

Mechanismy navozené imunotolerance nádorových buněk u chronické lymfatické leukemie a možnosti jejich detekce metodami průtokové cytometrie

Novák M, Procházka V

Hematoonkologická klinika, Fakultní nemocnice / Lékařská fakulta UP Olomouc

Transfúze Hematol. dnes, 20, 2014, No. 2, p. 75-82

SOUHRN

Imunotolerance nádoru, popřípadě alterace imunity jako celku, je častým důsledkem interakce nádorových buněk s buňkami imunitního systému. Mezi hlavní mechanismy navození imunotolerance počítáme navození stavu vyčerpání u efektorových CD8+ T-lymfocytů cestou interakce receptoru programované buněčné smrti PD-1 se svými ligandy, nižší exprese MHC proteinů II. třídy na antigen prezentujících buňkách CD4+ T-lymfocytům, změny v poolu T-regulačních lymfocytů, ovlivnění mikroprostředí nádoru a antiapoptotické děje. Ovlivnění imunitní odpovědi cestou blokady dráhy programované buněčné smrti terapeutickými monoklonálními protilátkami je v současné době předmětem klinických studií.

KLÍČOVÁ SLOVA

imunotolerance, chronická lymfatická leukemie, T-regulační lymfocyty, dráha programované buněčné smrti, průtoková cytometrie

SUMMARY

Novák M, Procházka V

Mechanisms of immune tolerance induction of tumour cells in chronic lymphocytic leukaemia and possibility of their detection using flow cytometry

Tumour immune tolerance or, possibly, alteration of immunity as a whole, is a frequent consequence of tumour cell interaction with cells of the immune system. The main mechanisms of immune tolerance induction include inducing a state of exhaustion in effector CD8+ T cells through interaction of the programmed cell death 1 receptor with its ligands, lower expression of MHC class II proteins on antigen presenting cells to CD4+ T cells, changes in the T regulatory cell pool, impact on tumour microenvironment and anti-apoptotic processes. The effect of therapeutic monoclonal antibodies on immune response by blockage of the programmed cell death pathway is currently the subject of clinical studies.

KEY WORDS

immune tolerance, chronic lymphocytic leukaemia, T- regulatory lymphocytes, blockage programmed cell death pathway, flow cytometry

ÚVOD

Výzkum vztahů mezi nádorem a hostitelským prostředím, zprostředkovaný imunokompetentními subpopulacemi, je jedním z ústředních témat současné hematologické onkologie. Původní „tumorcentrický“ model, ve kterém je výsledek interakce určován téměř výhradně charakteristikami nádorové tkáně, v současné době ustupuje novému pojetí, které zohledňuje výrazný podíl imunitní komponenty hostitele v oblastech geneze nádoru, jeho růstu, prognózy a reakce na terapeutické postupy, zejména na biologickou léčbu na bázi imunoterapie. Vhodným příkladem se jeví být chronická lymfatická leukemie (CLL), která je nejčastější leukémií západní polokoule. Je charakteristická klonální proliferací nádorově transformovaných antigenně stimulovaných zralých B-lymfocytů s typickým imunofenotypem CD19⁺CD20⁺CD22⁺CD23⁺CD5⁺ a jejich následnou kumulací v periferní krvi a kostní dřeni, případně ve slezině a lymfatických uzlinách. Biologicky i prognosticky se CLL rozpadá na dvě podskupiny dle diferenciálního stadia maligního B-lymfocytu. Odlišujeme CLL odvozenou od pregerminálních nebo aktivovaných B-lymfocytů, které neprošly změnami v germinálním centru, nesoucích nemutovanou formu IgV_H genu, a CLL s maligním klonem postgerminálních paměťových B-lymfocytů s mutovanou formou IgV_H (1). Ukazuje se, že životaschopnost maligní populace z velké části závisí na permisivitě mikroprostředí nádoru, tedy na komplexu celulární komponenty (T-lymfocyty, makrofágy, stromální folikulární dendritické buňky) poskytujícím chemokiny, cytokiny a angiogenní faktory nezbytné pro přežití nádorových buněk (2). Pronádorově se rovněž uplatňuje dráha B-buněčného receptoru (B-cell receptor, BCR), kdy aktivace transkripčních faktorů cestou tyrozinových kináz (ZAP 70, Bruton tyrosine kinase, spleen tyrosine kinase, Src family kinases, phosphatidylinositol 3-kinase) zlepšuje přežití maligních buněk (3, 4, 5). Recentní literatura také naznačuje, že CLL může být řízena autonomní signalizací BCR nezávisle na antigenní stimulaci (6). Lepší přežívání maligních B-lymfocytů rovněž vyplývá z jejich zvýšené odolnosti vůči apoptóze, což je dáno mimo jiné i delecemi genů pro specifické mikro-RNA, které jsou součástí deletovaných dlouhých ramen chromozomu 13 [del (13q14)] (7, 8). Imunitní mechanismy, které se podílejí na podminění proliferace patologického klonu u CLL lze schematicky rozdělit podle místa působení na mechanismy vázané na T-regulační lymfocyty, stimulaci dráhy programované buněčné smrti cytotoxických T-lymfocytů a pravděpodobně i NK buněk, funkční defekty pomocných T-lymfocytů indukované nádorem, a konečně mechanismy vázané na MHC.

NÁDOREM INDUKOVANÉ FUNKČNÍ DEFEKTY T-LYMFOCYTŮ

Klinicky významnou interakcí mezi nádorem a imunitou je zejména funkční postižení T-lymfocytů, ústící v selhávání protinádorové imunity a snížené odolnosti vůči bakteriálním a virovým patogenům. Toto postižení je způsobeno komplexem dějů, z nichž vedoucí úlohu hraje činnost T-regulačních lymfocytů a kostimulátorů a koinhibitorů T-lymfocytů, označovaných jako B7 homology, a jejich receptorů (9). Jedná se o jev označovaný jako vyčerpání (exhausting) T-lymfocytů, které pak nejsou schopny efektivního cytotoxického působení na cílové buňky. Tento získaný stav T-lymfocytové dysfunkce je definován zvýšenou expresí markerů PD-1 (receptor programované buněčné smrti - 1, programmed death-1), CD244 a CD160 (10), sloužících jako negativní regulátory aktivace lymfocytů, a byl původně popsán v kontextu chronických virových infekcí (mezi ligandy výše uvedených markerů patří např. proteiny mediující vstup herpetických virů do buňky) (11). Defekt spočívá v nižší expresi genů pro cytoskeletální proteiny, vede k chybnému formování synapsí a tím k nefunkčnímu směřování transportu cytotoxických vehikul z efektorové buňky. Produkce F-aktinu, granzymu B ani vlastní degranulace není postižena (12). Chronická stimulace virovými antigeny vede ke ztrátě imunokompetence CD8⁺ T-lymfocytů, ústící v defekt cytotoxického působení, redukování produkce cytokinů a ztrátě proliferací kapacity (12). Podobné postižení imunokompetentních T-lymfocytových subpopulací je v poslední době popisováno i u nemocných s dalšími hematologickými malignitami (chronická myeloidní leukemie, akutní myeloidní leukemie, T-buněčná leukemie/lymfom dospělých) (13, 14). Funkční testy u nemocných s CLL odhalily, že markery T-lymfocytové dysfunkce (PD-1, CD244 a CD160) jsou nejsilněji exprimovány na T_{EM} buňkách (T effector memory, CCR7⁺/CD45RA⁻) a T_{EMRA} (CD45RA⁺), zatímco na naivních (CCR7⁺CD45⁺RA⁺) a paměťových T_{CM} (T central memory, CCR7⁺/CD45RA⁻) je exprese významně nižší. Tyto výsledky ukazují posun v kompartmentu cirkulujících T-lymfocytů směrem k diferencovaným formám T-lymfocytů po kontaktu s antigenem, nesoucím markery vyčerpání (12). Dále byla zjištěna redukce počtu CD8⁺ T-lymfocytů schopných proliferace po polyklonální aktivaci a prolongace buněčného cyklu u dělících se forem (12). A konečně, experimentálně byla prokázána snížená schopnost cytotoxického působení na patologické buňky (12, 15). Na rozdíl od vyčerpání T-lymfocytů u chronických virových infekcí nebyla u pacientů s CLL pozorována ztráta schopnosti produkovat efektorové cytokiny, intracelulární koncentrace interferonu-γ (IFNγ) a faktoru

indukujícího nekrózu nádoru (TNF α) byla ve srovnání se zdravými dárce dokonce zvýšená, což odpovídá vyššímu zastoupení T_{EM} a T_{EMRA} buněk, produkujícím vyšší množství IFN γ a TNF α než naivní T-lymfocyty a T_{CM} (12). Byl studován i případný vliv cytomegalovirové infekce (CMV) u nemocných s CLL, přičemž defekt proliferace CD8⁺ T-lymfocytů i jejich cytotoxické funkce byl pozorován bez příčinné souvislosti s CMV pozitivitou. Naopak, zastoupení jednoho z markerů funkční inaktivity, PD-1, bylo zvýšené pouze u CMV negativních nemocných (12). Rozdílné působení virových a nádorových buněk na funkčnost CD8⁺ T-lymfocytů může odpovídat odlišnému působení vysoce afinitních virových antigenů a níže afinitních antigenů nádorově transformovaných, tělu vlastních B-lymfocytů. Lze zvažovat i hypotézu, ve které jsou vyčerpané T-lymfocyty udržovány v mikroprostředí nádoru cíleně, neboť jej saturují pronádorově působícími cytokiny IFN γ a TNF α (16, 17). Nádorová populace tedy dokáže komplexně a efektivně potlačovat funkce T-buněčné složky imunity, a to hned na několika úrovních, počínaje redukcí počtu proliferujících T-lymfocytů, přes ovlivnění buněčného cyklu až k zásahu do transportu a směřování vlastních cytotoxických působků.

T-REGULAČNÍ LYMFOCYTY A OVLIVNĚNÍ IMUNITNÍ ODPOVĚDI

Aktivita efektorových T-lymfocytových subpopulací je řízena prostřednictvím T-regulačních lymfocytů (Treg), které jsou součástí komplexní sítě regulující adaptivní typ imunity. Role Treg v regulačních procesech je velmi komplexní a není do dnešní doby zcela objasněna. Jejich schopnost potlačovat protinádorovou imunitu je jedním ze zásadních faktorů umožňujících maligním buňkám uniknout zničení a vede k růstu tumoru (18, 19), u pacientů s některými lymfomy však vyšší zastoupení Treg pozitivně koreluje s aktivitou cytotoxických efektorových buněk a tedy s lepší prognózou (22). Ukazuje se, že minimálně některé subpopulace Treg jsou u hematologických malignit indukovatelné nádorem, konkrétně se jedná o konverzi konvenčních CD4⁺/CD25⁻ T-lymfocytů na CD4⁺/FoxP3⁺, přičemž fyziologické B-lymfocyty schopnost konvertovat Treg postrádají (20, 21). Studium takových manipulací hostitelským organismem, zvyšujících adaptabilitu nádoru, by mohlo odhalit nové skutečnosti důležité pro hlubší poznání mechanismů evoluce nádorového růstu.

Ve světle současných znalostí rozdělujeme Treg do čtyř funkčních skupin: 1) maligní Treg, infiltrující zralé T-lymfocytové leukemie a lymfomy, typické exprese FoxP3; 2) supresorové Treg, přítomné v matrix solidních tumorů a lymfomů, charakterizované schop-

ností potlačovat protinádorovou funkci cytotoxických CD8⁺ T-lymfocytů; 3) Treg s přímým antitumorovým efektem a 4) tzv. „incompetent“ Treg, přispívající k autoimunitním fenoménům u angioimunoblastického T-buněčného lymfomu (22).

Pro účely detekce Treg metodami průtokové cytometrie jsou v současné době využívány dva přístupy: první, tradiční, využívá exprese znaku FoxP3, což je 47 kDA protein z „forkhead/ wingedhelix“ rodiny transkripčních faktorů. Proteiny rodiny Fox fungují jako aktivátory i represory transkripce a jsou charakterizovány přítomností „forkhead“ domény, nezbytné pro vazbu DNA a lokalizaci v jádře (23). FoxP3 slouží jako represor transkripce promotorů genů pro cytokiny IL-2 a GM-CSF (24). Rovněž byla publikována zjištění, že FoxP3 interaguje s transkripčními faktory hrajícími klíčovou roli v expresi mnoha genů pro cytokiny, jako např. nuclear factor of activated T cells, (NFAT), acute myeloid leukemia 1/Runt-related transcription factor 1 (AML1/Runx1), a pravděpodobně i jaderný faktor-kappa B (NF- κ B) (25, 26). Vnitrobuněčná lokalizace FoxP3 však komplikuje cytometrickou analýzu, objevily se proto tendence nahradit jej v analytických protokolech povrchovým markerem, který by byl snáze přístupný a zároveň umožňoval vysokou senzitivitu a specifitu stanovení Treg. Liu a kolektiv popsali metodiku identifikace Treg pomocí znaku CD127, který inverzně koreluje s expresí FoxP3 na T-regulačních lymfocytech (27). CD127 je jednou ze složek heterodimerického receptoru IL-7, který mimo CD127 dále sestává ze základní strukturní domény (common chain), sdílené dalšími receptory pro cytokiny (IL-2R, IL-4R, IL-9R, IL-15R a IL-21R). CD127 je exprimován na thymocytech, T- a B-lymfocytových progenitorech, zralých T-lymfocytech, monocytech a dalších buňkách lymfoidní a myeloidní linie. Bylo prokázáno, že receptor pro IL-7 sehrává důležitou roli v proliferaci a diferenciaci T-lymfocytů a *in-vitro* experimenty odhalily pokles exprese CD127 v průběhu aktivace T-lymfocytů (28, 29). Role Treg u CLL není doposud jednoznačná, nicméně počet T-regulačních lymfocytů inverzně koreluje s dobou přežití bez léčby (treatment free survival) a může sloužit jako nezávislý prognostický faktor předpovídající čas do začátku terapie u pacientů s nízkým až středním rizikem (30). Zajímavým zjištěním ukazujícím na provázanost mezi regulačními faktory imunity a malignitou je rovněž signifikantně vyšší absolutní počet Treg u pacientů s CLL komplikovanou autoimunitní cytopenií (31). Ukazuje se, že analýzy vztahů mezi T-regulačními lymfocyty, tumorem a imunitou hostitele mohou přinést nové a velmi významné informace o jejich vzájemných interakcích, a to zejména v počátečních obdobích ná-

dorového růstu, kde pravděpodobně spolurozhodují o osudu nádorově transformovaných buněk.

INHIBICE FUNKCE CYTOTOXICKÝCH T-LYMFOCYTŮ CESTOU DRÁHY PROGRAMOVANÉ BUNĚČNÉ SMRTI

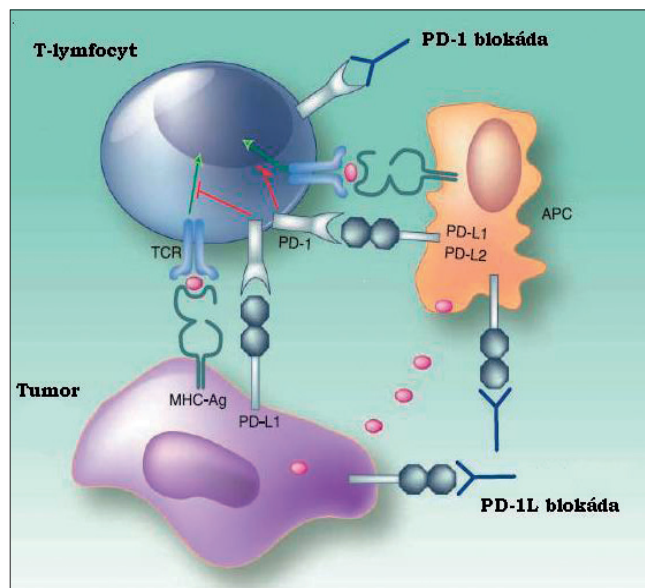
Na snížení imunitní odpovědi vůči tumoru se mimo Treg významně podílí interakce receptoru PD-1, exprimovaného především na B- a T-lymfocytech se svými ligandy PD-L1 (CD274, B7-H1) a PD-L2 (CD273, B7-DC), tzv. dráha programované buněčné smrti (32). PD-1 je významným členem rodiny B7 homologů, jejichž kostimulační a koinhibiční funkce jsou u T-lymfocytů již dlouho známy (9). V poslední době bylo mimo receptoru PD-1 (CD279, B7-H1) popsáno mnoho dalších významných homologů (B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-DC, atd.) s významnou rolí v regulaci vrozené i adaptivní imunity, včetně nádorové imunotolerance. Některé z nich účinně potlačují hostitelovu imunitu a umožňují tak nádorovým buňkám unikat cytotoxické odpovědi (33, 34, 35). U T-lymfocytů tyto interakce inhibují proliferaci, produkci cytokinů i schopnost cytotoxického působení, což bývá označováno jako vyčerpání (exhausting) (36). U hematologických malignit byl rovněž popsán vliv PD-1 na NK buňky, tedy NK vyčerpání, což může mít vliv na použití terapeutických monoklonálních protilátek působících cestou NK buňkami mediované cytotoxicity (ADCC) (37). Působení rodiny B7-H se nevztahuje pouze na přímé interakce mezi maligními buňkami a imunokompetentními efektor, ale jejich exprese na nemaligních buňkách tumoru významně ovlivňuje mikroprostředí a vytváří vhodnou niku pro přežití a růst nádorové populace (32). PD-1 pozitivní nádorové buňky jsou rovněž schopny indukovat T-regulační lymfocyty a řídit jejich expanzi a tlumivé působení, přičemž stejný efekt vykazují i PD-1 pozitivní dendritické buňky infiltrující nádor (38, 39, 40). V neposlední řadě nádorové buňky s vyšší expresí PD-1 vykazují rezistenci vůči apoptotickým stimulům indukovaným jak Fas dráhou, tak účinkem chemoterapie (41). Dlouhodobá stimulace antigeny nádorových buněk, v tomto případě interakce receptoru PD-1 se svými ligandy, tedy způsobuje chronickou aktivaci signální dráhy PD-1 PD-1L/2L, což inhibuje fyziologickou aktivitu efektorových T-lymfocytů formou výše popsaných defektů buněčné diferenciace a cytotoxicity. Mechanismy inhibice imunokompetentních lymfocytových subpopulací, která cestou dráhy programované buněčné smrti během nádorového růstu nastává, zásadním způsobem ovlivňuje možnosti protinádorové imunity hostitele, spolu s dalšími faktory vede k imunitní toleranci nádorové tkáně a v konečném důsledku je

spojena s horší terapeutickou odpovědí (42). Geny obou ligandů (PD-L1 a PD-L2) jsou umístěny v oblasti 9p24.1, tedy pod vlivem Janusovy kinázy 2 (JAK2). Experimenty na buněčných liniích Hodgkinova lymfomu a primárně mediastinálního velkobuněčného B-lymfomu prokázaly navýšení transkripce PD-L1 vlivem amplifikace JAK2 (43). Receptor PD-1 i jeho ligandy jsou vzhledem ke svému umístění na povrchu buňky ideálním cílem pro analýzu metodami průtokové cytometrie, přičemž vhodné protilátky jsou již dostupné ve formě konjugátů i pro mnohobarevná stanovení (44). Dráha programované buněčné smrti významně ovlivňuje možnosti protinádorové imunity a je schopna zásadním způsobem redukovat míru cytotoxického působení jak CD8⁺ T-lymfocytů, tak i NK buněk. Tato schopnost manipulovat výkonnou složkou adaptivní imunity poskytuje maligní populaci významnou konkurenční výhodu a interakce receptoru PD-1 se svými ligandy je proto oprávněně v centru zájmu mnoha výzkumných skupin, neboť lze předpokládat, že blokáda dráhy programované buněčné smrti například terapeutickou monoklonální protilátkou umožní obnovení funkce hostitelské protinádorové imunity.

MHC A „UKRYTÍ“ LEUKEMICKÝCH BUNĚK PŘED IMUNITNÍ ODPOVĚDÍ

Další modalitou ovlivnění imunitní odpovědi je snížení exprese proteinů hlavního histokompatibilního komplexu II. třídy (MHC II) na antigen prezentujících buňkách CD4 T-lymfocytům. Touto cestou dochází k nižší úrovni exprese HLA (Human Leukocyte Antigen) antigenů, ke snížení imunogenity nádorových buněk a tím k jejich „ukrytí“ před imunitní odpovědí ve formě cytotoxického působení T-lymfocytů (45). Geny pro MHC II. třídy jsou většinou umístěny v oblasti 6p12 a jsou konstitutivně exprimovány na antigen prezentujících buňkách (B-lymfocyty, dendritické buňky, monocyty), s možností indukovatelné exprese na dalších typech leukocytů. Snížení exprese genů MHC II. třídy u nemocných s difuzním velkobuněčným B-lymfomem (DLBCL) výrazně koreluje s kratším přežíváním (46). Z recentních výzkumů vyplývá, že podkladem nižší exprese těchto genů je snížení jejich transkripce, která je řízena expresí transkripčních aktivátorů kódovaných genem transkripčního aktivátoru pro MHC II. třídy (CIITA; class II, Major Histocompatibility Complex, Transactivator) respektive jeho mutovaných forem (47, 48). Lze se oprávněně domnívat, že analogický mechanismus regulace transkripce se uplatňuje i u CLL a dalších hematologických malignit (49). Na snížení imunitního dozoru nad nádorovými buňkami má dále vliv míra exprese genů Janusovy kinázy (JAK2).

NAVOZENÁ IMUNOTOLERANCE NÁDOROVÝCH BUNĚK U CLL



Obr. 1 Schéma interakce mezi tumorem, T-lymfocytem a APC. Upraveno dle American association of cancer research.

Amplifikace oblasti 9p24, tedy postihující gen JAK2, vede k jeho hyperexpresi a tím ke konstitutivní aktivaci JAK2, což má za následek nekontrolovanou buněčnou proliferaci a dále amplifikaci genů PD-L1 a PD-L2, tedy genů přímo ovlivňujících cytotoxickou imunitní odpověď organismu (43).

BIOLOGICKÉ PODKLADY REGULACE IMUNITNÍ ODPOVĚDI U CLL

Společným jmenovatelem všech výše uvedených cest alterace imunitní odpovědi jsou primární genetické změny, předcházející nebo souběžné s růstem nádoru, zejména amplifikace genu Janusovy kinázy a pravděpodobně i zásah do mechanismů transkripčního aktivace genu pro MHC II. třídy (49), což vede k vyšší aktivitě dráhy programované buněčné smrti a tím k indukci imu-

noregulačních Treg, k navýšení proliferační aktivity nádorových buněk a k nižší expresi HLA (43). Nádorové buňky pak unikají imunitnímu systému především použitím „stealth mode“, tedy snížením imunogenity prostřednictvím nižší exprese HLA (23) a cestou aktivace dráhy PD-1/PD-L1 spojené s alterací funkce efektorových CD8⁺ T-lymfocytů, čímž dochází k navození imunologické tolerance (24). Dále se uplatňuje vliv nádorové tkáně zvyšující aktivitu CD4⁺ Treg, vykazujících tlumivý efekt na cytotoxické efektorové buňky, potlačení procesů apoptózy a ovlivnění mikroprostředí nádoru cestou protumorových cytokinů a chemokinů (16, 17, 41). Vyčerpání efektorových T-lymfocytů, indukované chronickou aktivací signální dráhy programované buněčné smrti, vede nejen k navození imunotolerance nádorových buněk, ale k alteraci T-buněčné imunity jako celku, což je v konečném důsledku patrné ve vyšší incidenci a závažnějším průběhu bakteriálních a virových infekcí (50). Navýšení exprese ligandu PD-L1 je prokázáno nejen u hematologických malignit, ale i u mnoha solidních tumorů, kde inhibuje produkci cytokinů i aktivitu tumor infiltrujících CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocytů (51, 52, 53). Blokáda interakce receptoru PD-1 s ligandy (PD-L1 a PD-L2) *in vitro* zvyšuje úroveň imunitní odpovědi (54) a přímo se podílí na efektivitě protinádorové aktivity imunitního systému (50, 55).

Mimo dráhu programované buněčné smrti se na regulaci T-buněčné odpovědi podílí i další mechanismy, v recentních publikacích je popsán vliv dráhy CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4), která ovlivňuje proliferaci a přežívání buněk CLL cestou downregulace T-lymfocytové odpovědi, konkrétně cestou ovlivnění exprese transkripčních (STAT1, NFATC2), proliferačních (c-Fos, c-Myc) a antiapoptotických (Bcl-2) faktorů (56).

Blokáda CTLA4 terapeutickými monoklonálními protilátkami je v současné době předmětem klinických

Tab. 1 Panel protilátek k analýze chronických lymfoproliferací z B-lymfocytů. Dle Euroflow 2013.

	Pac. Blue	Pac. Orange	FITC	PE	PerCP	Pe-Cy7	APC	APC-H7
zkumavka 1	CD20 a CD4	CD45	CD8 a sm λ	CD56 a sm κ	CD5	CD19 a TCR γ/δ	sm CD3	CD38
zkumavka 2	CD20	CD45	CD23	CD10	CD79b	CD19	CD200	CD43
zkumavka 3	CD20	CD45	CD31	LAIR1	CD11c	CD19	Sm Igμ	CD81
zkumavka 4	CD20	CD45	CD103	CD95	CD22	CD19	CXCR5	CD49d
zkumavka 5	CD20	CD45	CD62L	CD39	HLA-DR	CD19	CD27	

Legenda k tabulce: Pac. Blue - Pacific Blue, Pac. Orange - Pacific Orange, FITC - Fluorescein isothiocyanate, PE - R-phycoerythrin, PerCP - Peridinin chlorophyll, Pe-Cy7 - tandemový konjugát phycoerythrinu a Cy7 NHS esteru, APC - Allophycocyanin, APC-H7 - tandemový konjugát allophycocyaninu a stabilnějšího analogu Cy7 NHS esteru - surface membrane, povrchový znak

studií zejména u solidních tumorů, a to se slibnými výsledky. Zajímavý je synergní protinádorový efekt souběžné blokády dráhy PD-1 a CTLA4, což demonstruje možnosti komplexního terapeutického ovlivnění imunitní odpovědi v budoucnu (57).

OD EXPERIMENTŮ DO PRAXE

V současné době již poměrně komplexní poznání mechanismů, dovolujících maligním buňkám unikat protinádorové odpovědi, logicky vede k vývoji nových terapeutických postupů a rutinně aplikovatelných diagnostických metod. Snahy o terapeutické ovlivnění T-regulačních lymfocytů jsou prozatím většinou ve stavu primárního výzkumu, zejména pro ne zcela vyjasněnou a velmi komplikovanou a provázanou síť působení mezi buňkami. Terapeutická modulace exprese proteinů hlavního histokompatibilního komplexu II. třídy (MHC II) by pravděpodobně vyžadovala individualizované zásahy na úrovni genomu, resp. epigenomu, což je v současné době rutinně nezvládnutelné. Velmi vhodným cílem se však ukazuje být dráha programované buněčné smrti, a to jednak pro jednoduchost interakce (jeden receptor a jeden, resp. dva, ligandy) a dále pro lokalizaci cílových struktur na povrchu buněk. Tyto skutečnosti v současné době vedou k testování terapeutické monoklonální protilátky anti-PD-1 u solidních tumorů (58) i hematologických malignit (37, 59).

Průtoková cytometrie hraje klíčovou roli jak v diferenciální diagnostice CLL, tak ve stanovení imunitní odpovědi, v případě analýz T-lymfocytových subpopulací jsou její metody zlatým standardem a jsou rutinně využívány. Diferenciálně diagnostické analýzy a sledování minimální zbytkové nemoci prodělávají v současné době přerod směrem k využití mnohobarevných panelů protilátek dle výstupů konsorcia Euroflow (60).

Unifikace laboratorního procesu včetně použitých identických sestav monoklonálních protilátek, analytického software a kalibrátorů umožňuje nejen eliminovat nepřesnosti, ale i dříve nedosažitelné druhé čtení či konzultaci expertním pracovištěm. Na našem pracovišti již s úspěchem používáme vlastní mnohobarevný analytický protokol založený na analýze povrchových markerů CD45, CD3, CD4, CD8, CD16+CD56, CD279 (PD-1) a CD107a, zpracovaných metodikou „lyse no-wash“ z periferní krve. Za účelem detekce T-regulačních lymfocytů jsme nejprve testovali povrchovou analýzu znaku CD127, který inverzně koreluje s expresí FoxP3 na Treg (27), ale později jsme z důvodu snazší standardizace přešli na detekci intracytoplazmatických FoxP3 (markery FoxP3, CD4, CD25) pomocí komerčně dostupného kitu.

Do praktického použití se dále dostávají metody i kvantitativní průtokové cytometrie (61), které jsou na základě analýzy vazebných míst schopny poskytnout informace o reálném zastoupení cílových struktur na zájmových buňkách, což s sebou přináší nový pohled zejména na hodnocení účinnosti terapeutických monoklonálních protilátek (62).

Pokročilé analýzy subpopulací T-regulačních lymfocytů včetně jejich dynamiky a výzkum dráhy programované buněčné smrti jsou zatím doménou spíše vědecko-výzkumných pracovišť, nicméně v blízké době můžeme čekat jejich přesun do rutinní praxe.

Týká se to zejména metod detekce a kvantifikace exprese receptoru PD-1, které v případě úspěšných testů terapeutické monoklonální protilátky budou nezbytné pro přesnou indikaci terapie a sledování odpovědi na léčbu. Zásadní úlohu průtokové cytometrie lze s jistotou očekávat u indikace a monitorování terapie na bázi virovou transdukci modifikovaných T-lymfocytů, exprimujících chimérické receptory antigenů (Chimeric antigen receptors, CARs), slibné nové terapeutické modality s kurativním potenciálem, která je v současné době ve stadiu klinických testů (63).

Zavádění osmi- a vícebarevných cytometrů, rozšiřující se spektrum fluorochromů a nové analytické metody, zejména možnost kvantifikovat expresi cílových struktur, umožňuje analyzovat širší souvislosti mezi jednotlivými imunokompetentními populacemi a maligními buňkami, posoudit jejich role v procesu regulace protinádorové odpovědi a poskytuje tak nový vhled do interakcí mezi maligními buňkami a hostitelským organismem směrem k úspěšné terapii (64, 65, 66).

Poděkování

Podpořeno grantem IGA-LF-2014-001

Podíl autorů na přípravě rukopisu

RNDr. Martin Novák: sepsání rukopisu

MUDr. Vít Procházka, Ph.D.: připomínkování a korektura rukopisu

LITERATURA

1. Damle RN, Wasil T, Fais F, et al. IgV gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94(6): 1840-1847.
2. Burger JA, Ghia P, Rosenwald A, Caligaris-Cappio F. The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. *Blood* 2009; 114(16): 3367-3375.
3. Stevenson BK, Krysov S, Davies AJ, Steele AJ, Packham G. B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011; 118(16): 4313-4320.
4. Wienster A. Emerging role of kinase targeted strategie in chronic

NAVOZENÁ IMUNOTOLERANCE NÁDOROVÝCH BUNĚK U CLL

- lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012; 2012: 88-96.
5. Young RM, Staudt LM. Targeting pathological B cell receptor signaling in lymphoid malignancies. *Nat Rev Drug Discov* 2013; 12(3): 229-243.
 6. Dühren-von Minden MD, Ubelhart R, Schneider D, et al. Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signaling. *Nature* 2012; 489(7415): 309-312.
 7. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(24): 15524-15529.
 8. Zenz T, Mertens D, Kuppers R, Dohner H, Stilgenbauer S. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2010; 10(1): 37-50.
 9. Sharp AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 116-126.
 10. Wherry EJ. T-cell exhaustion. *Nat Immunol* 2011; 12(6): 492-432.
 11. Blackburn SD, Shin H, Haining WN, et al. Coregulation of CD8+ T-cell exhaustion by multiple inhibitory receptor during chronic viral infection. *Nat Immunol* 2009; 10(1): 29-37.
 12. Riches JC, Davies JK, McClanahan F, et al. T cells from CLL patients exhibit features of T-cell exhaustion but retain capacity for cytokine production. *Blood* 2013; 121: 1612-1612.
 13. Kozako T, Yoshimitsu M, Fujiwara H, et al. PD-1/PD-L1 expression in human T-cell leukemia virus type 1 carriers and adult T-cell leukemia/lymphoma patients. *Leukemia* 2009; 23(2): 375-382.
 14. Mumprecht S, Schurch C, Schwaller J, Solenthaler M, Ochsenbein AF. Programmed death 1 signaling on chronic myeloid leukemia-specific T cells results in T-cell exhaustion and disease progression. *Blood* 2009; 114(8): 1528-1536.
 15. Wherry EJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, van der Most R, Ahmed R. Viral persistence alter CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J Virol* 2003; 77(8): 4911-4927.
 16. Buschle M, Campana D, Carding SR, Richard C, Hoffbrand AV, Brenner MK. Interferon gamma inhibits apoptotic cell death in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 1993; 177(1): 213-218.
 17. Digel W, Stefanic M, Schoniger W, et al. Tumor necrosis factor induces proliferation of neoplastic B cells from chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1989; 73(5): 1242-1246.
 18. Ahmadzadeh M, Felipe-Silva A, Heemskerk B, et al. FOXP3 expression accurately defines the population of intratumoral regulatory T cells that selectively accumulate in metastatic melanoma lesions. *Blood* 2008; 112: 4953-4960.
 19. Juan XL, Chen L, Li MX, et al. Elevated expression of Foxp3 in tumor-infiltrating Treg suppresses T-cell proliferation and contributes to gastric cancer progression in a COX-2-dependent manner. *Clin Immunol* 2010; 134: 277-288.
 20. Mittal S, Marshall NA, Duncan L, et al. Local and systemic induction of CD4+CD25+ regulatory T-cell population by non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2008; 111: 5359-5370.
 21. Ai WZ, Hou JZ, Zeiser R, et al. Follicular lymphoma B cells induce the conversion of conventional CD4+ T cells to T-regulatory cells. *Int J Cancer* 2009; 124: 239-244.
 22. J. Wang, Ke X. The Four types of Tregs in malignant lymphomas. *Journal of Hematology & Oncology* 2011; 4(50): 1-10.
 23. Ziegler SF. FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol* 2006; 24: 209-226.
 24. Bettelli E, Dastrange M, Oukka M. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(14): 5138-5143.
 25. Lopes JE, Torgerson TR, Schubert LA, et al. Analysis of FOXP3 reveals multiple domains required for its function as a transcriptional repressor. *J Immunol* 2006; 177(5): 3133-3142.
 26. Ono M, Yaguchi H, Ohkura N, et al. Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1. *Nature* 2007; 446(7136): 685-689.
 27. Liu W, Putnam AL, Xu-yu Z, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *JEM* 2006; 203(7): 1701-1711.
 28. Hofmeister R, Khaled AR, Benbernou N, et al. Interleukin-7: physiological roles and mechanisms of action. *Cytokine Growth Factor Rev* 1999; 10(1): 41-60.
 29. Appasamy PM. Biological and clinical implications of interleukin-7 and lymphopoiesis. *Cytokines Cell Mol Ther* 1999; 5(1): 25-39.
 30. Weiss L, Melchardt T, Egle A, Grabmer C, Greil R. and Tinhofer I. Regulatory T cells predict the time to initial treatment in early stage chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 2011; 117: 2163-2169.
 31. Lad DP, Varma S, Varma N, et al. Regulatory T-cells in B-cell chronic lymphocytic leukemia: their role in disease progression and autoimmune cytopenias *Leukemia and lymphoma* 2013; 54(5): 1012-1019.
 32. Wilcox RA, Feldman AL, Wada DA, et al. B7-H1 (PD-L1, CD274) suppresses host immunity in T-cell lymphoproliferative disorders. *Blood* 2009; 114: 2149-2158.
 33. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 2008; 26: 677-704.
 34. Flies DB, Chen L. The new B7s: playing a pivotal role in tumor immunity. *J Immunother* 2007; 30: 251-260.
 35. Yi KH, Chen L. Fine tuning the immune response through B7-H3 and B7-H4. *Immunol Rev* 2009; 229: 145-151.
 36. Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB, Sharpe AH, Freeman GJ. Programmed death-1 ligand interacts specifically with the B7-1 co-stimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity* 2007; 27: 111-122.
 37. Benson DM Jr, Bakan CE, Mishra A, et al. The PD-1/PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti-PD-1 antibody. *Blood* 2010; 116: 2286-2294.
 38. Yang ZZ, Novak AJ, Stenson MJ, Witzig TE, Ansell SM. Intratumoral CD4+CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression of infiltrating CD4+ T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2006; 107: 3639-3646.

39. Han Y, Wu J, Bi L, et al. Malignant B cells induce the conversion of CD4CD25 T cells to regulatory T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *PLoS One*. Publikováno elektronicky 2011; 6:e28649.
40. Rosenblatt J, Glotzbecker B, Mills H, et al. PD-1 blockade by CT-011, anti-PD-1 antibody, enhances ex vivo T-cell responses to autologous dendritic cells/myeloma fusion vaccine. *J Immunother* 2011; 34: 409-418.
41. Azuma T, Yao S, Zhu G, Flies SJ, Chen L. B7-H1 is ubiquitous antiapoptotic receptor on cancer cells. *Blood* 2008; 111: 3635-3643.
42. Rozali EN, Hato SV, Robinson BW, Lake RA, Lesterhuis WJ. Programmed death ligand 2 in cancer-induced immune suppression. *Clinical and Developmental Immunology* Publikováno elektronicky 656340. Epub 2012 Apr 29.
43. Green M, Monti S, Rodig SJ, et al. Integrative analysis reveals selective 9p22.1 amplification, increased PD-1 ligand expression, and further induction via JAK2 in nodular sclerosing Hodgkin lymphoma and primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood* 2010; 116(17): 3268-3277.
44. Sachdeva M, Fischl MA, Pahwa R, Sachdeva N, Pahwa S. Immune exhaustion occurs concomitantly with immune activation and decrease in regulatory T cells in viremic chronically HIV-1 infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2010; 54(5): 447-454.
45. Rimsza LM, Roberts RA, Miller TP, et al. Loss of MHC class II gene and protein expression in diffuse large B-cell lymphoma is related to decreased tumor immunosurveillance and poor patient survival regardless of other prognostic factors: a follow-up study from the Leukemia and Lymphoma Molecular Profiling Project. *Blood* 2004; 103(1): 4251-4258.
46. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002; 346(25): 1937-1947.
47. Cycon AK, Rimsza LM, Murphy SP. Alterations in CIITA constitute a common mechanism accounting for downregulation of MHC class II expression in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *Exp Hematol* 2009; 7(2): 184-194.
48. Steidl CH, Gascoyne R. The molecular pathogenesis of primary mediastinal large B-cell. *Blood* 2011; 118(10): 2659-2669.
49. Steidl CH, Shan SP, Woolcock BW, et al. MHC class II transactivator CIITA is a recurrent gene fusion partner in lymphoid cancers. *Nature* 2011; 471(7338): 377-383.
50. Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, Freeman GJ. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol* 2007; 8: 239-245.
51. Dong H, Strome SE, Salomao DR, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 2002; 8:793-800 [Erratum, *Nat Med* 2002; 8: 1039].
52. Hino R, Kabashima K, Kato Y, et al. Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. *Cancer* 2010; 116: 1757-1766.
53. Taube JM, Anders RA, Young JD, et al. Colocalization of inflammatory response with B7-H1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med* 2012; 4: 127ra37.
54. Fife BT, Pauken KE, Eagar TN, et al. Interactions between PD-1 and PD-L1 promote tolerance by blocking the TCR-induced stop signal. *Nat Immunol* 2009; 10: 1185-1192.
55. Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 12293-12297.
56. Mittal AK, Chaturvedi NK, Rohlfen RA, et al. Role of CTLA4 in the Proliferation and Survival of Chronic Lymphocytic Leukemia. *PLoS ONE* 2013 8(8): e70352. doi:10.1371/journal.pone.0070352.
57. Curran MA, Montalvo W, Yagita H, Allison JP. PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 4275-80.
58. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al. Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *N Engl J Med* 2012; 366: 2443-2454.
59. Westin JR, Chu F, Zhang M, et al. Safety and activity of PD1 blockade by pidilizumab in combination with rituximab in patients with relapsed follicular lymphoma: a single group, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2014; 15: 69-77.
60. Van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia* 2012; 26: 1908-1975.
61. Maher KJ, Fletcher MA. Quantitative flow cytometry in the clinical laboratory. *Clinical and Applied Immunology Reviews* 2005; 5(6): 353-372.
62. Klabusay M, Sukova V, Coupek P. Different levels of CD52 antigen expression evaluated by quantitative fluorescence cytometry are detected on B-lymphocytes, CD 34+ cells and tumor cells of patients with chronic B-cell lymphoproliferative diseases. *Cytometry* 2007; 72B: 363-370. doi: 10.1002/cyto.b.20181.
63. Porter DL, Levine BL, Kalos M, et al. Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells in Chronic Lymphoid Leukemia *N Engl J Med* 2011; 365:725-733. doi: 10.1056/NEJMoa1103849.
64. Curiel TJ. Tregs and rethinking cancer immunotherapy. *J Clin Invest* 2007; 117(5): 1167-1174.
65. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Curr Opin Immunol* 2012; 24: 207-212.
66. Hallek M. Signaling the end of chronic lymphocytic leukemia: new frontline treatment strategies. *Blood*; 2013: 138-150.

Doručeno do redakce: 15. dubna 2014

Přijato po recenzích: 23. června 2014

RNDr. Martin Novák

**Laboratoř průtokové cytometrie
Hematoonkologická klinika FN/LF Olomouc
I. P. Pavlova 6
775 20 Olomouc
e-mail: novak.m@email.cz**