v důsledku čehož jsou na buněčném povrchu vystaveny pouze nestabilní prázdné prezentující komplexy HLA-A2 molekul, které je možné stabilizovat externím přidáním zkoumaných antigenních peptidů). Důležitým prvkem *in vivo*-analýzy je pak ve fázi imunologické validace HLA-A2-transgenní myš, která umožňuje přímou imunizaci a následnou izolaci a analýzu myších HLA- a antigen-specifických T-lymfocytů a rovněž umožňuje formulovat vakcinační schéma. Projekt Dr. Radvanyiho se v současnosti nachází v tomto stádiu.

Interakce nádoru a imunitního systému

Nutným logickým důsledkem samotné kategorie nádorových antigenů je rozeznání nádoru efektorovými mechanismy imunitního systému, tedy protinádorová imunitní odpověď. Podle současných modelů prochází protinádorová imunitní odpověď v průběhu karcinogeneze třemi stádii. Ve stádiu imunitního dozoru (immune surveillance) má ve vzájemném vztahu transformované buňky a imunitního systému navrch právě imunitní systém, který je schopen rozeznat a zničit transformovanou buňku dříve, než by dala vznik nádoru. Právě tohoto mechanismu se dovolávali Paul Ehrlich, Macfarlane Burnett a George Thomas, kteří vědecky koncipovali teorii imunitního dozoru. Klinicky detekovatelné nádory samozřejmě nemohou již podléhat mechanismům imunitního dozoru a v jejich případě se hovoří o úniku z imunitního dozoru čili „escape“ (viz dále). Předpokládá se dále, že mezi oběma krajními fázemi imunitního dozoru a úniku existuje ještě fáze rovnováhy (equilibrium), při které zůstává populace nádorových buněk konstantní a pod úrovní klinické detekovatelnosti, nicméně imunitní systém ji není schopen eliminovat. Ve prospěch této rovnovážné fáze hovoří klinická pozorování náhlého se objevení nádorů v transplantovaných orgánech, přičemž zpětně se zjišťuje, že darci transplantátů byli před léty úspěšně vyléčeni z nádorového onemocnění; předpokládá se přitom, že imunosupresivní posttransplantační léčba ruší rovnováhu na úkor imunitního systému a přítomný mikronádor velice snadno přechází do „escape“-fáze (13).

Samotný imunitní dozor představuje zřejmě nejproblematictější fázi tohoto vztahu, jejíž vnímání také prošlo nejdramatictější vývojem, od jeho vyzvání jakožto bariéry proti celosvětové epidemii nádorových onemocnění v klasických teoriích až po jeho popření na konci 90. let. Problémem je, že tato fáze je implicitně klinicky neanalyzovatelná a celá tato koncepce imunitního dozoru stojí na využití modelových experimentálních systémů, popř. na epidemiologických pozorováních u imunosuprimovaných lidských populací. Právě tento druhý směr analýzy poskytl nejvíce argumentů proti obecné roli imunitního dozoru – u pacientů podrobujícím se dlouhodobé imunosupresi po orgánových transplantacích či např. u infikovaných HIV nedochází k žádnému dramatickému nárůstu nejčastějších nádorů, imunosupresi provázající nádorová onemocnění zahrnují především určité specifické hematologické nádory a zejména virově indukovaná nádorová onemocnění (3). Co se týče experimentálních zvířecích modelů, nejnovější pokusy s myšími modely vytvořenými metodikami cílené manipulace genomu, popř. s cílenou deplecí definovaných populací leukocytů, přinesly spíše důkazy pro existenci imunitního dozoru. Řada myších kmenů s cíleně vnesenými defekty imunitního systému vykazuje signifikantně zvýšenou citlivost vůči etablovaným protokolům chemické karcinogeneze. Ukázalo se přitom, že velmi významnou, možná i roz-

hodující úlohu v imunitním dozoru hrají složky přirozené (neadaptivní) imunity. Signifikantně zvýšená citlivost vůči chemické karcinogenezi byla např. sledována u myši nemajících $\gamma\delta$ T-lymfocyty (*TCR γ -/-* knockout), NK- a NK T-buňky (deplece specifickou protilátkou), a rovněž u *IFN γ -/-*, *IFNGR -/-* a *STAT1 -/-* knockout kmenů (13). Konečně, existenci často velmi důmyslných a komplexních mechanismů nádorem-iniciované imunosuprese (viz dále) lze rovněž pojmut jako nepřímý důkaz imunitního dozoru – kdyby neexistovala žádná imunitní odpověď na vyvíjející se nádor, bylo by stěží vysvětlitelné, že by se v něm rozvinuly tyto dokonalé mechanismy protiútoky v podobě paralýzy celé řady imunitních efektorových mechanismů.

Jiný aspekt velmi časně imunitní odpovědi vůči nádoru vyplývá z příspěvku Dr. Anne-Lise Børresen-Dale (Institute for Cancer Research, The Norwegian Radium Hospital, Oslo). Jedna z otázek, kterou si ve svém příspěvku položila, byla – existuje nějaký buněčný typ, který by působil jako obecný „senzor“ vyvíjejícího se nádoru? Experimentální schéma, které použila bylo následující. Od pacientek, podstupujících diagnostickou mamografií, byly současně s vyšetřením odebrány vzorky leukocytů periferní krve a expresní profil genů v této heterogenní buněčné populaci byl korelován s následnou diagnózou. Skutečně se podařilo identifikovat skupinu genů specificky exprimovaných u leukocytů vzorků z pacientek posléze pozitivně diagnostikovaných, a prakticky všechny tato geny odpovídají expresnímu profilu aktivovaného neutrofilu. Toto pozorování ukazuje na časnou zánětlivou reakci na nádor a potvrzuje postavení zánětu jakožto jednoho z markerů nádoru.

Zánětlivá odpověď ovšem představuje velice komplexní problém v nádorové imunologii. Na jedné straně zánět může představovat rozhodující mechanismus přechodu od přirozené neadaptivní k antigen-specifické imunitní odpovědi (zánětlivé cytokiny působí např. dokončení diferenciace dendritických buněk, které jsou schopny s vysokou účinností prezentovat nádorové antigeny naivním T-lymfocytům a aktivovat je) (5), na druhé straně dochází s rozvojem populace tumor-asociovaných makrofágů (TAM) k růstovému synergismu s nádorovými buňkami i k rozvoji mechanismů umožňujících ustavení tolerance vůči nádoru a tedy úniku nádoru z imunitní kontroly (8, 14).

Imunitní odpověď vůči nádoru

Samotná existence nádorových antigenů, z nichž nemalá část byla ostatně objevena metodami reverzní imunologie, implikuje existenci spontánní imunitní odpovědi vůči nádoru. Její existence, zejména ve formě tumorantigen-specifických T-lymfocytů a protilátek, byla přesvědčivě popsána v řadě prací u širokého spektra nádorů a lze ji dnes pokládat za prokázanou. Dokonce na příkladu melanomu se ukázalo, že intenzita této odpovědi, přinejmenším v kvantitativním vyjádření, tj. kvantifikací nádorově specifických T-lymfocytů, se zvyšuje paralelně s progresí nádoru. Postuluje se přitom, že zejména metastazování do spádových mízních uzlin, spolu se zvyšující se kvantitou nádorových antigenů s rostoucí nádorovou masou, představují výrazné aktivační signály pro expanzi a diferenciaci nádorově-specifických efektorových buněk. Tato spontánní protinádorová imunitní odpověď vykazuje významné inter-individuální rozdíly a příznačná je přitom zejména ta skutečnost, že tyto rozdíly nijak nekorelují s klinickým průběhem onemocnění (15). Nádorové buňky totiž v průběhu nádorové progresy aktivují mechanismy úniku z této imunitní kontroly, které jsou schopny dopad této imunitní odpovědi efektivně neutralizovat. Těchto „escape“-mechanismů byla popsána celá řada a stále jsou objevovány nové. Zčásti jsou dílem samotných nádorových buněk, zčásti pak kooptovaných populací imunitních buněk, zejména tumor-asociovaných makrofágů (TAM) a CD4⁺CD25⁺ regulačních T-lymfocytů. V principu můžeme tyto mechanismy rozdělit do dvou skupin - mechanismy systematické i lokální paralýzy efektorových mechanismů protinádo-

rové imunity a mechanismy ztráty struktur na povrchu nádorových buněk umožňujících jejich rozpoznání a likvidaci efektorovými imunitními buňkami.

Byla popsána řada systematických změn imunitního systému onkologických pacientů, a to jak na velmi povšechné polyklonální úrovni, tak na úrovni nádorově antigen-specifických buněk; vzhledem k tomu, že s výjimkou nejpokročilejších stádií nevykazuje imunitní systém pacientů s nádory obecné disfunkce, např. v reakci na infekci, lze předpokládat, že pozorování na obecné i na antigen-specifické úrovni popisují v zásadě tytéž fenomény. Na úrovni oněch obecných pozorování se například uvádí snížená proliferační odpověď periferních lymfocytů na mitogenní stimulaci či snížená cytolytická aktivita NK-buněk. Tyto funkční defekty na úrovni lymfocytů periferní krve jsou zpravidla mírnější než je tomu na úrovni populace tumor-infiltrujících lymfocytů (TIL) - z toho lze usuzovat, že část paralyzujících efektů nádoru na imunitní systém má systemickou povahu, větší část se ovšem odehrává v rámci mikroprostředí nádoru. Produkce imunosupresivních cytokinů, zejména transformujícího růstového faktoru- β a interleukinu-10, jakož i dalších imunosupresivních látek, jako jsou prostaglandiny, by mohla mít onen systemický efekt, ovšem i zde, vzhledem k obecné povaze cytokinů působit na krátké vzdálenosti mezi buňkami, lze předpokládat zvýšený efekt na úrovni samotného nádoru. V řadě modelových situací byla úloha TGF- β a IL-10 v nádorové imunosupresi experimentálně prokázána, nicméně také platí, že, jako u všech cytokinů, se jedná o pleiotropní regulační molekuly, jejichž regulační působení může být velmi rozdílné v různém biologickém kontextu a pro oba cytokiny též bylo popsáno určité specifické aktivní působení (16).

Co se týče nádorově specifických efektorových buněk, zdá se, že jsou často ve zvýšené míře směřovány k apoptóze. To může být výsledkem celé řady navzájem komunikujících mechanismů. Efektorové buňky protinádorové imunity vykazují specifické signální defekty, zejména ztrátu ξ -proteinu, který je součástí TCR-signálního komplexu cytotoxických T-lymfocytů a FC γ RIII komplexu NK-buněk, a dále poruchy signální dráhy transkripčního faktoru NF- κ B. Zvláště tato druhá porucha by mohla mít kauzální postavení pro větší apoptotickou náchylnost těchto buněk, neboť mezi cílové geny NF- κ B patří významné antiapoptotické geny - *Bcl-2*, *Bcl-XL* a buněčné inhibitory apoptózy (*cIAP*), a rovněž gen pro interleukin-2. Co se týče ξ -podjednotky receptorových komplexů, tam je situace složitější, poněvadž na jedné straně samozřejmě nedostatečný „první“ signál přes TCR-komplex může orientovat cytotoxický T-lymfocyt směrem k apoptóze, na druhé straně samotná ξ -podjednotka byla identifikována jako přímý substrát kaspáz -3 a -7. Další z možných spouštěcích drah apoptózy je samozřejmě dráha fasL - fas; byla popsána řada agresivně rostoucích nádorů konstitutivně exprimujících fasL a bylo přineseno dostatek důkazů ve prospěch hypotézy, že tato konstitutivní exprese přímo indukuje apoptózu tumor-infiltrujících lymfocytů exprimujících receptorovou molekulu fas. Ani tady není ovšem zřejmě situace takto černobílá, neboť se ukázalo, že zvýšená exprese fasL u experimentálních transplantovaných nádorů působí jako aktivní signál pro neutrofile, které působí rychlé zničení transplantovaného nádoru. Tato funkce aktivovaných neutrofilů je přitom zrušena působením TGF- β (16, 17).

Zvýšená úroveň apoptózy efektorových buněk protinádorové imunity nachází svůj výraz ve dvou obecných pozorováních. Za prvé, nebývá provázána lymfopenií, to znamená že musí být kompenzována rychlejším obratem buněk (17). Za druhé způsobuje, že zejména cytotoxické T-lymfocyty zřídka dosahují terminálních diferenciálních stádií charakterizovaných vysokou expresí cytotoxických molekul perforinu a granzymu B (15).

Co se týče únikových mechanismů na úrovni samotných nádorových buněk, tyto mechanismy můžeme rozlišit do dvou sku-

pin - mechanismy rezistence vůči imunitnímu útoku a mechanismy ukrytí se před rozpoznáním imunitním systémem. Pokud se jedná o mechanismy rezistence, na prvním místě z hlediska klinického významu stojí mechanismy rezistence vůči indukované apoptóze, poněvadž ty mohou stát právě tak dobře za chemorezistencí nádorových buněk. Byla jich popsána celá škála podél jednotlivých apoptózu-indukujících signálních drah, tj. v případě útoku imunitních efektorových buněk dráha perforin - granzym B a fasL - fas. Jeden z nově popsaných mechanismů rezistence nádorových buněk zneužívá sebeobranu vlastních cytotoxických lymfocytů proti nahodilé aktivaci intracelulárního granzymu B. CTL exprimují inhibitor granzymu B ze skupiny serpinů, známý jako proteinázový inhibitor -9 (PI-9), a aktivace exprese PI-9 byla popsána u celé řady lidských klinických i experimentálních myších nádorů - není potom divu, že jsou rezistentní vůči útoku CTL. Co se týče dalších efektorových mechanismů protinádorové imunity, u řady nádorů byla popsána zvýšená exprese proteinů typu DAF (decay accelerating factor) - CD46, CD55 a CD59 - se zřejmým dopadem v podobě rezistence vůči působení komplexu (16).

Pokud jde o ztrátu rozpoznávacích struktur, nejčastěji se jedná o ztrátu povrchové exprese MHC-glykoproteinů I. třídy a o ztrátu exprese tumor-asociovaných antigenů. Exprese MHC genů a proteinů I. třídy může mít celou řadu příčin, jak na úrovni genů, tak na úrovni repressy jejich exprese, a jak na úrovni samotných MHC-genů, tak na úrovni dalších proteinů zúčastněných v procesu prezentace antigenu, například peptidových transportérů TAP-1 a -2. Logickým důsledkem je potom ztráta antigenních struktur z povrchu nádorových buněk, a tedy ztráta specifického rozeznání imunitním systémem (1, 3, 16). Různorodost těchto mechanismů nádorové imunosuprese může nacházet svůj protějšek v buněčné heterogenitě uvnitř nádoru - různé mechanismy mohou být současně vyjádřeny různými subpopulacemi nádorových buněk. Imunitní systém pak působí jako důležitý selekční prvek buněčné evoluce nádoru. Vztah nádoru a imunitního systému je tedy oboustranná komplexní interakce, kdy spontánní imunitní odpověď může být jednou z hnacích sil nádorové progresy ústící ve stav imunitní suprese a rezistence - tato relativně nová koncepce byla označena jako imunoediting (13).

Regulační T-lymfocyty

Koncepce regulačních supresorových T-lymfocytů jakožto jednoho z velmi důležitých mechanismů periferní tolerance začíná v posledních několika letech své znovuzrození, poté co byla po více než jednu dekádu téměř zakázána (18). Jedny z prvních náznaků aktivní role supresorových buněk lze najít již na počátku 80. let, a to současně ve fotoimunologii i nádorové imunologii. V první oblasti stojí za zmínku pozorování, že UV-ozářené myši se stávají necitlivé vůči aplikaci kontaktních alergenů, což je výsledkem antigen-specifické tolerance, která může být přenesena na neošetřená zvířata splenocyty tolerizovaných myší, přičemž jako kritická byla shledána populace T-lymfocytů (5). Naprosto analogicky se chovají UV-indukované myši nádory; jedná se zpravidla o silně imunogenní nádory, po transplantaci vyvolávající prudkou imunitní reakci ústící v odhojení transplantovaného nádoru (typ nádoru označený jako „regresor“), přesto však vykazující progresivní růst končící smrtí u té myši, u níž byl indukován ozářením (3). To je opět v souladu s modelem UV-indukované aktivní suprese, která paralyzuje protinádorovou imunitní odpověď v prvotním hostiteli přes nepochybnou silnou imunogenicitu nádoru.

Problematika regulačních T-lymfocytů začala nabývat konkrétnějších obrysů koncem 90. let, kdy byla několika týmy nezávisle charakterizována jedna specifická populace těchto supresorových buněk, která je charakterizována kombinací exprese CD4 a konstitutivní exprese α -podjednotky receptoru pro IL-2 (CD25), na úrovni jaderných regulačních proteinů

charakterizuje tuto buněčnou populaci přítomnost transkripčního represoru FOXP3. Aktivačními antigenními peptidy pro CD4⁺CD25⁺ Treg-buňky jsou peptidy organismu vlastních „self“-proteinů, po této antigenní stimulaci autoantigeny se stávají ve svém supresorovém působení nezávislými na antigenu a jsou schopny efektivně inhibice efektorových buněk, a to zřejmě současně několika mechanismy jako je přímý mezibuněčný kontakt či sekrece imunosupresivních cytokinů. Jedná se o minoritní populaci T-lymfocytů (5-10%), která prokázala své schopnosti suprese efektorových mechanismů imunity v různých modelových situacích, jako jsou autoimunní reakce či odhojení transplantátu. A poněvadž stěžejní část experimentální nádorové imunologie vždy vycházela z metodiky transplantace nádorů, nenechal na sebe dlouho čekat nálezy, že deplece této lymfocytární populace α -CD25 monoklonální protilátkou zvyšuje imunitní odpověď vůči transplantovanému nádoru (19).

CD4⁺CD25⁺ Treg-buňky jsou součástí populace tumor-infiltrujících lymfocytů a vysoké hladiny těchto buněk byly nalezeny v nádorech plic, prsu, pankreatu a vaječnících. Právě posledně jmenovaný typ nádoru byl v době velmi nedávne podroben v tomto ohledu podrobné analýze. Ukázalo se, že tyto buňky byly v nádoru signifikantně četnější než odpovídá fyziologickým periferním hodnotám (až 23%), přičemž jejich hladina se zvyšovala s progresí nádoru, souběžně ovšem klesala ve spádových místních uzlinách. Jako atraktant regulačních T-lymfocytů byl identifikován chemokin CCL22, produkovaný jak nádorovými buňkami samotnými tak tumor-asociovanými makrofágy; regulační T-lymfocyty přitom exprimovaly odpovídající chemokinový receptor CCR4. Tyto s nádorem asociované Treg-lymfocyty byly schopny efektivně blokovat tumor-specifické cytotoxické T-lymfocyty jak *in vitro*, tak *in vivo* v xenotransplantátovém modelu, přičemž tento inhibiční efekt byl blokován α -CCL22 protilátkou. Podstatné je též pozorování, že hladina nádorových regulačních T-lymfocytů představovala významný negativně prognostický faktor onemocnění; toto pozorování znovu ilustruje obecné paradigma existující spontánní imunitní antitumorové reakce, která musí být v zájmu vývoje nádoru paralyzována (20, 21).

Důležitou praktickou otázkou, pokoušíme-li se definovat postavení regulačních T-lymfocytů v nádorové biologii, je identifikace jejich antigenů. V jednom případě, na modelu maligního melanomu, byl tento antigen identifikován jako LAGE-1, což je zástupce tumor-asociovaných antigenů typu „cancer-testis“ (22). Jiné vodítko v této oblasti zmínila ve svém příspěvku Dr. Aija Line (Biomedical Research and Study Centre, University of Latvia, Riga), která se zaměřila na využití SEREX-metodiky (viz výše) v procesu identifikace nádorových antigenů. Jde o to, že protilátky sér onkologických nemocných často identifikují právě řadu normálních buněčných proteinů, a byl podán důkaz, že takto definované konstitutivní SEREX-identifikované proteiny mohou představovat „self“-antigeny nutné k aktivaci právě CD4⁺CD25⁺ regulačních T-lymfocytů. Zajímavé přitom je, že současná imunizace nádorovým a SEREX-antigenem zvyšuje intenzitu efektorové odpovědi, zatímco imunizace pouze SEREX-antigeny navozuje stav tolerance vůči nádoru právě v důsledku aktivace CD4⁺CD25⁺ Treg-buněk. Celkový osud imunitní odpovědi tedy do značné míry závisí na antigenním kontextu (23).

Regulace protinádorové imunitní odpovědi prostřednictvím Th1 a Th2 subpopulací pomocných T-lymfocytů

Jakákoliv antigen-specifická imunitní odpověď vyžaduje kromě rozeznání antigenu efektorovými buňkami (B-lymfocyty či cytotoxické T-lymfocyty) ještě další signál doručený příslušným antigenem aktivované buňce pomocnými T-lymfocyty, jednak ve formě tzv. kostimulačních povrchových molekul, jednak ve formě cytokinů (5). Na základě repertoáru exprimovaných cytokinů bývají pomocné T-lymfocyty klasifikovány do dvou subpopulací označovaných jako Th1 a Th2.

Tyto polarizované populace pomocných T-lymfocytů diferencují z tzv. Th0 prekursorů pod vlivem dosti komplexních a ne úplně pochopených signálů od antigen prezentujících buněk (APC), svou úlohu přitom hrají jednotlivé kostimulační molekuly exprimované na povrchu APC, typ antigenu a cytokinové prostředí, v němž tato diferenciace probíhá. Th1 subpopulace diferencuje hlavně pod vlivem interleukinu-12 a jejím klasickým vlastním cytokinem je IL-2 a zejména interferon γ . Th1 buňky se tak podílí zejména na aktivaci buněčné imunitní odpovědi aktivací NK-buněk, CTL a makrofágů, a na zánětlivé reakci. Th2 - subpopulace diferencuje pod vlivem a sama preferenčně syntetizuje IL-4, který spolu s dalšími secernovanými interleukiny -5, -6, -9 a -10 zejména aktivuje B-lymfocyty a humorální typ imunitní odpovědi a zároveň působí spíše protizánětlivě. Diferenciace ve směru Th1 - a Th2-subsetů mají tendenci navzájem antagonizovat, což často vede k polarizované celkové imunitní odpovědi v jednom či druhém směru. Je ovšem také pravda, že imunitní odpověď může probíhat jako integrovaná, zahrnující jak buněčnou tak humorální část; v tom případě se na její regulaci podílí buď pomocné buňky typu Th0 nebo Th1 - a Th2-subsety v jejím rámci koexistují (5, 24).

Na několika místech předchozího textu již byla zmíněna klíčová funkce buněčné imunity v imunitní odpovědi vůči nádoru. Z tohoto pohledu může hrát rovnováha mezi Th1 - a Th2-subpopulacemi pomocných T-lymfocytů velmi významnou regulační funkci. Polarizace ve směru Th1 bude zásadní pro účinnou aktivaci protinádorové imunitní odpovědi, zatímco Th2-polarizace svým inhibičním účinkem na diferenciaci ve směru Th1 bude na celkovou protinádorovou imunitní odpověď působit negativně. Uvedená disbalace Th1 $\rightarrow$ Th2 diferenciace byla skutečně popsána u celé řady nádorů, jako je kolorektální karcinom, karcinom močového měchýře, ledvin, prostaty či melanom (24).

Zajímavý příspěvek k této problematice uvedla Dr. Julia Szekeres (Department of Medical Microbiology and Immunology, Pecs University, Pecs). Její práce vyšla z oblasti reprodukční imunologie. Již delší dobu je známo, že rovněž gravidita je jedním z faktorů zasahujícím do polarizace pomocných T-lymfocytů ve směru Th2; tato polarizace patří mezi jeden z graviditu ochraňujících efektů progesteronu a jejím prostředníkem je protein zvaný PIBF, který je uvolněn z lymfocytů v odpověď na progesteronový signál. PIBF zřejmě působí na úrovni aktivace transkripčního faktoru STAT-6, což je faktor fyziologicky aktivovaný interleukinem-4 prostřednictvím dobře popsané JAK-STAT signální dráhy a hrající klíčovou a nezastupitelnou úlohu ve fyziologických dopadech IL-4 ve směru Th2-diferenciace (25). Z hlediska dopadu tohoto článku je ovšem podstatná ta část sdělení Dr. Szekeres, v jejímž rámci byla exprese PIBF prokázána nejen v lymfocytech gravidní samice, nýbrž rovněž v celé řadě nádorů - močového měchýře, varlete, ledvin, melanomu, nádorů oblasti hlavy a krku a hematologických nádorových onemocnění. Neutralizace sekrece PIBF specifickou protilátkou zvyšuje senzitivitu vůči lytickému působení NK-buněk *in vitro* a imunizace vůči PIBF signifikantně brzdí růst následně transplantovaného myelomu a melanomu. Zdá se tedy, že se jedná o další příklad toho, že nádor si je schopen osvojit z hlediska tumorigeneze naprosto nepřibuznou regulační dráhu k tomu, aby paralyzoval účinnou imunitní odpověď.

Imunodominance

Jedním z problémů protinádorové imunitní odpovědi, a to jak přirozené, tak stimulované specifickou vakcínou, který ovšem nebývá příliš často diskutován, je problém imunodominance. Podstatou imunodominance je skutečnost, že přestože nádorově transformovaná, popřípadě v menší míře virově infikovaná, buňka exprimuje a prezentuje současně řadu epitopů, které mohou sloužit jako cílové struktury buněčné imunitní odpovědi, imunitní systém zpravidla není schopen souběžně

imunitní odpovědi proti těmto různým antigenním strukturám. Pouze jeden nebo několik málo antigenů je v každém časovém okamžiku předmětem imunitní odpovědi - tyto antigeny se označují jako imunodominantní. Tato antigenní hierarchie má celou řadu závažných biologických a praktických důsledků. Mimo jiné velmi napomáhá selekci a progresi klonů, které unikají přirozené endogenní protinádorové imunitní reakci, a to ve dvou ohledech. Předně, imunodominance chrání nádorové buňky, které ztratily expresi imunodominantního antigenu, a to dokud jsou přítomny buňky původní nádorové populace v místě nádoru. Expresie imunodominantního antigenu totiž diktuje antigenní specifitu v místě nádoru, takže „escape“-varianty, přestože exprimují řadu dalších antigenů, jsou pro lokální imunitní odpověď neviditelné. Za druhé, v experimentálních systémech se ukazuje, že imunodominanci je možné těsně korelovat s rychlostí imunitní odpovědi proti danému antigenu - imunodominantní antigen indukuje rychlou imunitní odpověď, zatímco nástup imunitní odpovědi proti imunorecesivním

antigenům je pomalejší. Tento vztah platí při současné imunizaci různými antigeny. Pochopitelně v průběhu nádorové progresi, tedy postupné mutagenese a objevování se nových antigenních variant spolu s fenotypickou progresí nádoru není tato „startovní čára“ jednotlivých antigenů totožná - existující imunitní odpověď má tendenci se chovat dominantně vůči nově se objevujícím antigenům, takže imunitní odpověď bývá deformovaná ve prospěch časnějších benigních či méně maligních stádií, poněvadž antigeny charakterizující např. metastatické buňky mohou zůstat tímto způsobem neaktivní. Konečně, imunodominance může závažným způsobem snížit účinnost multiantigenních protinádorových vakcín, jejichž koncepci ve svém příspěvku rozebral Dr. Radvanyi (viz výše) - imunodominantní antigen nepřipustí indukci široké imunitní odpovědi proti všem antigenům v příslušné vakcíně. Imunodominance může být v tomto případě překonána oddělenou vakcinací imunorecesivními antigeny, ovšem v každém případě je nutné ji vzít v úvahu při koncipování vakcinačního schématu (26).

Literatura

- Falk C.S., Riethmüller G., Gruber R. (2004): Tumorimmunologie. In: Hiddemann W., Huber H., Bartram C. (eds): Die Onkologie, pp.355-380, Berlin, Heidelberg: Springer.
- Radvanyi L. (2004): Discovery and immunologic validation of new antigens for therapeutic cancer vaccines. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 133, 179-197.
- Schreiber H. (1999): Tumor immunology. In: Paul W.E. (ed.): *Fundamental Immunology*, Fourth Edition, pp.1237-1270, Philadelphia: Lippincott-Raven.
- Zaludík J. (1997): Protinádorová imunoterapie. *Klinická onkologie* 10,94-96.
- Schwarz T. (2003): Immunology. In: Bologna J.L., Jorizzo J.L., Rapini P.R. (eds.): *Dermatology*, pp.65-81, New York: Mosby.
- Zarour H.M., DeLeo A., Finn O.J., Storkus W.J. (2003): Tumor antigens. In: Kufe D.W., Pollock R.E., Weichselbaum R.R., Bast R.C. Jr., Gansler T.S., Holland J.F., Frei E. (eds.): *Cancer Medicine* 6, pp.196-208, Hamilton, London: BC Decker.
- Kuball J., Derigs H.-G., Wölfel T. (2002): T-Zelltherapie in der Onkologie. Therapeutische Vakzination, allogene Blutstammzelltransplantation und adoptiver T-Zelltransfer. *Dtsch.Med.Wochenschr.* 127, 755-762.
- Krejsek J., Kopecký O. (2004): Imunita a nádorové bujení. In: Krejsek J., Kopecký O.: *Klinická imunologie*, pp.541-570, Hradec Králové: Nukleus HK.
- van der Bruggen P., Traversari C., Chomez P., Lurquin C., de Plaen E., van den Eynde B., Knuth A., Boon T. (1991): A gene encoding an antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254, 1643-1647.
- Šmardová J., Pacholík K. (2003): Molekulární podstata kancerogeneze. In: Adam Z., Vorlíček J., Koptíková J. (eds.): *Obecná onkologie a podporná léčba*, pp.59-90, Praha: Grada.
- Bruchová H., Brdička R. (2004): Čipové technologie v molekulární biologii. In: Jonák J. Jr., Jonák J. (eds.): *Molekulární biologie a genetika XI*, pp.7-20, Praha: Ústav molekulární genetiky AV ČR.
- Mocellin S., Wang E., Panelli M., Pilati P., Marincola F.M. (2004): DNA array-based gene profiling in tumor immunology. *Clinical Cancer Res.* 10, 4597-4606.
- Dunn G.P., Old L.J., Schreiber R.D. (2004): The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21, 137-148.
- Al-Sarireh B., Eremin O. (2000): Tumour-associated macrophages (TAMS): disordered function, immune suppression and progressive tumour growth. *J.R.Coll.Surg.Edinburgh* 45, 1-16.
- Anichini A., Vegetti C., Mortarini R. (2004): The paradox of T cell-mediated antitumor immunity in spite of poor clinical outcome in human melanoma. *Cancer Immunol.Immunother.* 53, 855-864.
- Chambers W.H., Rabinowich H., Heberman R.B. (2004): Tumor-associated immunodeficiency and implications for tumor development and prognosis. In: Kufe D.W., Pollock R.E., Weichselbaum R.R., Bast R.C. Jr., Gansler T.S., Holland J.F., Frei E. (eds.): *Cancer Medicine* 6, pp.229-239, Hamilton, London: BC Decker.
- Whiteside T.L., Heberman R.B. (2004): Effectors of immunity and rationale for immunotherapy. In: Kufe D.W., Pollock R.E., Weichselbaum R.R., Bast R.C. Jr., Gansler T.S., Holland J.F., Frei E. (eds.): *Cancer Medicine* 6, pp.221-228, Hamilton, London: BC Decker.
- Hatina J. (2002): Molekulární biologie imunitní odpovědi - 11. mezinárodní imunologický kongres, Stockholm, 22.-27. 7. 2001. *Epidemiol. Mikrobiol. Immunol.* 51, 82-87.
- Neumann-Haefelin C., Spangenberg H.C., Thimme R., Blum H.E. (2004): Suppressor-T-Zellen: Immunologische Regulatorzellen mit klinischer Perspektive. *Dtsch.Med.Wochenschr.* 129, 1627-1630.
- Curiel T.J., Coukos G., Zou L., Alvarez X., Cheng P., Mottram P., Evdemon-Hogan M., Conejo-Garcia J.R., Zhang L., Burow M., Zhu Y., Wei S., Kryczek I., Daniel B., Gordon A., Myers L., Lackner A., Disis M.L., Knutson K.L., Chen L., Zou W. (2004): Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature Med.* 10, 942-947.
- Shevach E.M. (2004): Fatal attraction: tumors beckon regulatory T cells. *Nature Med.* 10, 900-901.
- Wang H.Y., Lee D.A., Peng G., Guo Z., Li Y., Kiniwa Y., Shevach E.M., Wang R.F. (2004): Tumor-specific human CD4⁺ regulatory T cells and their ligands: implications for immunotherapy. *Immunity* 20, 107-118.
- Nishikawa H., Kato T., Tanida K., Hiasa A., Tawara I., Ikeda H., Ikarashi Y., Wakasugi H., Kronenberg M., Nakayama T., Taniguchi M., Kuribayashi K., Old L.J., Shiku H. (2003): CD4⁺CD25⁺ T cells responding to serologically defined autoantigens suppress antitumor immune responses. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 100, 10902-10906.
- Lauerová L., Kocák I. (2001): Regulace protinádorové imunity pomocnými CD4⁺ Th1/Th2 lymfocyty. *Klinická onkologie* 14, 154-156.
- Szekeres-Bartho J. (2002): Immunological relationship between the mother and the fetus. *Int.Rev.Immunol.* 21, 471-495.
- Schreiber H., Wu T.H., Nachman J., Kast W.M. (2002): Immunodominance and tumor escape. *Sem.Cancer Biol.* 12, 25-31.