

Univerzita Karlova

2. lékařská fakulta

Studijní program: Imunologie



Mgr. Lenka Quaiserová (Kašíková)

Identifikace prognostických ukazatelů pro imunoterapii karcinomu ovaria

Identification of prognostic biomarkers for immunotherapy of ovarian carcinoma

Dizertační práce

Vedoucí závěrečné práce: Doc. PharmDr. Jitka Palich Fučíková, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 20.5.2020

LENKA QUAISEROVÁ

Podpis

Identifikační záznam:

QUAISEROVÁ, Lenka. *Identifikace prognostických ukazatelů pro imunoterapii karcinomu ovaria. [Identification of prognostic biomarkers for immunotherapy of ovarian carcinoma]*. Praha, 2020. 151 stran, 5 příloh. Dizertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Ústav imunologie. Vedoucí závěrečné práce: Fučíková, Jitka

Poděkování

Děkuji své školitelce Doc. PharmDr. Jitce Palich Fučíkové, Ph.D. za odborné vedení během celého doktorského studia a za cenné rady jak při samotné experimentální práci, tak při psaní manuskriptů.

Děkuji také všem kolegům z Ústavu imunologie 2. LF UK a FN Motol a z výzkumného oddělení firmy Sotio za velmi přátelské a podnětné prostředí a za pomoc při řešení projektů, které jsou součástí této práce. Mé zvláštní poděkování patří Kláře Dánové, Ph.D., jejíž podnětné rady přispěly k dokončení této práce.

Speciální poděkování patří celé mé rodině a manželovi za trpělivost, toleranci a neustálou snahu mě motivovat a podporovat.

ABSTRAKT

Karcinom ovaria patří mezi gynekologické malignity s nejhroší prognózou, která vyplývá z pozdní diagnózy onemocnění a omezených terapeutických možností. Přes nesporný pokrok v chirurgické a chemoterapeutické léčbě je mortalita tohoto nádorového onemocnění stále vysoká. Z tohoto důvodu se řada preklinických i klinických studií zabývá identifikací nových léčebných postupů včetně imunoterapie a charakterizací nových prognostických a prediktivních ukazatelů, které by pomohly určit vývoj klinického stavu pacientek či jejich odpověď na léčbu. Cílem této práce byla charakterizace imunitního infiltrátu nádorového mikroprostředí (TME, z angl. tumor microenvironment) high-grade serózního karcinomu ovaria (HGSC, z angl. high-grade serous carcinoma) a stanovení jeho případné prognostické role v léčbě pacientek. Z našich výsledků vyplývá, že přítomnost aktivovaných DC-LAMP⁺ dendritických buněk v TME je asociováno s indukcí protinádorové Th1 (z angl. T helper type 1) imunitní odpovědi s významnou cytotoxickou aktivitou CD8⁺ T lymfocytů (CTL, z angl. cytotoxic T lymphocyte). Výsledná efektorová aktivita přítomných CTL není oproti očekávání blokována přítomností inhibičních molekul PD-L1 (z angl. programmed death-ligand 1), PD-1 (z angl. programmed cell death 1), CTLA-4 (z angl. cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) a LAG-3 (z angl. lymphocyte-activation gene 3), jak vyplývá z celogenomového sekvenování a imunohistochemické analýzy na rozsáhlém souboru pacientek, ale je důsledkem vyššího zastoupení molekuly TIM-3 (z angl. T cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3). Molekula TIM-3 představuje negativní prognostický ukazatel asociovaný s inhibicí protinádorové imunitní odpovědi u pacientek s HGSC. Současně z našich výsledků vyplývá, že výsledná aktivace protinádorové imunitní odpovědi v TME je zásadním způsobem ovlivněna přítomností molekul asociovaných s nebezpečím (DAMP, angl. danger associated molecular patterns). Konkrétně jsme ukázali, že vyšší zastoupení kalretikulinu, klíčové DAMP molekuly, v nádorové tkáni pacientek koreluje s vyšší efektorovou aktivitou protinádorové imunitní odpovědi a s lepší prognózou pacientek s HGSC. Tyto výsledky napomáhají hlubšímu porozumění role imunitního systému v TME u HGSC pacientek a identifikují možné prognostické ukazatele v léčbě tohoto závažného onemocnění.

Klíčová slova:

Karcinom ovaria, prognostické a prediktivní ukazatele (biomarkery), imunitní systém, kalretikulin, kontrolní body imunitních reakcí, imunoterapie.

ABSTRACT

Ovarian cancer belongs to the gynecological malignancies with the worst prognosis, mainly due to the late diagnosis of this disease and limited therapeutic options for patients. Despite the undeniable progress in surgical and chemotherapy treatment, the mortality of this disease is still rather high. For this reason, several preclinical and clinical studies have been involved in identification of new treatment strategies (including immunotherapy) and characterization of new prognostic and predictive biomarkers to help determine the development of the clinical condition of patients or their response to treatment. The aim of this thesis was to better understand the role of the immune system in the tumor microenvironment (TME) of high-grade serous ovarian cancer (HGSC) and its possible prognostic role in the treatment of patients. Our results show that the presence of activated DC-LAMP⁺ dendritic cells in the TME is associated with the induction of anti-tumor T helper type 1 response (Th1) and cytotoxic response. Surprisingly, the resulting effector activity of the cytotoxic T lymphocytes (CTLs) is not inhibited by the presence of programmed death-ligand 1 (PD-L1), programmed cell death (PD-1), cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4) and lymphocyte-activation gene 3 (LAG-3), as determined by genomic sequencing and immunohistochemical analysis in a large cohort of patients, but rather it is the result of a higher presence of the T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3 (TIM-3) molecule on CTLs. Our results clearly indicate that TIM-3 can serve as a negative prognostic biomarker associated with inhibition of anticancer immune response in HGSC patients. Our findings also show that the resulting activation of an antitumor immune response in TME is significantly influenced by the presence of danger associated molecular patterns (DAMPs). The high expression of calreticulin (CRT), the key molecule of DAMPs, in TME of patients correlates with higher effector activity of antitumor immune response and shows better prognosis of patients with HGSC. These results help to further understand the role of the immune system in the HGSC TME and identify possible prognostic biomarkers in the treatment of this serious disease.

Key words:

Ovarian carcinoma, prognostic and predictive biomarkers, immune system, calreticulin, immune checkpoint, immunotherapy.

OBSAH

1	Úvod	1
2	Ovariální karcinom a současné možnosti jeho terapie	3
3	Role imunitního systému v evoluci nádorového onemocnění.....	8
3.1	Teorie protinádorového imunitního dohledu	8
3.2	Mechanismus rozpoznání nádorových buněk imunitním systémem	10
3.2.1	Role kalretikulinu v imunogenní buněčné smrti a v aktivaci imunitní odpovědi... 12	
3.3	Mechanismus odstranění nádorových buněk imunitním systémem	15
3.4	Mechanismy úniku nádorových buněk imunitnímu systému	18
3.4.1	Snížení imunogenicity nádorových buněk	19
3.4.2	Aktivní obrana před cytotoxickým působením imunitních buněk.....	20
3.4.3	Navození imunosupresivního prostředí.....	22
4	Imunoterapie.....	23
4.1	Inhibitory kontrolních bodů imunitních reakcí v léčbě maligních onemocnění	23
4.1.1	Inhibitory kontrolních bodů imunitních reakcí v léčbě karcinomu ovaria.....	31
4.2	Imunoterapie založená na dendritických buňkách	33
5	Hodnocení účinnosti protinádorové terapie	36
6	Identifikace prognostických a prediktivních ukazatelů pro imunoterapeutickou léčbu karcinomu ovaria	38
6.1	Prognostický význam kalretikulinu.....	39
6.2	Prognostická a prediktivní role imunitního infiltrátu v nádorovém mikroprostředí.....	42
6.2.1	Vliv imunokompetentních buněk na prognózu pacientek s karcinomem ovaria....	45
6.2.2	Vliv imunosupresivních buněčných subpopulací na prognózu pacientek s karcinomem ovaria.....	46
6.3	Kontrolní body imunitních reakcí a jejich vztah k prognóze pacientek s karcinomem ovaria	47
7	Cíle	49
8	Výsledky	50
8.1	Přítomnost kalretikulinu v nádorovém mikroprostředí pacientek s karcinomem ovaria koreluje s aktivací adaptivní protinádorové imunitní odpovědi a lepší prognózou onemocnění..	52
8.2	Přítomnost aktivovaných dendritických buňky koreluje s vyšší infiltrací imunitních buněk a lepší prognózou pacientek s ovariálním karcinomem	65

8.3	TIM-3 určuje funkční orientaci imunitního infiltrátu u karcinomu ovaria.....	79
8.4	Prognostická role M2 makrofágů v nádorovém mikroprostředí metastatického karcinomu ovaria.....	93
8.5	Porovnání cytometrické a imunohistochemické analýzy ve sledování zastoupení kalretikulinu, klíčového parametru imunogenní buněčné smrti, v nádorovém mikroprostředí pacientů s různými druhy nádorů.....	125
8.6	Sumarizace literárních poznatků o významu kalretikulinu pro klinický průběh nádorových onemocnění.....	137
9	Závěr	138
10	Seznam literatury	140

SEZNAM ZKRATEK

Ag	antigen
AML	acute myeloid leukemia
ANXA1	annexin A1
APC	antigen-presenting cells
ARID1A	AT-Rich interaction domain-containing protein 1A
ATP	adenosine triphosphate
BAP31	B-cell receptor-associated protein 31
BRCA 1	breast cancer type 1
BRCA 2	breast cancer type 2
C1q	complement component 1q
CA125	ovarian carcinoma antigen 125
Ca ²⁺	calcium cation
CCL	C-C motif chemokine
CCR	C-C chemokine receptor
CG	cardiac glycosides
CR	complete response
CRT	calreticulin
CSF	colony stimulating factor
CTL	cytotoxic T lymphocyte
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
CTNNB1	catenin, beta-1
CTX	cyclophosphamid
CXCL	C-X-C motif chemokine
CXCR3	C-X-C-chemokine receptor 3
DAMP	damage (danger) associated molecular patterns
DC	dendritic cells
dMMR	DNA mismatch rapair
DNA	deoxyribonucleic acid
DOXO	doxorubicin
EGFR	epidermal growth factor receptor
eIF2 α	eukaryotic translation initiation factor 2 α
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay

ER	endoplasmic reticulum
FasL	fas ligand
FDA	food and drug administration
FPR1	formyl peptide receptor 1
GAL	galectin
GATA3	GATA Binding Protein 3
G-CSF	granulocyte colony stimulating factor
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor
GZMB	granzyme B
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
HGSC	high-grade serous carcinoma
HHP	high hydrostatic pressure
HLA-DR	human leukocyte antigen – DR isotype
HMGB1	high mobility group box 1
HSP	heat shock protein
Hyp-PDT	hypericin-based photodynamic therapy
ICD	immunogenic cell death
ICOS	inducible T-cell costimulator
ICOSL	inducible costimulator-ligand
iDC	immature dendritic cell
IDO	indoleamine 2,3-dioxygenase
IFN	interferon
IFNAR2	interferon-alpha/beta receptor
IHC	immunohistochemistry
IL	interleukin
IL15RA	interleukin 15 receptor subunit alpha
IL15RB	interleukin 15 receptor, beta
IL2RG	interleukin 2 receptor gamma
ILT2	human inhibitory receptors Ig-like transcript 2
IRR	radiation (radiotherapy)
irRC	immune related response criteria
KIR	killer inhibitory receptors
Kyn	kynurenine

LAG-3	lymphocyte-activation gene 3
LILR	leukocyte immunoglobulin-like receptors
LRP1	LDL receptor related protein 1
mDC	myeloid dendritic cells
MDDC	monocyte derived DC
MDSC	myeloid-derived suppressor cell
MFS	metastasis-free survival
MHC	major histocompatibility complex
MMR	mismatch repair
MTA	microwave thermal ablation
M-TME	metastatic tumor microenvironment
MTX	mitoxantrone
NCR	natural cytotoxicity triggering receptors
NF1	neurofibromin 1
NK	natural killer
NKR	NK cells receptors
NKT	natural killer T cell
NSCLC	non-small-cell lung carcinoma
ORR	objective response rate
OS	overall survival
OV	oncolytic viruses
OXP	oxaliplatin
P2RX7	purinergic receptor P2X7
P2RY2	purinergic receptor P2Y2
PARP	poly (ADP-ribose) polymerase
PAT	patupilone
PD	progressive disease
PD-1	programmed cell death 1
PD-L1	programmed death-ligand 1
PD-L2	programmed death-ligand 2
PERK	protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase
PFS	progression free survival
PIK3CA	phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, alpha

PLD	pegylated liposomal doxorubicin
PPP2R1A	protein phosphatase 2, structural/regulatory subunit alpha
PR	partial response
PRF1	perforin-1
PTEN	phosphatase and tensin homolog
P-TME	primary tumor microenvironment
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
RB1	retinoblastoma
RCC	renal cell carcinoma
RESICT	response evaluation criteria in solid tumors
RFS	relapse-free survival
RLH-L	RIG-I-like helicase ligand
RNA	ribonucleic acid
ROS	reactive oxygen species
SCCNH	squamous cell carcinoma of the head and neck
SD	stable disease
Sep	septacidin
SIRP α	signal regulatory protein α
TAM	tumor-associated macrophage
TCGA	the cancer genome atlas
TCR	T-cell receptor
TGF	tumor growth factor
Th1	T helper type 1
Th2	T helper type 2
TIL	tumor-infiltrating lymphocytes
TIM-3	T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3
TLR	Toll-like receptors
TMA	tumor-associated macrophage
TME	tumor microenvironment
TNF	tumor necrosis factor
TP53	tumor protein 53
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TREG	regulatory T cells

Trp	tryptophan
UPR	unfolded protein response
UVC	ultraviolet C
VEGF	vascular endothelial growth factor
WB	western blot
WHO	world health organization

1 Úvod

Ovariální karcinom je každoročně diagnostikován u téměř čtvrt milionu žen na světě. Představuje tak osmý nejčastější typ maligního onemocnění a sedmou nejčastější příčinu úmrtí u žen z důvodu nádorového onemocnění (Webb and Jordan, 2017). Současné léčebné postupy zahrnují zejména chirurgickou cytoredukcí následovanou chemoterapií založenou na kombinaci platiny a taxanových derivátů. Nicméně i při počáteční dobré odpovědi na léčbu dochází u většiny pacientek k relapsu onemocnění, rozvoji rezistence na chemoterapii a úmrtí do 5 let od zahájení léčby. Tato skutečnost vede ke snaze nalézt nové diagnostické a terapeutické prostředky, které by umožnily zlepšení prognózy tohoto onemocnění (Kossai *et al.*, 2018).

Imunoterapeutická léčba zaznamenala v uplynulých letech významný úspěch v terapii určitých maligních onemocnění. Některé z těchto přístupů jsou také předmětem testování u nádorů ovaria. Zejména se jedná o imunoterapii založenou na aplikaci autologních dendritických buněk (DC, z angl. dendritic cell) modifikovaných *ex vivo* v laboratorních podmínkách a protilátkách proti kontrolním bodům imunitních reakcí. Významnou celospolečenskou otázkou však zůstává identifikace skupiny pacientů, pro které by tato léčba byla přínosná. To je možno stanovit pomocí vhodných prognostických a prediktivních ukazatelů.

Jedním z nejvýznamnějších biochemických ukazatelů prognózy pacientek s karcinomem ovaria je nádorový antigen 125 (CA125, z angl. ovarian carcinoma antigen 125) (Huang *et al.*, 2010). Zvýšené hodnoty CA125 v séru však mohou doprovázet také jiná onemocnění, např. karcinomy epitelálního původu, endometriózu, myomatózní dělohu, zánětlivý adnextumor, jaterní cirhózu, pankreatitidu a peritonitidu. Z tohoto důvodu se současné preklinické studie s využitím pokroku v molekulární biologii, genomice a proteomice zaměřují na identifikaci zcela nových prognostických a prediktivních ukazatelů. Patří mezi ně zejména parametry definující složení imunitního infiltrátu a funkční kapacitu imunitních buněk nacházejících se v nádorovém mikroprostředí (TME, z angl. tumor microenvironment). Dále se pak jedná o molekuly vystavované či produkované maligními buňkami, a to převážně molekuly ze skupiny DAMP (z angl. danger associated molecular pattern).

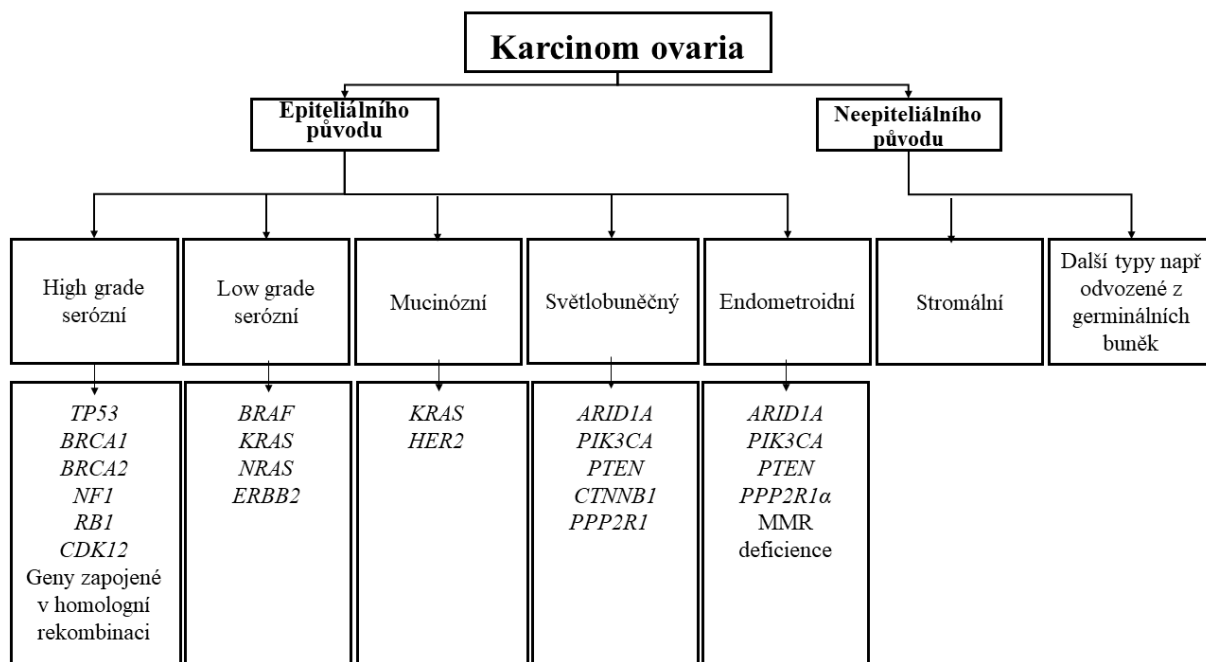
V první části této dizertační práce budou shrnuty poznatky o roli imunitního systému a molekul asociovaných s buněčným poškozením (DAMP) v evoluci nádorového onemocnění.

Poté bude pozornost věnována současným imunoterapeutickým přístupům využívaným při léčbě karcinomu ovaria s charakterizací možných prognostických a prediktivních ukazatelů asociovaných s imunitním infiltrátem a molekulami DAMP. Druhou část této dizertační práce tvoří soubor původních publikací, které přímo souvisí s touto tematikou.

2 Ovariální karcinom a současné možnosti jeho terapie

Ovariální karcinom představuje 15 % všech zhoubných nádorů u žen a je spojován s velice špatnou prognózou (Holschneider and Berek, 2000). V roce 2016 byla v České republice mortalita tohoto onemocnění 11,69 na 100 000 žen (ÚZIS, 2016). Mezi rizikové faktory onemocnění patří dědičnost, zejména mutace v genech *BRCA1* (z angl. breast cancer 1) a *BRCA2* (z angl. breast cancer 2), věk, obezita a pozdní menopauza (Holschneider and Berek, 2000).

Z hlediska histologie patří karcinom ovaria mezi heterogenní onemocnění vznikající buď z epitelu ovaria (serózní, mucinózní, endometroidní, ze světlých buněk), z germinálních buněk nebo z buněk ovariálního stromatu (Banerjee and Kaye, 2013; Holschneider and Berek, 2000). Ovariální nádory epiteliálního původu představují až 90 % všech případů, nejčastějším subtypem je serózní karcinom. Každý histologický subtyp je definován určitým klinickým chováním (odpovědí na chemoterapii, schopností metastazovat a prognózou onemocnění) a konkrétním souborem mutací (Banerjee and Kaye, 2013). Histologické subtypy ovariálního karcinomu jsou shrnuty na Obr. 1.



Obr. 1. Přehled histologických subtypů karcinomu ovaria a s nimi asociovaných mutací. Karcinom ovaria může být epiteliálního nebo neepiteliálního původu. Pod jednotlivými histologickými subtypy jsou uvedené nejčastější asociované mutace, popřípadě molekulární aberace. Seznam zkratk: *TP53* (z angl. tumor protein p53), *BRCA1* (z angl. breast cancer 1), *BRCA2* (z angl. breast cancer 2), *NF1* (z angl. neurofibromin 1), *RB1* (z angl. retinoblastoma),

HER2 (z angl. human epidermal growth factor receptor 2), ARID1A (z angl. AT-rich interaction domain-containing protein 1A), PIK3CA (z angl. phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, alpha), PTEN (z angl. phosphatase and tensin homolog), CTNGB1 (z angl. catenin, beta-1), PPP2R1A (z angl. protein phosphatase 2, structural/regulatory subunit alpha), MMR (z angl. mismatch repair). Převzato a upraveno z (Banerjee and Kaye, 2013).

V současné době je jako léčebný postup preferován operační výkon se snahou o maximální odstranění nádorového ložiska s ponecháním žádného nebo jen zcela minimálního operačního rezidua. Většina pacientek po primární cytoredukční léčbě podstupuje chemoterapii založenou na kombinaci taxanů s platinovými deriváty. Asi 30 % pacientek je v době diagnózy neoperabilních. U těchto pacientek je primárně podávána neoadjuvantní chemoterapie založená na platinovém preparátu a následně, při dobré odpovědi na tuto léčbu, je přikročeno k operaci. Nicméně u více než 50 % pacientek s kompletní odpovědí na léčbu dochází k recidivě onemocnění, zkrácení doby do dosažení relapsu a úmrtí do 5 let od diagnózy onemocnění (Kossai *et al.*, 2018; Vlasák *et al.*, 2018).

Tyto skutečnosti vedou k hledání nových léčebných a diagnostických postupů, které by přispěly k prodloužení doby do progrese onemocnění či celkového přežití pacientek s ovariálním karcinomem. Nejnovější léčebné postupy v léčbě karcinomu ovarií zahrnují podávání inhibitorů angiogeneze, inhibitorů poly (ADP-ribózy) polymerázy (PARP, z angl. poly (ADP-ribose) polymerase) a některé imunoterapeutické přístupy.

Angiogeneze neboli novotvorba krevních cév, je velice dynamický a striktně regulovaný proces, který je součástí řady fyziologických (např. hojení ran), ale i patologických dějů (např. vznik a vývoj nádoru). Bylo ukázáno, že vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF, z angl. vascular endothelial growth factor), klíčový regulátor angiogeneze, hraje zásadní roli také ve vývoji a růstu nádorů. Vyšší exprese tohoto faktoru je detekována u ovariálních nádorových buněk a míra exprese koreluje se stádiem a prognózou nádorového onemocnění (Cortez *et al.*, 2018). Z tohoto důvodu se některé nové léčebné postupy zaměřují na blokaci tohoto faktoru se snahou omezit krevní zásobení nádorové tkáně. VEGF signalizace je cílem několika druhů léčiv, a to monoklonální protilátky proti VEGF (bevacizumab), antagonisty receptoru pro VEGF (aflibercept) nebo inhibitorů signalizačních kináz tohoto receptoru (cediranib, pazopanib) (Cortez *et al.*, 2018). Tab. 1 shrnuje výsledky vybraných klinických studií.

Tab. 1. Blokátory VEGF ve III. fázi klinického testování.

Jméno Léčiva	Identifikační kód studie	Počet účastníků	Výsledek	Reference
Pazopanib	NCT00866697	940	Prodloužení PFS, bez efektu na OS	(Vergote <i>et al.</i> , 2019)
Bevacizumab	NCT01239732	1021	Prodloužení PFS	(Oza <i>et al.</i> , 2017)
	NCT00976911	361	Prodloužení OS a PFS	(Bamias <i>et al.</i> , 2017; Roncolato <i>et al.</i> , 2017)
	NCT00434642	484	Bez efektu na OS	(Aghajanian <i>et al.</i> , 2015)
	NCT00262847	1873	Prodloužení PFS	(Eskander <i>et al.</i> , 2018)

Seznam zkratk: OS (z angl. overall survival), PFS (z angl. progression free survival). Zdroj: <https://clinicaltrials.gov> (k datu prosinec 2019).

Proteiny rodiny PARP (zejména PARP1) hrají významnou roli v opravě jednovláknových zlomů DNA (z angl. deoxyribonucleic acid) mechanismem nahrazování jednotlivých bází (z angl. base excision repair). Inhibice PARP tudíž vede k nahromadění jednovláknových zlomů DNA a následně, kvůli kolapsu replikační vidlice, i ke kumulaci dvouvláknových zlomů DNA. Tyto zlomy ale mohou být opraveny ještě dalším mechanismem, a to homologní rekombinací. Procesu homologní rekombinace se účastní proteiny kódované geny *BRCA1* a *BRCA2*. Homologní rekombinace může být vyřazena v důsledku mutace těchto genů, která může být buď germinální (respektive zárodečná, dědičná) nebo somatická (v samotných nádorových buňkách) (Bryant *et al.*, 2005; Dockery *et al.*, 2017). Mutace v genech účastnících se oprav DNA navíc obecně zvyšuje citlivost k některým typům cytotoxických látek. Použití PARP inhibitorů pro léčbu pacientek s nádory prsu nebo ovarií s mutací v genech *BRCA1* a *BRCA2* je tedy založeno na dvou principech a) chemosenzibilizaci nádoru a b) tzv. syntetické letalitě (Bortlíková *et al.*, 2019). Syntetická letalita je typ genové interakce, při níž k smrti buňky vlivem použití daného léčiva (v tomto případě inhibitorů PARP, které vyřadí opravy jednovláknových zlomů) dochází pouze, pokud je u ní přítomný ještě další defekt (v tomto případě mutace v genech *BRCA1/BRCA2* zajišťujících homologní rekombinaci). Prvním registrovaným léčivem fungujícím na principu syntetické letality se stal olaparib. V současné době je olaparib používán v léčbě rekurentního serózního ovariálního karcinomu (Gelmon *et al.*, 2011; Ledermann *et al.*, 2016). Dalšími registrovanými inhibitory PARP pro léčbu ovariálního karcinomu je také rucaparib (Swisher *et al.*, 2017) a niraparib (Mirza *et al.*, 2016). Studie, které vedly k jejich registraci, jsou shrnuty v Tab. 2. Obdobně jako

inhibitory angiogeneze PARP inhibitory mají výrazný efekt na PFS (z angl. progression free survival), avšak OS (z angl. overall survival) ovlivňují minimálně.

Tab. 2. Přehled PARP inhibitorů schválených FDA a registrovaných pro léčbu karcinomu ovaria

Olaparib	Identifikační kód studie: NCT00753545 Udržovací léčba pacientek s recidivujícím epiteliálním karcinomem ovaria, vejcovodů nebo peritoneálním karcinomem, které vykazovaly kompletní nebo částečnou odpověď na chemoterapii na bázi platiny
	Identifikační kód studie: NCT00679783 Léčba pacientek s germinální mutací genu <i>BRCA</i> v pokročilém stadiu karcinomu ovaria po předchozí chemoterapeutické léčbě (3 cykly).
Rucaparib	Identifikační kód studie: NCT01891344 Léčba pacientek s germinální mutací genu <i>BRCA</i> v pokročilém stadiu karcinomu ovaria po předchozí chemoterapeutické léčbě (3 cykly).
Niraparib	Identifikační kód studie: NCT01847274 Udržovací léčba dospělých pacientek s recidivujícím epiteliálním karcinomem ovaria, vejcovodů nebo peritoneálním karcinomem, které vykazovaly kompletní nebo částečnou odpověď na chemoterapii na bázi platiny

Seznam zkratk: *BRCA* (z angl. *breast cancer type*), *FDA* (z angl. *food drug administration*). Převzato a upraveno podle (Ashworth and Lord,

2018)

3 Role imunitního systému v evoluci nádorového onemocnění

Ze současných poznatků experimentálního i klinického testování jednoznačně vyplývá klíčová role imunitního systému v boji proti nádorovým buňkám (Fridman *et al.*, 2017). Komunikace mezi maligními buňkami a složkami imunity představuje dynamický proces, který detailně popisuje teorie protinádorového imunitního dohledu (Dunn *et al.*, 2004).

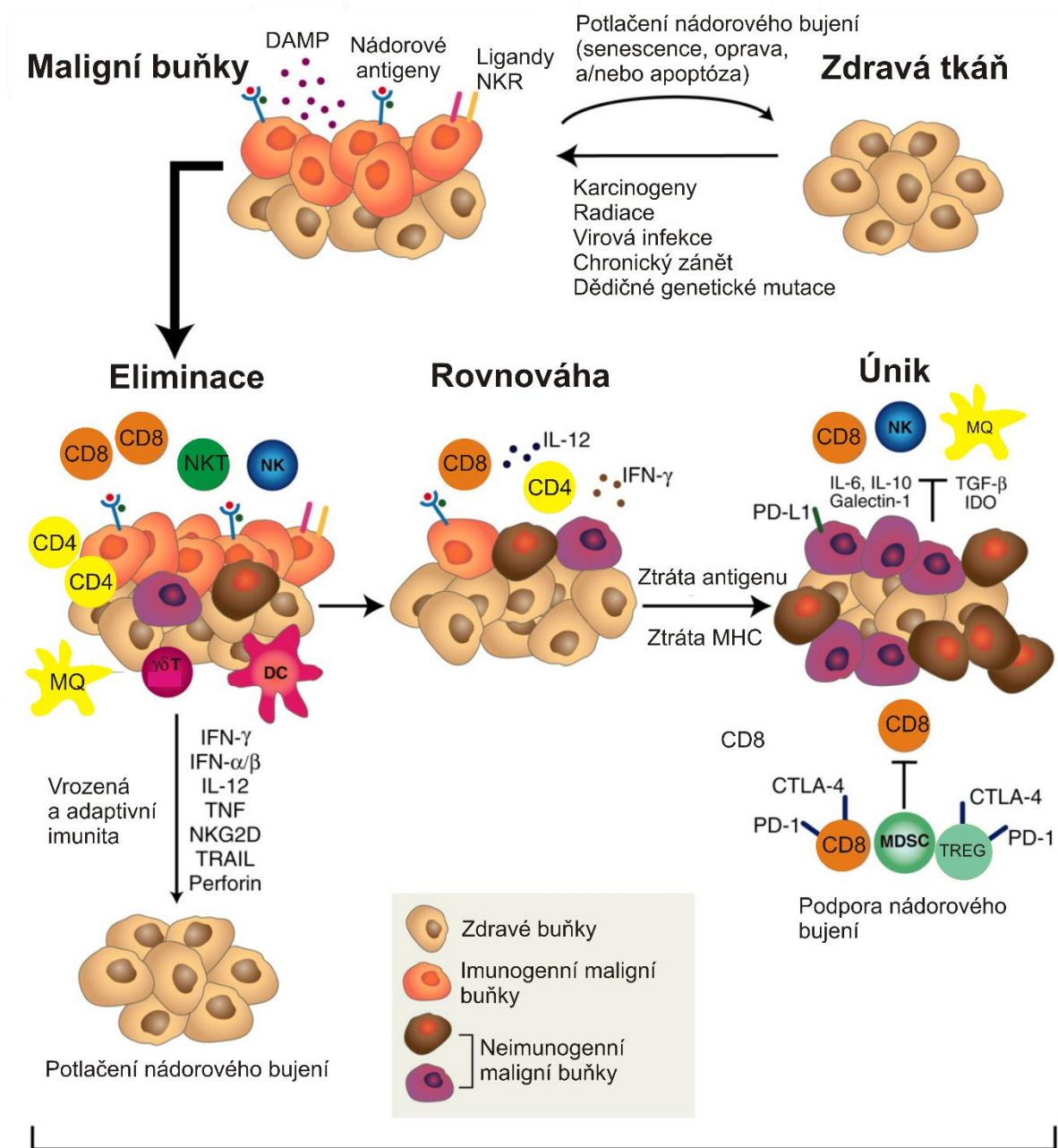
3.1 Teorie protinádorového imunitního dohledu

Teorie protinádorového imunitního dohledu rozlišuje tři fáze evoluce nádorového onemocnění: eliminaci, rovnováhu a únik, které jsou shrnuty na Obr. 2. Ve fázi eliminace je imunitní systém schopen rozpoznávat maligní buňky díky existenci nádorově specifických, resp. asociovaných antigenů. Imunogenicitu nádorových buněk, tedy schopnost maligních buněk indukovat imunitní odpověď, dále zvyšuje exprese a uvolňování imunogenních molekul či molekul asociovaných s buněčným stresem a poškozením, které jsou označovány jako DAMP. Tyto faktory významně přispívají k rozpoznání a odstranění neoplastických buněk dříve, než dojde k rozvoji a klinické manifestaci onemocnění (Schreiber *et al.*, 2011). Nicméně pod selekčním tlakem imunitního systému na geneticky nestabilní nádorové buňky vznikají nové fenotypové varianty neoplastických buněk, které nejsou rozpoznávány imunitním systémem, a dochází tak k rozvoji fáze dynamické rovnováhy.

Fáze dynamické rovnováhy představuje imunitou navozenou nádorovou latenci, ve které je omezena proliferační aktivita maligních buněk a imunitní systém udržuje jejich množství pod kontrolou. Výsledkem tohoto procesu mohou být 3 potenciální scénáře: a) v TME převáží účinná protinádorová imunitní odpověď a dojde k návratu do fáze eliminace, tedy k úplnému odstranění nádorových buněk; b) dojde k vytvoření dlouhodobého stavu dynamické rovnováhy, který může trvat až několik let a během kterého nedochází k růstu nádorové masy, neboť počet nově vznikajících maligních buněk je zhruba stejný jako počet buněk odumírajících; c) převáží-li v TME imunosupresivní imunitní odpověď, nádorové buňky přechází do fáze úniku a rozvíjí se klinicky závažné onemocnění (Dunn *et al.*, 2004).

Ve fázi úniku již nádorové buňky nepodléhají kontrole imunitního systému. To se děje zejména kvůli ztrátě exprese nádorových antigenů, sekreci inhibičních cytokinů, snížení exprese molekul hlavního histokompatibilního komplexu (MHC, z angl. major histocompatibility complex), chemotaxi imunosupresivních buněk do TME či expresi tzv. inhibičních molekul neboli kontrolních bodů imunitních reakcí (viz. také podkapitola

Mechanismy úniku nádorových buněk imunitnímu systému) (Kim *et al.*, 2007; Mittal *et al.*, 2014).



Imunoeditace nádorů

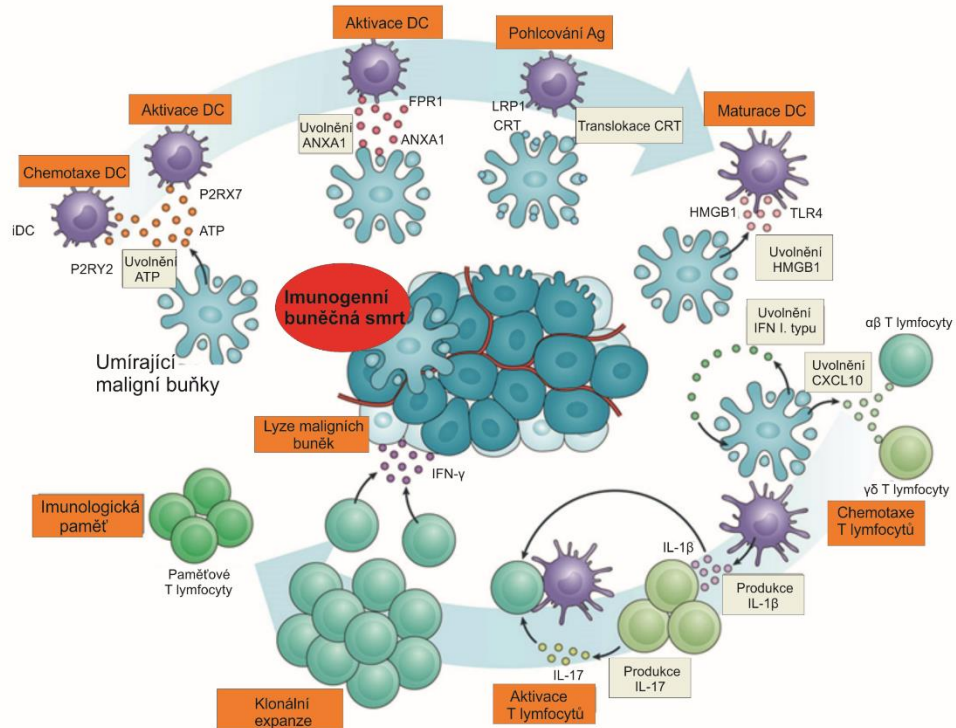
Obr. 2. Imunoeditace nádorů. V teorii protinádorového dohledu rozlišujeme 3 fáze – fázi eliminace, rovnováhy a úniku. V eliminační fázi vrozená a adaptivní imunita spolupracují na rozpoznání a eliminaci nádorových buněk. Maligní buňky jsou detekovány imunitním systémem zejména díky expresi nádorových antigenů a molekul DAMP. Vlivem zvýšené genetické nestability nádorových buněk vznikají nové klony neoplastických buněk s odlišným fenotypem, které jsou schopné unikat dohledu imunitního systému. Tyto buňky se vyznačují zejména ztrátou exprese nádorových antigenů, sníženou citlivostí na efektorové imunitní mechanismy a indukci imunosupresivního stavu v nádorovém mikroprostředí (TME). Ve fázi rovnováhy sice dochází ke vzniku nových variant neoplastických buněk, ty jsou pod dohledem imunitního systému. Tato fáze může trvat v řádu měsíců až několika let. Nové varianty

nádorových buněk mohou vstupovat do poslední fáze, tzv. úniku, kde jejich růst už nebude schopen imunitní systém blokovat a dojde ke klinickému projevu nádorového onemocnění. Seznam zkratk: CTLA-4 (z angl. cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4), DAMP (z angl. damage (danger) associated molecular patterns), IDO (z angl. indolamine 2,3-dioxygenase), IFN (z angl. interferon), IL (z angl. interleukin), MDSC (z angl. myeloid-derived suppressor cell), NK (z angl. natural killer), NKR (z angl. NK cells receptors), PD-1 (z angl. programmed cell death 1), PD-L1 (z angl. programmed death-ligand 1), TGF- β (z angl. tumor growth factor β), TNF (z angl. tumor necrosis factor), TRAIL (z angl. TNF-related apoptosis-inducing ligand). Převzato a upraveno podle (Schreiber *et al.*, 2011).

3.2 Mechanismus rozpoznání nádorových buněk imunitním systémem

Základním předpokladem pro rozpoznání nádorových buněk imunitním systémem je existence nádorově specifických, resp. asociovaných antigenů, a přítomnost molekul DAMP.

K uvolnění molekul DAMP do TME dochází během imunogenní buněčné smrti. Imunogenní buněčná smrt (ICD, z angl. immunogenic cell death) představuje konkrétní typ apoptózy, u které dochází k regulované aktivaci imunitního systému (Fucikova *et al.*, 2018). Molekuly DAMP mohou být rozděleny do 3 kategorií podle způsobu uvolnění z maligní buňky: a) molekuly, které jsou v rané fázi apoptózy translokovány z endoplazmatického retikula (ER, z angl. endoplasmatic reticulum) na buněčný povrch – kalretikulín (CRT, z angl. calreticulin), proteiny teplotního šoku (HSP70 a HSP90, z angl. heat shock protein) (Garg *et al.*, 2010; Spisek *et al.*, 2007), b) molekuly, které jsou uvolňovány z nádorové buňky aktivní sekrecí nebo pasivně uvolněním do extracelulárního prostředí – HMGB1 (z angl. high mobility group box 1), adenosin trifosfát (ATP, z angl. adenosine triphosphate), interferony I typu (IFN, z angl. interferon), annexin A1 (ANXA1, z angl. annexin A1), kyselina močová a některé prozánětlivé cytokiny (např. IL-1 β , IL-3, z angl. interleukin) (Garg *et al.*, 2012b; Garg *et al.*, 2010; Sistigu *et al.*, 2014; Vacchelli *et al.*, 2015), c) degradační produkty nádorových buněk – DNA a RNA (z angl. ribonucleic acid) uvolněné v pozdní fázi apoptózy (Garg *et al.*, 2010). Společnou vlastností těchto molekul je aktivace imunitního systému, zejména populace antigen prezentujících buněk (APC, z angl. antigen presenting cells), které následně indukují nádorově specifickou T lymfocytární odpověď (Obr. 3).



Obr. 3. Imunogenní buněčná smrt maligních buněk a následná aktivace protinádorové imunitní odpovědi. Pokud se maligní buňka dostane do stresového prostředí, dochází k aktivaci imunogenní buněčné smrti charakterizované vystavováním a uvolňováním molekul DAMP do mezibuněčného prostoru v nádorovém ložisku, kde tyto molekuly aktivují jednotlivé složky imunity. V časné fázi imunogenní apoptózy dochází zejména k translokaci chaperonového proteinu kalretikulinu (CRT) a proteinů teplotního stresu 70 a 90 (HSP70 a HSP90) na buněčný povrch. Následně dochází k uvolnění nukleárního proteinu HMGB1, adenosintrifosfátu (ATP), annexinu A1 (ANXA 1) a interferonů I. typu (IFN I. typu) do extracelulárního prostoru. Společnou vlastností těchto molekul je následná aktivace imunitního systému, zejména dendritických buněk (DC), které indukují protinádorově specifickou T lymfocytární odpověď. Seznam zkratk: ANXA1 (z angl. annexin A1), ATP (z angl. adenosine triphosphate), CRT (z angl. calreticulin), CXCL10 (z angl. C-X-C motif chemokine), DC (z angl. dendritic cells), FPR1 (z angl. formyl peptide receptor 1), HMGB1 (z angl. high mobility group box 1), HSP (z angl. heat shock protein), iDC (z angl. immature dendritic cell), IL (z angl. interleukin), LRP1 (z angl. LDL receptor related protein 1), P2RX7 (z angl. purinergic receptor P2X7), P2RY2 (z angl. purinergic receptor P2Y2), TLR4 (z angl. Toll-like receptor 4). Převzato a upraveno podle (Galluzzi et al., 2017).

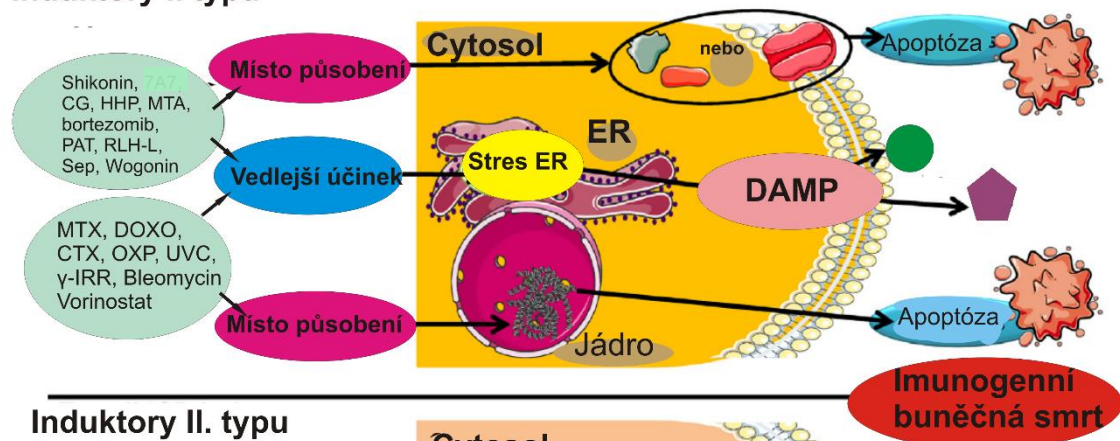
Význam jednotlivých DAMP molekul pro aktivaci imunitní odpovědi byl popsán na základě *in vitro* experimentů (Fucikova et al., 2011; Fucikova et al., 2014; Garg et al., 2012b; Obeid et al., 2007b) a *in vivo* zvířecích modelů (Apetoh et al., 2008; Krysko et al., 2012; Michaud et al., 2011). Z výsledků testování vyplývá stěžejní role CRT v konceptu ICD. Nicméně v nedávné době byla popsána také prognostická role CRT u některých maligních onemocnění (viz. prognostický význam kalretikulinu).

3.2.1 Role kalretikulínu v imunogenní buněčné smrti a v aktivaci imunitní odpovědi

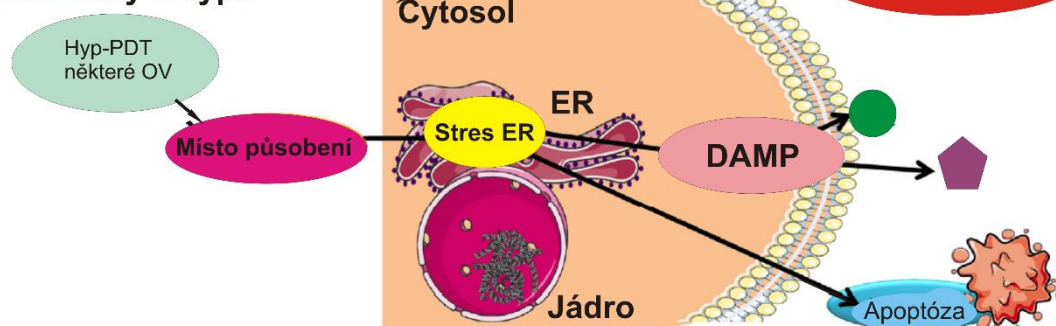
CRT představuje vysoce konzervovaný protein, který se nachází převážně v lumen ER, kde plní společně s ERp57 a kalnexinem významnou roli při skládání nově vzniklých proteinů a glykoproteinů. Současně se CRT podílí na regulaci homeostázi Ca^{2+} iontů, buněčné signalizaci, proliferaci a adhezi. Role CRT však není omezena pouze na výše popsané fyziologické procesy. CRT má také nezastupitelnou roli v aktivaci protinádorové imunitní odpovědi (Lu *et al.*, 2015).

Imunogenní vlastnosti CRT byly popsány v roce 2007, kdy Obeid a kolegové ukázali, že po vystavení neoplastických buněk antracyklinům, UV-C (z angl. ultraviolet C) a γ -záření dochází k pre-apoptické expozici CRT na buněčný povrch. Tyto imunogenní nádorové buňky poté byly lépe pohlcovány populací DC (Obeid *et al.*, 2007a; Obeid *et al.*, 2007b). Později bylo popsáno, že i další modality, mezi které patří hypericinem navozená fotodynamická smrt, vysoký hydrostatický tlak (HHP, z angl. high hydrostatic pressure) a oxaliplatin, jsou schopné indukovat transport CRT na povrch maligních buněk a vyvolat tak následnou aktivaci nádorově specifické T lymfocytární odpovědi (Fucikova *et al.*, 2014; Garg *et al.*, 2012a; Tesniere *et al.*, 2010). Modality schopné navodit ICD dělíme do 2 skupin dle mechanismu navození imunogenní apoptózy. První skupina induktorů (induktory I. typu) aktivuje ICD působením na cytosolické proteiny, proteiny plazmatické membrány či DNA a DNA replikační proteiny. Druhá skupina induktorů (induktory II. typu) aktivuje ICD přímým působením na ER (Obr. 4).

Induktory I. typu



Induktory II. typu



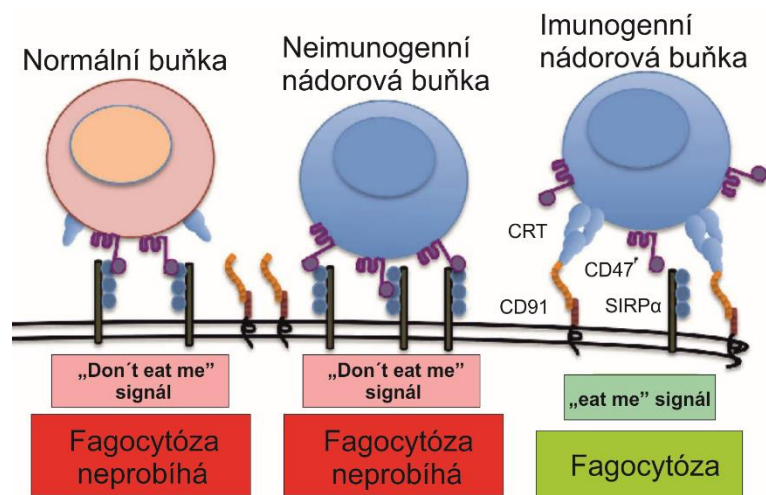
Obr. 4. Induktory imunogenní buněčné smrti I. a II. typu: Induktory I. typu vyvolávají buněčnou smrt přes buněčné cíle, které nejsou přímo asociované s endoplazmatickým retikulem (ER) a signalizační dráhou stresu ER. Naopak induktory II. typu cílí přímo na ER a aktivují tak signalizační dráhu spojenou se stresem ER. Seznam zkratk: CG (z angl. cardiac glycosides), CTX (z angl. cyclophosphamid), DAMP (z angl. damage (danger) associated molecular patterns), DOXO (z angl. doxorubicin), ER (z angl. endoplasmatic reticulum), HHP (z angl. high hydrostatic pressure), Hyp-PDT (z angl. hypericin-based photodynamic therapy), IRR (z angl. radiation), MTA (z angl. microwave thermal ablation), MTX (z angl. mitoxantrone), OV (z angl. oncolytic viruses), OXP (z angl. oxaliplatin), PAT (z angl. patupilone), RLH-L (z angl. RIG-I-like helicase ligand), Sep (septacidin), UVC (z angl. ultraviolet C). Převzato a upraveno podle (Garg et al., 2015a).

Nejlépe prostudovaná signální dráha popisující translokaci CRT na buněčný povrch je dráha indukovaná působením chemoterapeutik (induktory I. typu). V tomto případě dochází k indukci stresu ER, který je charakterizovaný nadprodukcí reaktivních kyslíkových radikálů (ROS, z angl. reactive oxygen species), narušením homeostázy Ca^{2+} a aktivací PERK kinázy (z angl. protein kinase R (PKR)-like endoplasmatic reticulum kinase). Aktivovaná PERK kináza, klíčová komponenta UPR signální dráhy (z angl. unfolded protein response), v odpovědi na vyvolaný stres fosforyluje eukaryotický translační iniciační faktor 2 α (eIF2 α , z angl. eukaryotic translation initiation factor 2A). V důsledku intenzivního buněčného stresu je aktivována kaspáza-8, která zprostředkovává proteolytické štěpení proteinu BAP31 (z angl. B-cell

receptor-associated protein 31) a aktivuje pro-apoptotické proteiny BAX a BAK. Výsledkem těchto procesů je anterográdní transport CRT ve vazbě na disulfid isomerázu ERp57 z lumen ER do Golgiho aparátu a exocytóza CRT na buněčný povrch (Panaretakis *et al.*, 2009).

Expozice CRT na buněčný povrch maligních buněk má zásadní význam v aktivaci protinádorově specifické imunitní odpovědi. CRT představuje tzv. „eat me“ signál (v překladu: „sněž mě“), který je schopen indukovat odstranění apoptotických tělísek a současně aktivovat imunitní systém (Li *et al.*, 2003). CRT vystavený na povrchu maligních buněk se váže na řadu receptorů na povrchu profesionálních fagocytů a interaguje s různými proteiny, mezi které patří: trombospodin (Orr *et al.*, 2003), komponenta komplementu 1q (C1q, z angl. complement component 1q) (Ogden *et al.*, 2001), lektin vázající manózu (Ogden *et al.*, 2001) či protein příbuzný receptoru LDR (LRP, z angl. LDL receptor-related protein, neboli CD91). Po vazbě na tyto molekuly dochází k aktivaci Rac-1 a pohlcení apoptotických tělísek, což stimuluje efektivní odstranění buněk s vystaveným CRT. Po pohlcení nádorových buněk populací APC, zejména DC, dochází k prezentaci nádorových antigenů na molekulách MHC a k indukci protinádorově specifické imunitní odpovědi (Gardai *et al.*, 2005). Vazba CRT na molekulu CD91 na povrchu DC navíc spouští NF- κ B signalizaci a produkci prozánětlivých cytokinů, jako je TNF- α (z angl. tumor necrosis factor alpha), IL-6, IL-1 β a IL-12. To ve výsledku vede k aktivaci Th17 buněčné odpovědi (Pawaria and Binder, 2011).

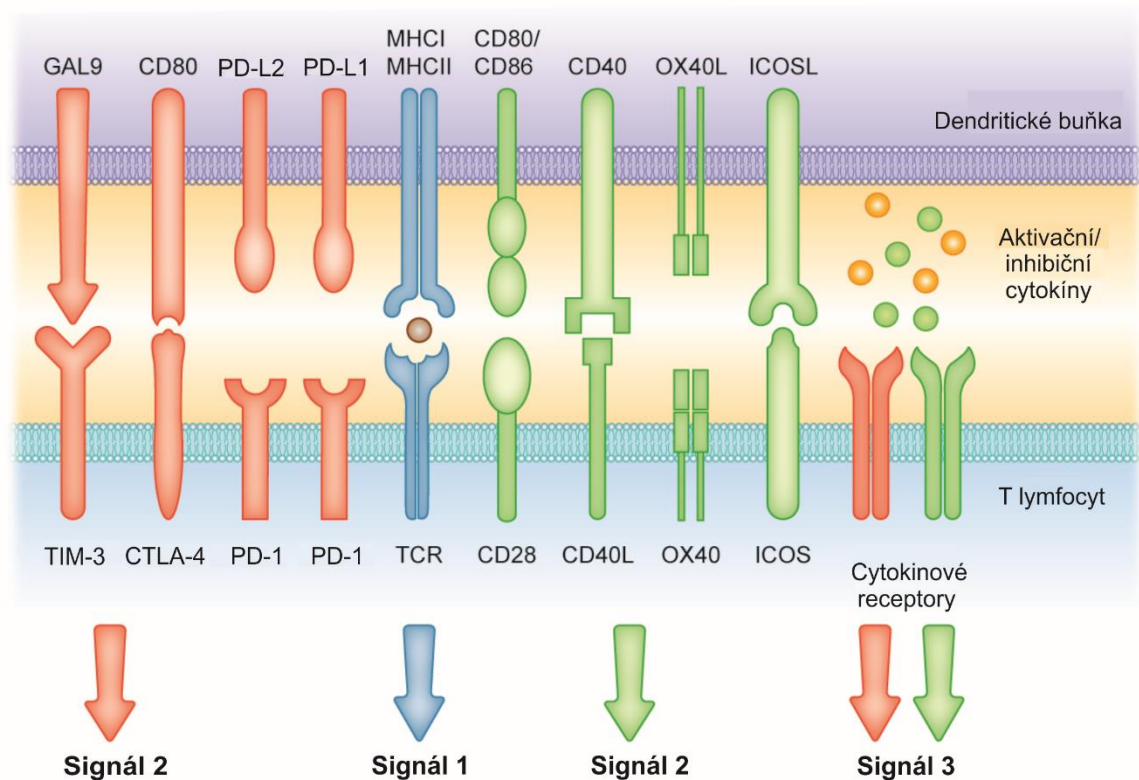
Fagocytóza může být blokována přítomností tzv. „don't eat me“ (v překladu „nejez mě“) signálů, např. molekulou CD47 (Chao *et al.*, 2010). Zvýšení exprese této molekuly na povrchu nádorových buněk představuje jeden z únikových mechanismů maligních buněk před dohledem imunitního systému. Význam této molekuly dokumentují výsledky preklinické studie, kde byla obnovena schopnost fagocytózy po blokaci molekuly CD47 pomocí specifické protilátky (Raghavan *et al.*, 2013). Z těchto výsledků vyplývá, že rovnováha exprese mezi signály „eat me“ a „don't eat me“ určuje, zda dojde k fagocytóze buněk či nikoliv (Obr. 5) (Wiersma *et al.*, 2015).



Obr. 5. Regulace fagocytózy. Fagocytóza maligních buněk je řízena vystavováním tzv. „eat me“ a „don't eat me“ signálů. Zdravé buňky za fyziologických podmínek a neimunogenní nádorové buňky exprimují zejména „don't eat me“ signál – molekulu CD47. Molekula CD47 se váže na receptor SIRPα na povrchu fagocytů, což blokuje proces fagocytózy. Oproti tomu imunogenní nádorové buňky vykazují vysokou expresi povrchového kalretikulínu (CRT), který po vazbě na receptor CD91 stimuluje fagocytózu. Seznam zkratk: CRT (z angl. calreticulin), SIRPα (z angl. signal regulatory protein α). Převzato a upraveno podle (Wiersma et al., 2015).

3.3 Mechanismus odstranění nádorových buněk imunitním systémem

V procesu rozpoznání a následném odstranění nádorových buněk spolupracují složky vrozené i adaptivní imunity. Nádorové buňky, které na svém povrchu nesou nádorově specifické nebo asociované antigeny, popřípadě vystavují či uvolňují molekuly DAMP, jsou rozpoznány složkami přirozené imunity, zejména populací DC. Stimulační podněty u těchto buněk spustí proces vyžívání, v jehož důsledku se z nich stávají plně aktivované buňky schopné prezentace antigenu na povrchu MHC molekul. Rozpoznání antigenního fragmentu vázaného na MHC molekulách poskytuje T lymfocytům první aktivační signál. Pro kompletní aktivaci musí být tento signál doplněn o druhý a třetí signál, které zajišťují kostimulační molekuly a cytokinové prostředí. Klíčovou kostimulační interakci představuje vazba receptoru CD28 na povrchu T lymfocytu a molekul CD80 či CD86 na povrchu APC (Gutcher and Becher, 2007) (Obr. 6).



Obr. 6. Klíčové signály v aktivaci T lymfocytární odpovědi. První signál představuje prezentaci antigenního peptidu v kontextu molekul MHC I a II. třídy na povrchu antigen prezentující buňky (APC). Antigen je rozpoznán T buněčným receptorem (TCR) na povrchu T lymfocytů (modrá šipka). Druhý signál představuje stabilizaci imunologické synapse prostřednictvím adhezivních molekul a poskytnutí kostimulačního signálu, který představuje vazbu kostimulační molekuly na povrchu APC s receptory na povrchu T lymfocytů. Kostimulační molekuly patřící do rodiny B7 a TNF poskytují pozitivní signalizaci (zelená šipka). Naopak CTLA-4, PD-1, TIM-3 poskytují negativní signalizaci (červená šipka). Třetí signál je zprostředkován produkcí cytokinů populací APC, které napomáhají výsledné polarizaci imunitní odpovědi. Seznam zkratk: APC (z angl. antigen presenting cells), CTLA-4 (z angl. cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4), GAL9 (z angl. galectin-9), ICOS (z angl. inducible T-cell costimulator), ICOSL (z angl. inducible T-cell costimulator-ligand), MHC (z angl. major histocompatibility complex), PD-1 (z angl. programmed death 1), PD-L1 (z angl. programmed death-ligand 1), TCR (z angl. T-cell receptor), TIM-3 (z angl. T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3), TNF (z angl. tumor necrosis factor). Převzato a upraveno podle (Fucikova et al., 2019).

Zásadní roli v likvidaci nádorových buněk plní cytotoxické CD8⁺ T lymfocyty (CTL, z angl. cytotoxic T lymphocytes). Po rozpoznání maligních buněk dochází k aktivaci jejich cytotoxických mechanismů, které následně zajistí lýzu cílových buněk. Jedná se zejména o tyto mechanismy: a) degranulaci cytotoxických granulí, které obsahují perforin a granzymy. Perforin způsobí permeabilizaci membrány a granzymy (tj. proteázy), následně aktivují

apoptózu pomocí štěpení kaspáz (Berke, 1994); b) interakci mezi Fas-ligandem (FasL, z angl. Fas ligand) na povrchu CTL a Fas receptorem (CD95) na povrchu maligních buněk spouští kaskádu vedoucí k apoptotické smrti cílové buňky (Lynch *et al.*, 1995); c) působení cytokinu TNF- β (z angl. tumor necrosis factor beta) (Horejší *et al.*, 2017)

Významnou roli v procesu likvidace abnormálních buněk hrají také NK buňky (z angl. natural killer) a makrofágy. NK buňky rozpoznávají nádorové buňky díky nízké expresi MHC glykoproteinu I. třídy. Zda dojde k aktivaci NK buněk nebo k jejich inhibici, je výsledkem poměru aktivačních a inhibičních signálů, které obdrží přes patřičné receptory na svém povrchu (Bauer *et al.*, 2017). Mezi aktivační receptory řadíme například NCR (z angl. natural cytotoxicity triggering receptors; tj. NKp30, NKp44, NKp46 a NKp80), receptory rodiny SLAM (např. 2B4 a NTB-A), lektiny typu C (např. NKG2D a NKG2C/CD94) a nízkoafinitní Fc receptor pro IgG (Fc γ RIII neboli CD16) (Lanier, 2005). CD16 se od ostatních aktivačních receptorů liší tím, že nerozpoznává ligand na povrchu cílových buněk, nýbrž Fc část IgG protilátek. Pokud se CD16 molekuly naváží na Fc části protilátek (např. pokud je cílová buňka opsonizovaná IgG protilátkami), dojde k agregaci receptorů, což vyvolá dostatečně silný signál k překonání inhibičních signálů. Výsledkem je aktivace cytotoxické reakce závislé na protilátkách (Long *et al.*, 2013). Naopak inhibice NK buněk je řízena řadou inhibičních receptorů imunoglobulinového typu (KIR, z angl. killer inhibitor receptors), C-lektinového typu (např. CD94/NKG2) nebo leukocytového typu (LILR, z angl. leukocyte immunoglobulin-like receptors). Ligandy pro inhibiční molekuly jsou MHC molekuly I. třídy (Davis *et al.*, 2017).

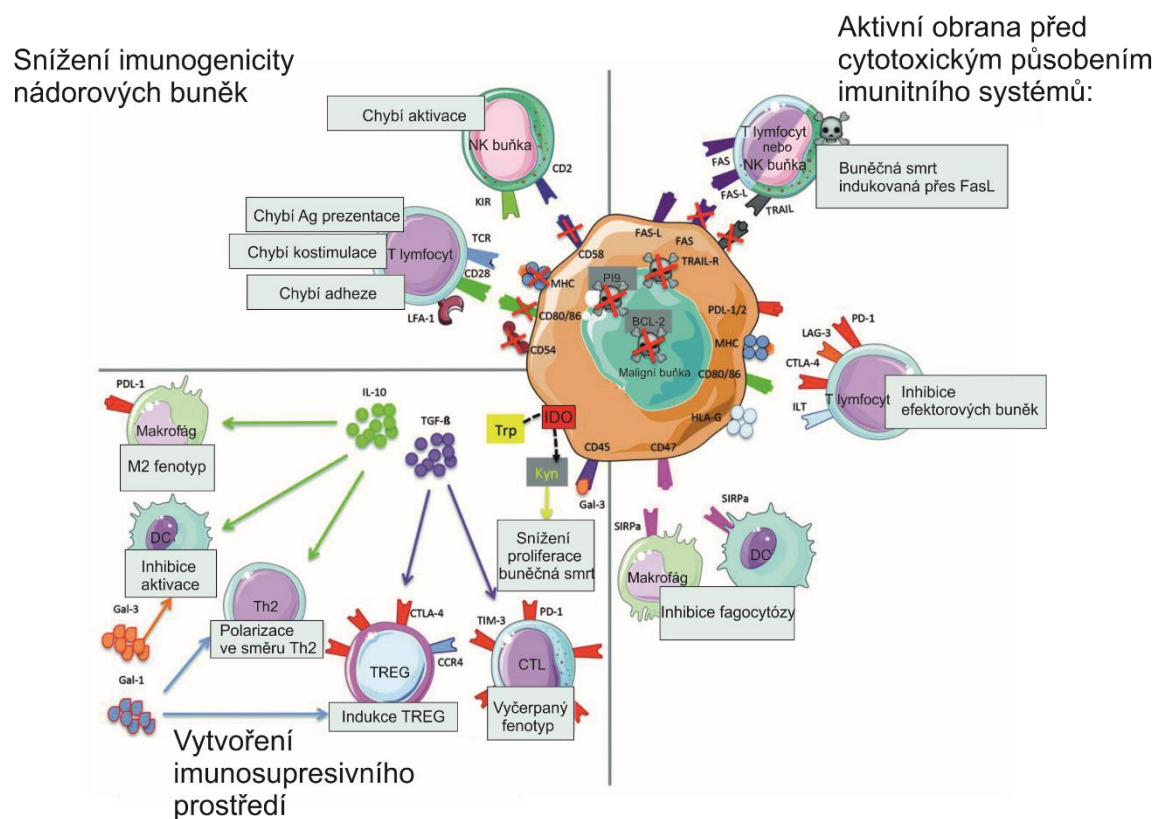
V cytoplazmě NK buněk podobně jako v cytoplazmě CTL se nacházejí granula obsahující perforin a granzymy schopné indukovat apoptózu cílové buňky. Kromě lytické funkce jsou NK buňky schopné produkovat řadu zánětlivých cytokinů (TNF- α a IFN- γ) (Cooper *et al.*, 2001) a růstových faktorů (G-CSF, z angl. granulocyte colony stimulating factor a GM-CSF, z angl. granulocyte-macrophage colony stimulating factor) (Vivier *et al.*, 2011).

Makrofágy asociované s nádory (TAM, z angl. tumor-associated macrophage) mohou růst nádoru potlačovat, anebo podporovat, a to podle toho, zda jsou aktivované klasickou dráhou, na které se podílejí Th1 buňky (z angl. T helper type 1), IFN- γ a ligandy toll-like receptorů (TLR, z angl. Toll-like receptors), nebo aktivitou Th2 buněk (z angl. T helper type 2) (tj. v reakci na cytokiny produkované Th2 buňkami – zejména IL-4 a IL-13). Makrofágy, které jsou aktivovány klasickou cestou (tj. prostřednictvím CD40L-CD40 interakcí s Th1 buňkami a působením IFN- γ), označujeme jako M1 makrofágy. M1 makrofágy se podílejí na produkci prozánětlivých cytokinů (IL-12, IFN- γ či TNF- α), prezentaci antigenu, produkci ROS a jsou schopné eliminovat nádorové buňky působením lysozomálních enzymů a oxidu dusného. M2

makrofágy, které jsou aktivovány vlivem cytokinů IL-4, IL-10 a IL-13, mají výrazný protizánětlivý charakter. Za fyziologických okolností se podílejí na reparačních procesech. Růst nádoru podporují produkcí protizánětlivých cytokinů (IL-10 či TGF- β , z angl. tumor necrosis factor), růstových faktorů (VEGF) a podporou angiogeneze (Martinez *et al.*, 2013).

3.4 Mechanismy úniku nádorových buněk imunitnímu systému

Nádorové buňky disponují řadou mechanismů, kterými se snaží uniknout dohledu imunitního systému. Tyto mechanismy lze obecně shrnout do 3 kategorií: a) snížení imunogenicity nádorových buněk, b) aktivní obrana před cytotoxickým působením imunitního systému, c) vytvoření imunosupresivního prostředí (Obr. 7).



Obr. 7. Mechanismy úniku nádorových buněk před dohledem imunitního systému. a) Snížení imunogenicity nádorových buněk: maligní buňky snižují nebo dokonce ztrácejí expresi molekul MHC tak, že nejsou následně rozpoznány cytotoxickými T lymfocyty (CTL). Dále mezi tyto mechanismy řadíme ztrátu kostimulačních molekul (CD80/CD86) a adhezivních molekul (CD54) nebo „maskování“ povrchových antigenů molekulami glykokalyxu. b) Aktivní obrana před cytotoxickým působením imunitního systému: maligní buňky mohou samy aktivně využívat buněčné systémy, aby zabránily imunitnímu systému v jejich rozpoznání a likvidaci. Mezi tyto mechanismy patří rezistence vůči apoptotickým signálům (např. zvýšením exprese anti-apoptického proteinu BCL-2), inhibice T lymfocytární odpovědi přítomností PD-L1/PD-L2 na povrchu maligních buněk. Fagocytóza nádorových buněk může být blokována produkcí anti-

fagocytického signálu CD47, který interaguje na povrchu dendritických buněk (DC) a makrofágů s ligandem SIRPα. Nádorové buňky mohou také sami vystavovat FasL a vyvolávat apoptózu imunitních buněk. c) Vytvoření imunosupresivního prostředí: maligní buňky mají schopnost produkovat imunosupresivní cytokiny, např. IL-10 a TGF-β, a molekuly, které imunitní odpověď ovlivňují, tlumí nebo zcela inhibují, popřípadě způsobují, že do nádorového mikroprostředí budou atrahovány imunosupresivní subpopulace. IL-10 je schopen inhibovat aktivaci DC, podporuje diferenciaci Th2 lymfocytů, regulačních T lymfocytů (TREG) a M2 makrofágů. TGF-β je schopen vyvolat u cytotoxických lymfocytů (CTL) vyčerpaný fenotyp a indukuje diferenciaci TREG. Indolamin 2,3 dioxygenáza (IDO) degradací tryptofanu (Trp) a produkci kynureninu (Kyn) potlačuje CTL a imunitní odpověď NK buněk. Seznam zkratk: Ag (z angl. antigen), CTL (z angl. cytotoxic T lymphocyte), CTLA-4 (z angl. cytotoxic T lymphocyte antigen 4), DC (z angl. dendritic cell), FasL (z angl. Fas ligand), Gal (z angl. galectin), IDO (z angl. indoleamine 2,3-dioxygenase), IL (z angl. interleukin), ILT2 (z angl. human inhibitory receptors Ig-like transcript 2), Kyn (z angl. kynurenine), LAG-3 (z angl. lymphocyte activation gene-3), MHC (z angl. major histocompatibility complex), NK (z angl. natural killer), PD-1 (z angl. programmed cell death 1), PD-L1 (z angl. programmed death-ligand 1), PD-L2 (z angl. programmed death-ligand 2), SIRPα (z angl. signal regulatory protein α), TCR (z angl. T-cell receptor), TGF-β (z angl. tumor growth factor), Th2 (z angl. T helper type 2), TIM-3 (z angl. T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3), TRAIL (z angl. TNF-related apoptosis-inducing ligand), TREG (z angl. regulatory T cells), Trp (tryptophan). Převzato a upraveno podle (de Charette and Houot, 2018).

3.4.1 Snížení imunogenicity nádorových buněk

Mezi mechanismy snížení imunogenicity nádorových buněk patří zejména snížení či ztráta exprese nádorových antigenů a molekul MHC glykoproteinů I. třídy (de Charette and Houot, 2018).

Pod tlakem imunitního systému u nádorových buněk často vznikají nové fenotypové varianty, které ztrácí původní nádorové antigeny, jež byly cílem předchozí imunitní reakce. Snížení hustoty exprese nádorových antigenů vede k tomu, že jsou imunitním systémem ignorovány (Horejsi *et al.*, 2017). Nádorové antigeny mohou být také exprimovány tak, že nejsou imunitním systémem rozpoznatelné, jsou tzv. „maskované“ molekulami glykokalyxu (Stastny and Rihova, 2015).

Populace CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocytů rozpoznávají maligní buňky jedině tehdy, pokud vystavují antigeny na povrchu MHC molekul. Ztrátou exprese MHC molekul se nádorová buňka stává pro imunitní systém téměř neviditelnou. Kromě tohoto mechanismu, kdy nádorové buňky snižují nebo mění expresi MHC molekul, jsou schopné také ovlivňovat expresi pouze některých transmembránových podjednotek MHC molekul (β2 mikroglobulinu) nebo transportérů, které zajišťují přechod zpracovaných peptidů z proteazomu do ER (Stastny and Rihova, 2015). Snížení imunogenicity maligních buněk doprovází také snížení exprese kostimulačních a adhezivních molekul, což v důsledku znemožňuje kompletní odstranění maligních buněk (de Charette and Houot, 2018).

3.4.2 Aktivní obrana před cytotoxickým působením imunitních buněk

Nádorové buňky se mohou stát odolné vůči cytotoxickému působení složek imunity navozením rezistence vůči apoptóze či zvýšením exprese inhibičních molekul, které deaktivují efektorové buňky imunitního systému (de Charette and Houot, 2018).

Mezi mechanismy zajišťující rezistenci nádorových buněk vůči apoptóze patří zejména snížení exprese Fas receptoru, což znemožní vazbu na FasL na povrchu efektorových T lymfocytů. Podobně nádorové buňky zneužívají také interakce mezi ligandem TRAIL (z angl. TNF-related apoptosis-inducing ligand) a receptorem TRAIL či zvýšení exprese BCL-2, anti-apoptického proteinu, který je zodpovědný za regulaci apoptózy (de Charette and Houot, 2018).

Kromě pozitivní signalizace při níž se z naivních T buněk stávají imunologicky aktivní cytotoxické T buňky, existuje také celá řada inhibičních receptorů a jejich ligandů, které přispívají k imunologické homeostáze. Ta zabraňuje poškození zdravých tkání a orgánů v důsledku nepřiměřené imunitní reakce. Mezi nejdůležitější molekuly, které zajišťují tuto zpětnovazebnou regulaci a útlum efektorových mechanismů imunity, patří: receptor PD-1 (z angl. programmed cell death 1), PD-L1 (z angl. programmed death-ligand 1), CTLA-4 (z angl. cytotoxic T lymphocyte antigen 4), LAG-3 (z angl. lymphocyte activation gene-3) a TIM-3 (z angl. T-cell immunoglobulin mucin 3). Maligní buňky jsou schopné „zneužít“ exprese těchto molekul pro lokální útlum T buněčné imunitní odpovědi v TME a indukovat tak lokální imunosupresi a progresi nádorového onemocnění (Stastny and Rihova, 2015).

Nejlépe popsané je zvýšení exprese PD-L1 ligandu na povrchu nádorových buněk. Zvýšení exprese ligandu PD-L1 na nádorových buňkách může být výsledkem jednak genetické či epigenetické modifikace, anebo adaptivní odpovědi, např. na přítomnost některých cytokinů (IFN- γ , TGF- β , TNF- α nebo IL-17). Pokud dojde k navázání tohoto ligandu na receptor PD-1 na povrchu CD8⁺ T lymfocytů, dochází k navození imunitní rezistence, která je charakterizována vyčerpáním a inhibicí efektorových funkcí T lymfocytů a produkcí imunosupresivního cytokinu IL-10. Vyčerpané efektorové T lymfocyty sice rozpoznávají antigen, ale nejsou schopné cytotoxické reakce, a v důsledku toho následně dochází k progresi nádorového onemocnění (Sun *et al.*, 2015). Inhibiční receptor PD-1 není exprimován pouze na tumor infiltrujících lymfocytech, ale také na povrchu dalších imunokompetentních buněk, poté co dojde k jejich aktivaci (aktivované T buňky, B buňky, NK buňky, NKT buňky (z angl. natural killer T), DC, aktivované monocyty) (Bauer *et al.*, 2018); (Dyck and Mills, 2017; Rozali *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2015).

PD-L1 může interagovat také s dalšími molekulami, mezi které patří například molekula CD80, která je exprimována jak na aktivovaných T lymfocytech, tak na APC, což dále přispívá k negativní regulaci aktivace efektorových T lymfocytů. PD-L1 navíc může být přítomný také na supresivních imunitních subpopulacích např. na myeloidních supresorových buňkách (MDSC, z angl. myeloid-derived suppressor cell) nebo v solubilní podobě v plazmě pacientů s nádorovým onemocněním (Bauer *et al.*, 2018).

CTLA-4 představuje důležitý negativní regulátor imunitní odpovědi, který vykazuje strukturální podobnost s receptorem CD28 a váže stejné ligandy, avšak s větší afinitou a aviditou (Zou and Chen, 2008). Je důležitým kontrolním bodem, který určuje trvání a intenzitu imunitní reakce tím, že negativně reguluje funkci efektorových T lymfocytů. Na druhou stranu je však také spojen s potlačením aktivace specifické protinádorové CD8⁺ T lymfocytární odpovědi (Buchbinder and Desai, 2016), pozitivně přispívá k proliferaci regulačních T lymfocytů (TREG, z angl. regulatory T cells) a zesiluje jejich imunosupresivní působení v nádorové tkáni. Z výsledků klinického hodnocení vyplývá, že část protinádorového působení protilátek anti-CTLA-4 je zprostředkováno inhibicí imunosupresivní aktivity TREG (Pardoll, 2012).

Aktivační gen lymfocytů-3 (LAG-3) představuje další kontrolní bod imunitních reakcí. Jeho exprese byla prokázána na populaci CD4⁺ T lymfocytů, cytotoxických CD8⁺ T lymfocytů, ale i na NK buňkách, plazmacytoidních DC a B lymfocytech (Goldberg and Drake, 2011). Hlavním ligandem LAG-3 jsou molekuly MHC II. třídy (Huard *et al.*, 1995). Funkce LAG-3 spočívá v inhibici efektorových CD8⁺ T lymfocytů a zvýšení funkční aktivity TREG (Bauer *et al.*, 2018).

Molekula TIM-3 (T buněčná doména obsahující imunoglobulin a mucin 3), jejímž ligandem je galactin 9, představuje další klíčový regulátor imunitních reakcí. Tato molekula je exprimována na řadě imunitních buněk včetně CD4⁺ T lymfocytů a CD8⁺ T lymfocytů (Das *et al.*, 2017). Interakce mezi galektinem-9 na nádorových buňkách a TIM-3 spouští buněčnou smrt Th1 buněk a CD8⁺ T lymfocytů infiltrujících nádor (Das *et al.*, 2017). Přítomnost molekuly TIM-3 v TME stimuluje imunosupresivní účinek TREG (Bauer *et al.*, 2018). Z výsledků studie Sakuishi a kolegové vyplývá, že současná exprese molekul TIM-3 a PD-1 na CD8⁺ T lymfocytech představuje znak hluboce vyčerpaných, dysfunkčních T buněk. Tento stav je charakterizován selháním proliferace a produkce cytokinů (např. IL-2, TNF a IFN- γ) (Sakuishi *et al.*, 2010).

3.4.3 Navození imunosupresivního prostředí

Nádor je schopný vytvářet pro svůj růst a progresi optimální imunosupresivní prostředí. Maligní buňky produkují imunosupresivní cytokiny a molekuly, které ovlivňují imunitní reakci, tlumí nebo zcela inhibují funkci T buněk, popřípadě vyvolávají infiltraci subpopulací imunitních buněk, které toto prostředí dále podporují produkcí vlastních imunosupresivních cytokinů a chemokinů. Mezi tyto imunosupresivní subpopulace buněk patří TREG, M2 makrofágy, neutrofilů asociované s nádorem, DC asociované s nádorem, regulační B lymfocyty a MDSC. Imunosupresivní působení těchto buněk v TME mohou dále usnadňovat další složky TME, jako jsou např. stromální buňky, fibroblasty asociované s nádorem či s nádorem spojené adipocyty. Veškeré zmíněné buňky, ať již ty nádorové, nebo nenádorové, tlumí rozpoznávací i cytotoxické funkce efektorových imunitních populací, podporují růst maligních buněk a usnadňují tak únik nádorových buněk z dohledu imunitního systému (Bauer *et al.*, 2018).

Nejvýznamnější skupinou buněk se supresivními vlastnostmi jsou TREG. Zvýšené zastoupení TREG v TME je způsobeno několika mechanismy: a) migrací ovlivněnou chemokiny, které jsou produkovány nádorovými buňkami (např. CCL17, CCL5, CCL28, CXCL9, CXCL10 a CXCL11) (z angl. C-C motif chemokine), b) přeměnou z naivních T lymfocytů, působením imunosupresivních cytokinů (TGF- β , IL10) nebo protizánětlivých mediátorů aIDO (z angl. indoleamine 2,3 dioxygenase), c) expanzí TREG, které se již vyskytovaly v TME. TREG přítomné v nádoru produkují řadu supresivních faktorů, zejména IL-10 a TGF- β , které udržují supresivní mikroprostředí a inhibují efektorové T lymfocyty (Stastny and Rihova, 2015).

Mezi další supresivní buněčné subpopulace asociované s nádory patří M2 makrofágy a MDSC. M2 makrofágy tlumí T buněčně specifickou odpověď zejména produkcí prostaglandinu E2, IL-10, TGF- β a VEGF, které podporují neoangiogenezi a urychlují růst maligní tkáň (Mantovani and Sica, 2010). MDSC představují populaci buněk tvořenou zejména myeloidními prekurzory a nezralými myeloidními buňkami, které nejsou schopné se za patologických podmínek diferencovat ve zralé myeloidní buňky. MDSC potlačují T buněčnou odpověď především produkcí cytokinu IL-10, volných radikálů (např. peroxytril) aIDO, tím podporují vývoj TREG, ovlivňují diferenciaci T buněk ve směru Th2 fenotypu s omezeným protinádorovým účinkem (Stastny and Rihova, 2015).

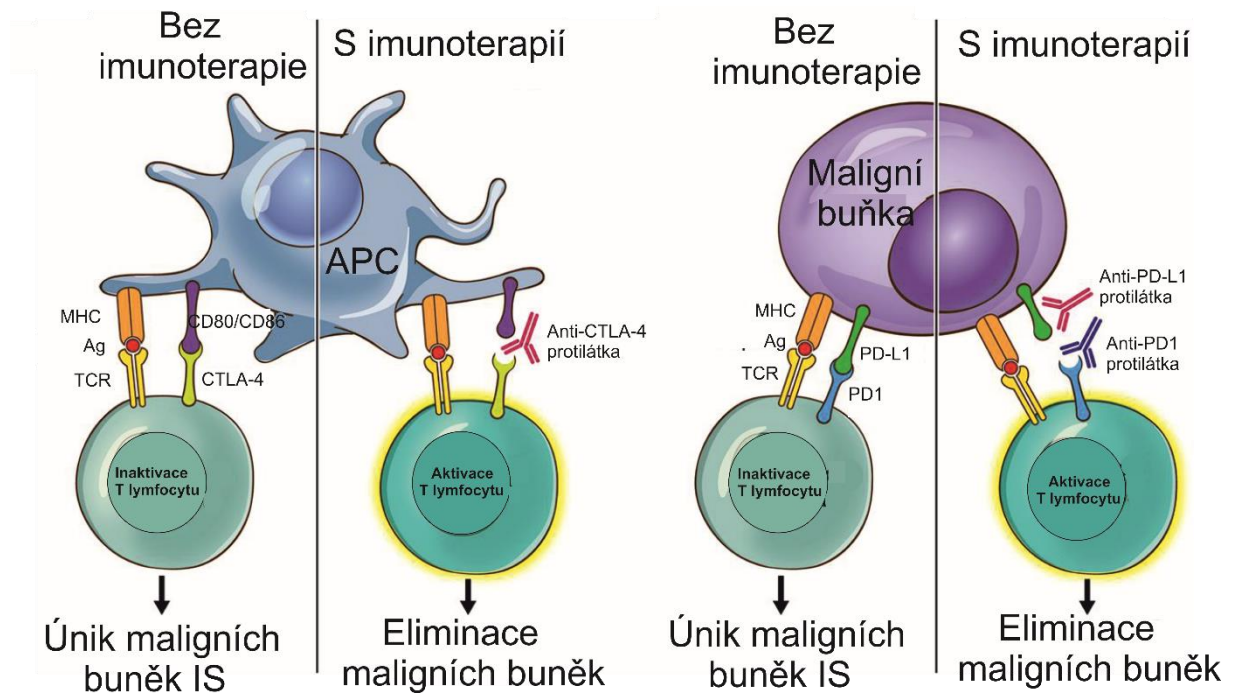
Nádorové buňky jsou schopné také inhibovat protinádorové funkce DC pomocí produkce inhibičních cytokinů (IL-10, TGF- β) a přítomností prostaglandinu E2. Tím dochází k inhibici jejich aktivace a prezentace nádorových antigenů populaci CTL (Vicari *et al.*, 2002).

4 Imunoterapie

Z výsledků preklinického a klinického testování vyplývá, že imunitní systém hraje zásadní roli v rozpoznání maligních buněk a v kontrole nádorového růstu. K rozvoji imunoterapie maligních onemocnění došlo především díky porozumění mechanismu interakce mezi nádorovými buňkami a složkami imunity. Imunitní systém je schopen kontrolovat růst neoplastických buněk převážně v raných stádiích karcinogeneze (Bartunkova *et al.*, 2015). V pokročilých stádiích tumorigeneze mohou být imunitní kontrolní mechanismy utlumeny, a dokonce mohou proliferaci nádorových buněk podporovat, jak je zmíněno v předchozí kapitole. Cílem moderní imunoterapie je překonat ty mechanismy, které inhibují protinádorovou imunitu, a to posílením, navozením nebo potlačením vrozených nebo adaptivních imunitních odpovědí (Bartunkova *et al.*, 2015). Mezi imunoterapeutické přístupy testované v klinických studiích u karcinomu ovaria patří metody jak pasivní, tak aktivní imunizace (Mantia-Smaldone *et al.*, 2012). V pokročilé fázi klinického testování v terapii karcinomu vaječníků jsou zejména protilátky proti kontrolním bodům imunitních reakcí a buněčně zprostředkovaná imunoterapie na bázi DC, kterým se podrobněji věnují následující kapitoly.

4.1 *Inhibitory kontrolních bodů imunitních reakcí v léčbě maligních onemocnění*

Využití inhibitorů kontrolních bodů imunitních reakcí v léčbě nádorových onemocnění představuje jeden z nejnovějších směrů imunoterapeutické léčby. Cílem této léčby je obnovit či zesílit specifickou protinádorovou reakci pacienta pomocí monoklonálních protilátek, které svou vazbou na příslušný receptor (PD-1, CTLA-4) nebo ligand (PD-L1) zamezí utlumení či úplnému odstranění nádorově specifických T lymfocytů (Tsai and Hsu, 2017). Mluvíme o tzv. blokování kontrolních bodů imunitní reakce (Obr. 8).



Obr. 8. Mechanismus účinku protilátek blokujících inhibiční molekuly. Aktivace T buněk vyžaduje 3 signály. 1. signál představuje vazba T buněčného receptoru (TCR) na antigen v kontextu s hlavním histokompatibilním komplexem (MHC). 2. signál představuje vazba mezi CD80/CD86 na antigen prezentující buňce (APC) s CD28 kostimulačním receptorem na T buňkách. 3. signál pak představuje produkce cytokinů APC. Pokud dojde k navázání receptoru CTLA-4, inhibičního homologu receptoru CD28, na molekuly CD80/CD86 dochází k inhibici T buněčné aktivace. Použitím monoklonální protilátky proti CTLA-4 (tzv. anti-CTLA-4 monoklonální protilátka), zabráníme interakci CTLA-4 s CD80/CD86, což umožní navození opětovné aktivace T lymfocytů. Interakce mezi PD-1 receptorem na povrchu T lymfocytů s ligandem PD-L1 na povrchu maligních buněk vede ke snížení produkce cytokinů a transkripčních faktorů (GATA3 a TBET). Použitím monoklonální protilátky proti PD-1/PD-L1 jsme schopni obnovit efektorové funkce T lymfocytů. Seznam zkratk: Ag (z angl. antigen), APC (z angl. antigen presenting cell), CTLA-4 (z angl. cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4), GATA3 (z angl. GATA Binding Protein 3), MHC (z angl. major histocompatibility complex), PD-1 (z angl. programmed cell death 1), PD-L1 (z angl. programmed death-ligand 1), TCR (z angl. T-cell receptor). Převzato a upraveno podle (Soularue et al., 2018).

Ipilimumab představuje registrovanou humánní monoklonální protilátku třídy IgG1 proti molekule CTLA-4. Mechanismus účinku této protilátky spočívá ve vazbě na inhibiční molekulu CTLA-4, čímž je znemožněna její interakce s ligandem CD80/CD86. Molekuly CD80 a CD86 exprimované na povrchu APC se tak mohou vázat na aktivační molekulu T lymfocytů, receptor CD28, což vede k zesílení efektorových funkcí T buněk. Kromě stimulačního vlivu na efektorové T lymfocyty snižuje tato protilátka také počet i aktivitu TREG v TME (Li et al., 2018; Li et al., 2016; Pardoll, 2012). Ipilimumab byl schválen FDA (z angl. food and drug administration) pro léčbu melanomu na základě studie fáze III (ClinicalTrials.gov identifikátor: NCT00094653), jejíž výsledky byly publikované v roce 2010. Tato studie byla multicentrická, randomizovaná a dvojitě zaslepená. Zúčastnilo se jí celkem

676 pacientů s metastatickým melanomem, u kterých selhal minimálně jeden terapeutický přístup. Medián přežití pacientů v léčeném rameni byl 10 měsíců oproti 6,4 měsícům v kontrolním rameni (Hodi *et al.*, 2010).

Pozitivní výsledky byly potvrzeny také v několika navazujících studiích fáze III na 502 pacientech s neresekovatelným pokročilým melanomem nebo s metastazujícím melanomem (ClinicalTrials.gov identifikátor: NCT00324155) (Robert *et al.*, 2011) a na 951 pacientech trpících melanomem ve stadiu III (EORTC 18071) (Eggermont *et al.*, 2015).

Další významnou skupinou léčiv založených na blokaci kontrolních bodů imunitní reakce jsou protilátky namířené proti receptoru PD-1 či jeho ligandu PD-L1. Mechanismus působení anti-PD-1 protilátek spočívá v inhibici interakce mezi inhibičním koreceptorem PD-1 exprimovaným na efektorových T buňkách a jeho ligandem PD-L1, respektive PD-L2 (z angl. programmed death-ligand 2), exprimovaným na nádorových buňkách. Tím dochází k zablokování imunosupresivní aktivity PD-1 signalizace. Klinickým vývojem prošly a pro klinické použití byly do současné chvíle schváleny dvě anti-PD-1 IgG4 monoklonální protilátky, a to nivolumab a pembrolizumab (Li *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2016; Pardoll, 2012). Tyto studie shrnuje Tab. 3.

Tab. 3. Přehled anti-PD-1 protilátek schválených FDA pro léčbu pacientů s onkologickým onemocněním pro uvedené indikace.

Nivolumab (Opdivo®)	Identifikační kód studie: NCT01721746
	Léčba inoperabilního nebo metastatického melanomu s progresí po léčbě ipilimumabem a BRAF inhibitory (mutovaný BRAF V600).
	Identifikační kód studie: NCT01721772
	Léčba inoperabilního nebo metastatického melanomu (mutovaný BRAF V600).
	Identifikační kód studie: NCT02388906
	Adjuvantní léčba u pacientů s melanomem s postižením lymfatických uzlin nebo u pacientů s metastatickým onemocněním, kteří podstoupili kompletní resekci.
	Identifikační kód studie: NCT01642004
	Léčba metastatického skvamózního NSCLC progredujícího po předchozí chemoterapii na bázi platiny.
	Identifikační kód studie: NCT0164200
	Léčba non-skvamózního NSCLC progredujícího po chemoterapii na bázi platiny; léčba pacientů s EGFR nebo ALK genomovou nádorovou aberací a progresí onemocnění při FDA-schválené terapii pro tyto aberace.
	Identifikační kód studie: NCT02387996
	Léčba lokálně pokročilého nebo metastatického uroteliálního karcinomu, který progredoval během nebo po chemoterapii na bázi platiny nebo do 12 měsíců od neoadjuvantní nebo adjuvantní chemoterapie na bázi platiny.
	Identifikační kód studie: NCT01668784
Léčba pokročilého RCC po předchozí léčbě anti-angiogenní terapií.	
Identifikační kódy studií: NCT01592370, NCT02181738	
Léčba klasického Hodgkinova lymfomu, který relaboval nebo progredoval po autologní transplantaci hematopoetických kmenových buněk a post-transplantační terapii brentuximabem vedotinem (Adcetris).	
Identifikační kód studie: NCT02105636	
Léčba rekurentního nebo metastatického SCCHN s progresí po léčbě platinovými deriváty.	

	<p>Identifikační kód studie: NCT02060188</p> <p>Léčba pacientů s deficitem v korekci správného párování bází (MMR, z angl. mismatch repair) a mikrosatelitovou nestabilitou, s vysoce metastazujícím kolorektálním karcinomem s progresí po léčbě fluoropyrimidinem, oxaliplatinou a irinotekanem.</p>	
	<p>Identifikační kód studie: NCT02105636</p> <p>Léčba rekurentního nebo metastatického SCCHN s progresí po terapii na bázi platiny.</p>	
	<p>Identifikační kód studie: NCT01658878</p> <p>Léčba hepatocelulárního karcinomu po předchozí léčbě sorafenibem.</p>	
Ipilimumab + Nivolumab	<p>Identifikační kód studie: NCT01927419</p> <p>Léčba inoperabilního nebo metastatického melanomu (nemutovaný BRAF V600).</p>	
	<p>Identifikační kód studie: NCT01844505</p> <p>Léčba neresekovatelného nebo metastatického melanomu bez ohledu výskyt mutace BRAF V600.</p>	
	<p>Identifikační kód studie: NCT02231749</p> <p>Léčba dříve neléčeného pokročilého RCC.</p>	
	<p>Identifikační kódy studií: NCT01866319, NCT01704287</p> <p>Rozšířené schválení pro terapii první linie pro léčbu neresekovatelného nebo metastatického melanomu.</p>	
	<p>Identifikační kód studie: NCT01848834</p> <p>Léčba rekurentního nebo metastatického HNSCC s progresí po chemoterapii na bázi platiny.</p>	
	<p>Identifikační kódy studií: NCT01905657, NCT02142738</p> <p>První linie terapie pro metastatický NSCLC s vysokou expresí PD-L1 bez genomových nádorových aberací EGFR nebo ALK a bez předchozí systémové chemoterapie pro metastazující NSCLC; rozšířená léčba 2. linie terapie pro metastatický NSCLC s expresí PD-L1 s progresí onemocnění během/po chemoterapii na bázi platiny, pacienti s genomovými nádorovými aberacemi EGFR nebo ALK.</p>	
	Pembrolizumab	<p>Identifikační kód studie: NCT01295827</p> <p>Léčba neresekovatelného nebo metastatického melanomu.</p>
		<p>Identifikační kód studie: NCT02039674</p> <p>Léčba dříve neléčeného metastatického non-skvamózního NSCLC v kombinaci s pemetrexedem a karboplatinou.</p>

Identifikační kód studie: NCT02453594

Léčba refrakterního klasického Hodgkinova lymfomu nebo klasického Hodgkinova lymfomu, který relaboval po 3 nebo více liniích léčby.

Identifikační kód studie: NCT02256436

Léčba lokálně pokročilého nebo metastatického uroteliálního karcinomu, který progredoval během nebo po chemoterapii na bázi platiny nebo do 12 měsíců od neadjuvantní nebo adjuvantní chemoterapie na bázi platiny; léčba pacientů s lokálně pokročilým nebo metastazujícím uroteliálním karcinomem, pro které není vhodná chemoterapie na bázi cisplatiny.

Identifikační kódy studií: NCT01876511, NCT02460198, NCT01848834, NCT02054806, NCT02628067

Léčba pacientů s neresekovatelným nebo metastazujícím solidním karcinomem s vysokou mikrosatelitovou nestabilitou nebo s deficitem v korekci správného párování bází (MMR, z angl. mismatch repair systému) s progresí po předchozí léčbě, u nichž neexistují uspokojivé alternativní možnosti léčby; léčba kolorektálního karcinomu s vysokou mikrosatelitovou nestabilitou nebo dMMR s progresí po léčbě fluoropyrimidinem, oxaliplatinou a irinotekanem.

Identifikační kód studie: NCT02256436

Léčba lokálně pokročilého nebo metastatického adenokarcinomu žaludku s expresí PD-L1 na maligních buňkách.

Seznam zkratk: MMR (z angl. mismatch repair), EGFR (z angl. epidermal growth factor receptor), FDA (z angl. food and drug administration), HER2 (z angl. human epidermal growth factor receptor 2), NSCLC (z angl. non-small-cell lung carcinoma) – nemalobuněčný karcinom plic, PD-L1 (z angl. programmed death-ligand 1), RCC (z angl. renal cell carcinoma) – renální karcinom, SCCHN (z angl. squamous cell carcinoma of the head and neck) – skvamózní karcinom hlavy a krku. Převzato a upraveno podle (Hargadon et al., 2018).

Mechanismus účinku anti-PD-L1 protilátky spočívá v navázání na molekulu PD-L1, čímž je zabráněno její interakci s koreceptorem PD-1 exprimovaným na povrchu T buněk. Ve srovnání s anti-PD-1 protilátkami, které jsou svou vazbou na receptor PD-1 schopné blokovat interakci s ligandem PD-L1 i PD-L2, protilátky zacílené na molekulu PD-L1 nejsou schopné zabránit interakci mezi PD-1 a PD-L2. Výhodou anti-PD-L1 protilátek je, že kromě PD-L1 se vážou také na molekulu CD80. Tato molekula je, jak již bylo uvedeno dříve, aktivačním ligandem jak pro stimulační koreceptor CD28, tak i pro inhibiční koreceptor CTLA-4. Protože vazba molekuly CD80 s molekulou CTLA-4 vykazuje zhruba dvacetinásobně vyšší afinitu než vazba s molekulou CD28, lze předpokládat, že vazba anti-PD-L1 blokační protilátky na molekuly CD80 se projeví hlavně blokádou interakce CD80 a CTLA-4, a tudíž snížením inhibiční aktivity CTLA-4 signalizace (Li *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2016; Pardoll, 2012). K letošnímu roku (2020) jsou registrovány tři monoklonální anti-PD-L1 protilátky: humanizovaná IgG1 protilátka atezolizumab a humánní IgG1 protilátky avelumab a durvalumab, a to na základě registračních studií u diagnóz uvedených v Tab. 4.

Tab. 4. Přehled anti-PD-L1 protilátek schválených FDA pro léčbu pacientů s onkologickým onemocněním pro uvedené indikace.

Atezolizumab (TECENTRIQ)	Identifikační kód studie: NCT02108652
	Léčba lokálně pokročilého nebo metastatického uroteliálního karcinomu s progresí během nebo po chemoterapii na bázi platiny nebo do 12 měsíců od neoadjuvantní nebo adjuvantní chemoterapii na bázi platiny.
	Identifikační kódy studií: NCT01903993, NCT02008227
	Léčba metastatického NSCLC s progresí během nebo po chemoterapii na bázi platiny; léčba pacientů s EGFR nebo ALK genomovými nádorovými aberacemi s progresí onemocnění při FDA-schválené terapii pro tyto aberace.
Avelumab (BAVENCI O)	Identifikační kód studie: NCT02155647
	Léčba pacientů s metastatickým karcinomem Merkelových buněk.
	Identifikační kód studie: NCT01772004
Durvalumab (IMFINZI)	Léčba lokálně pokročilého nebo metastatického uroteliálního karcinomu po předchozí chemoterapeutické léčbě.
	Identifikační kód studie: NCT01693562
	Léčba lokálně pokročilého nebo metastatického uroteliálního karcinomu s progresí během nebo po chemoterapii na bázi platiny nebo do 12 měsíců od neoadjuvantní nebo adjuvantní chemoterapii na bázi platiny.
Durvalumab (IMFINZI)	Identifikační kód studie: NCT02125461
	Léčba pokročilého neresekovatelného NSCLC bez progresu po souběžné chemoterapii na bázi platiny a radioterapii.

Seznam zkratk: EGFR (z angl. epidermal growth factor receptor), FDA (z angl. food and drug administration), NSCLC (z angl. non-small-cell lung carcinoma) – nemalobuněčný karcinom plic. Převzato a upraveno podle (Hargadon et al., 2018).

4.1.1 Inhibitory kontrolních bodů imunitních reakcí v léčbě karcinomu ovaria

Účinek protilátek zacílených proti molekulám PD-1, PD-L1 a CTLA-4 byl testován také u pacientek s karcinomem ovaria.

Nivolumab, plně humanizovaná protilátka proti PD-1 receptoru, byla poprvé testována u 20 pacientek, které vykazovaly rezistenci na léčbu platinou (UMIN Clinical Trials Registry: UMIN000005714). Pacientkám byla podávána dávka 1 nebo 3 mg/kg nivolumabu každé 2 týdny až do progresu onemocnění. Konečným výstupem studie bylo hodnocení počtu objektivních odpovědí na léčbu, celkové přežití a přežití bez progresu onemocnění. U 8 z 20 pacientek (40 %) se vyskytly nežádoucí účinky související s léčbou. Míra objektivní odpovědi na léčbu byla 15 %, z čehož pouze 2 pacientky vykazovaly kompletní odpověď. Medián přežití bez progresu byl 3,5 měsíců oproti 3,9 měsícům v kontrolním rameni. Medián přežití v léčeném rameni byl 20 měsíců. Kontrolní rameno v době ukončení studie nedosáhlo mediánu přežití (Hamanishi *et al.*, 2015).

Další testovanou anti-PD-1 protilátkou u pacientek s karcinomem ovaria je pembrolizumab. Ten byl použit např. v multicentrické, nerandomizované studii fáze Ib. Během této studie byla 26 pacientkám s expresí PD-L1 v nádorových ostrůvcích nebo stromatu větší nebo rovno 1 % podávána dávka 10 mg/kg pembrolizumabu v monoterapii (ClinicalTrials.gov identifikátor: NCT02054806), a to každé 2 týdny po dobu 2 let nebo do progresu onemocnění. Míra objektivní odpovědi na léčbu byla 11,5 %, přičemž 1 pacientka měla kompletní odpověď na léčbu, 2 vykazovaly částečnou odpověď a u 23 % pacientek došlo k stabilizaci onemocnění (Varga *et al.*, 2015).

Ipilimumab, rekombinantní IgG1 humanizovaná monoklonální protilátka proti CTLA-4, byla použita např. ve studii fáze II u pacientek s recidivujícím ovariálním karcinomem senzitivním na platinu (ClinicalTrials.gov identifikátor: NCT01611558). V této studii bylo zahrnuto 40 pacientek, kterým byly nejprve podávány 4 dávky 10 mg/kg ipilimumabu každé 3 týdny (indukční fáze) a následně dávka 10 mg/kg každých 12 týdnů až do progresu onemocnění nebo dokud se neobjevily závažné toxické účinky léčiva. Ze 40 pacientek, které zahájily léčbu, 38 pacientek (95 %) nedokončilo indukční fázi, a to z důvodu progresu onemocnění (14 pacientek, 35 %), toxicity léčiva (17 pacientek, 42,5 %), smrti (1 pacientka, 2,5 %) nebo z jiných důvodů (6 pacientek, 15 %). U 20 pacientek (50 %) se vyskytly vedlejší účinky související s léčbou. Míra objektivní odpovědi na léčbu byla 10,3 % (Gaillard *et al.*, 2016).

Další testovanou protilátkou pro léčbu karcinomu ovaria, která blokuje interakci mezi PD-1 a PD-L1, je avelumab. Ten byl testován ve studii fáze Ib na skupině 124 pacientek s refrakterním nebo recidivujícím karcinomem ovaria (ClinicalTrials.gov identifikátor NCT01772004). Pacientkám byla podávána dávka 10 mg/kg avelumabu každé 2 týdny až do progresu onemocnění nebo do projevu nežádoucí toxicity. Průměrná doba léčby byla 12 týdnů. Vedlejší účinky byly pozorovány u 6,4 % pacientek, 8,1 % pacientek muselo léčbu přerušit. 12 pacientek (9,7 %) vykazovalo částečnou odpověď na léčbu. Míra objektivní odpovědi na léčbu byla 12,3 % u pacientek s PD-L1⁺ nádorem a 5,9 % u pacientek s PD-L1⁻. Aby byl nádor hodnocen jako PD-L1⁺, musela být exprese znaku PD-L1 vyšší nebo rovna 1 % (Disis *et al.*, 2015). V roce 2019 byly publikované první výsledky fáze III klinické studie JAVELIN Ovarian 200 (ClinicalTrials.gov identifikátor: NCT02580058), ve které byl 566 pacientkám podáván avelumab v monoterapii nebo avelumab spolu s pegylovaným (tj. s navázaným polyethylenglykolem, který prodlužuje poločas eliminace) liposomálním doxorubicinem (PLD, z angl. pegylated liposomal doxorubicin) nebo samotný PLD. Podání avelumabu v monoterapii však významně nezlepšilo celkové přežití bez progresu onemocnění nebo celkové přežití oproti kontrolní skupině (Yonemori *et al.*, 2019).

Durvalumab, anti-PD-L1 protilátka, byla použita v klinické studii fáze I (ClinicalTrials.gov identifikátor NCT02484404) v kombinaci s PARP inhibitorem (olaparib) nebo VEGFR inhibitorem (cediranib). Primárním cílem této studie bylo zjistit bezpečnost obou kombinovaných terapií. U obou terapií došlo pouze v jednom případě k částečné odpovědi na léčbu, a to ze skupiny 9 hodnocených pacientek v případě kombinace durvalumab + olaparib a ze skupiny 5 hodnocených pacientek v případě kombinace duvalumab + cediranib (Lee *et al.*, 2016). V současné chvíli probíhá II. fáze klinického testování. Další vybrané probíhající klinické studie fáze I a II shrnuje Tab. 5.

Tab. 5. Vybrané klinické studie testující účinek blokátorů inhibičních molekul v léčbě karcinomu ovaria.

Cíl	Protilátka	Identifikační kód studie	Fáze	Počet pacientů
CTLA-4	Ipilimumab	NCT01611558	II	49
	Tremelimumab	NCT02658214	I	32
PD-1	Nivolumab	NCT02335918	I/II	175
		NCT02955251	I	61
	Pembrolizumab	NCT02537444	II	78
PD-L1	Durvalumab	NCT02658214	I	32
	Avelumab	NCT03704467	II	81
		NCT02222922	I	138

Zdroj: <https://clinicaltrials.gov/>, ke dni 1.1. 2020

Souhrnně z těchto výsledků vyplývá pouze omezená účinnost těchto preparátů v léčbě karcinomu vaječníků. Hlubší porozumění vlivu kontrolních bodů imunitních reakcí na případnou inhibici imunitní odpovědi by mohlo v budoucnu pomoci vysvětlit tyto neuspokojivé výsledky a navrhnout další možné kombinované imunoterapeutické přístupy, které by zvýšily účinnost tohoto typu imunoterapeutické léčby u karcinomu vaječníků.

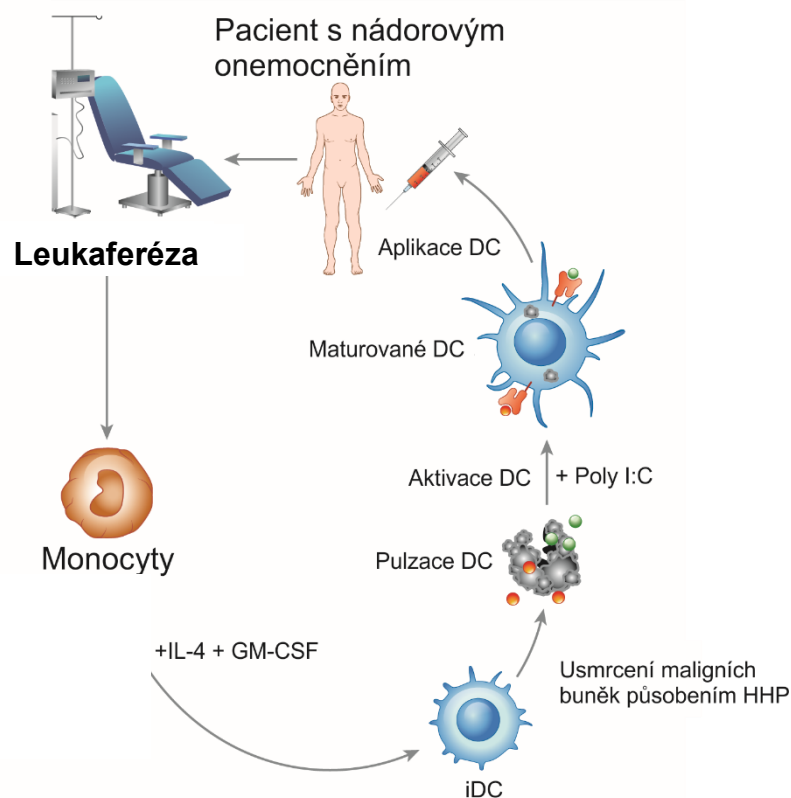
4.2 Imunoterapie založená na dendritických buňkách

DC jsou považovány za hlavní spojovací článek mezi přirozenou a adaptivní imunitou. Zralé DC představují vysoce účinné APC schopné aktivovat naivní T lymfocyty a zahájit specifickou imunitní odpověď. Prohloubení poznání role DC v procesu aktivace imunitní reakce v organismu a možnost jejich přípravy *in vitro* vedly k rozvoji nového směru imunoterapeutické léčby (Bauer *et al.*, 2018).

Nejrozšířenějším postupem při výrobě vakcíny založené na DC je *ex vivo* diferenciaci pacientových monocytů na populaci nezralých DC, které označujeme jako DC získané z monocytů (MDDC, z angl. monocyte derived DC). Proces diferenciaci probíhá účinkem cytokinů GM-CSF a IL-4 či IL-13. Takto připravené DC vykazují nezralý fenotyp s výraznou schopností fagocytózy. V *in vitro* podmínkách jsou nezralé DC následně vystavovány nádorovým antigenům, které DC pohlcují. Mezi nejčastěji používané antigeny patří: autologní či alogenní nádorové lyzáty, apoptotické nádorové buňky, inaktivované nádorové linie, izolované (rekombinantní) nádorové antigeny, rekombinantní peptidy z daného tumor asociovaného antigenu nebo neoantigenu, rekombinantní RNA/DNA kódující příslušný nádorový antigen, nebo fúzní hybridom DC s nádorem (Fucikova *et al.*, 2019). Na závěr jsou

DC maturovány pomocí aktivačních signálů (např. prostřednictvím TLR ligandů či směsí cytokinů). Maturace DC je nezbytná pro účinnou aktivaci protinádorové imunitní reakce. Takto připravená autologní DC vakcína je aplikována zpět pacientovi, nejčastěji intravenózně či subkutánní cestou. V těle pacienta DC migrují do lymfatických uzlin a podílí se na rozvoji protinádorové imunitní odpovědi. Optimálním výsledkem je zahájení nebo zesílení vlastní protinádorové T lymfocytární odpovědi daného pacienta (Brtnický *et al.*, 2012; Fuciková *et al.*, 2019).

U karcinomu ovaria je v současnosti testována vakcína založená na aplikaci *ex vivo* aktivovaných pacientových DC s názvem DCVAC/OvCa v klinických studiích fáze II (<http://www.sotio.com>). Prvním krokem v přípravě tohoto imunoterapeutického přípravku je odběr leukaferetického materiálu, ze kterého jsou následně v laboratoři izolovány monocyty. Ty pod vlivem působení cytokinů IL-4 a GM-CSF diferencují do nezralých DC. Během výrobního procesu jsou DC buňky pulzovány apoptotickými nádorovými liniemi SK-OV-3 a OV-90, které představují zdroj klíčových nádorových antigenů asociovaných s karcinomem ovaria. Nádorové linie jsou před samotným přidáním k nezralým DC ošetřeny HHP, což představuje zásadní krok ve výrobě terapeutického prostředku DCVAC, neboť takto ošetřené nádorové buňky podstupují ICD. Ta vede k vystavení DAMP molekul na jejich povrchu, což je důležité pro správnou aktivaci DC a následný rozvoj protinádorové imunitní odpovědi. Maturace DC je navíc podpořena aplikací ligandu TLR-3 (polyI:C). Takto připravené DC jsou nakonec zmrazeny a následně v několika dávkách subkutánně aplikovány pacientkám. Po aplikaci DC migrují do lymfatických uzlin, kde prezentací nádorových antigenů naivním T lymfocytům spouští specifickou T lymfocytární odpověď (Obr. 9).



Obr. 9. Schéma výroby autologní imunoterapie DCVAC. Přípravek DCVAC je vyráběn z pacientových monocytů odebraných pomocí leukaferetického odběru. Monocyty jsou následně diferencovány na nezralé dendritické buňky (iDC) pomocí 6 denní kultivace s cytokiny: IL-4 a GM-CSF. iDC jsou následně inkubovány s nádorovými buňkami ošetřenými vysokým hydrostatickým tlakem (HHP), který navozuje aktivaci imunogenní buněčné smrti maligních buněk. Nádorové buňky tedy představují zdroj nádorových antigenů a imunogenních molekul, které vedou k aktivaci dendritických buněk (DC). Takto pulzované iDC dozrávají v přítomnosti Poly I:C (ligand TLR-3). Výsledný produkt je zamražen a aplikován v několika dávkách pacientovi. Seznam zkratk: DC (z angl. dendritic cell), GM-CSF (z angl. granulocyte-macrophage colony stimulating factor), HHP (z angl. high hydrostatic pressure), iDC (z angl. immature dendritic cells), IL (z angl. interleukin). Převzato a upraveno podle (Fucikova et al., 2019)

Ačkoliv existuje řada léčebných přístupů pro léčbu karcinomu ovaria, které byly stručně popsány v této kapitole, léčbu pacientek komplikuje fakt, že se jedná o velice heterogenní nádorové onemocnění. Jednotlivé histologické subtypy se liší buněčným původem a jsou charakterizované jiným spektrem mutací i klinickou odpovědí. Dokonce i v rámci jednoho histologického typu se vyskytují různé molekulární podtypy, které vykazují rozdílnou prognózu. Zcela zásadní pro pokrok v léčbě je stanovení prognostických/prediktivních ukazatelů, které určují rozdíly v odpovědi na léčbu u jednotlivých subtypů a současně přispívají k nalezení skupiny pacientů, pro kterou by bylo nasazení dané léčby nejpřínosnější (Cortez et al., 2018).

5 Hodnocení účinnosti protinádorové terapie

S objevem, testováním a zaváděním nových léčebných přístupů pro terapii nádorových onemocnění vznikla potřeba objektivního hodnocení účinnosti protinádorové terapie. V současné době se klinické studie hodnotící objektivní odpověď na léčbu opírají zejména o následující ukazatele: celková doba přežití (OS), doba přežití bez progresce (PFS), četnost objektivních odpovědí (ORR, z angl. objective response rate) (Bauer *et al.*, 2018).

Prodloužení OS pacientů s maligním onemocněním je považováno za klíčový parametr v hodnocení účinnosti protinádorové léčby. Tento parametr lze snadno určit a jednoznačně dle něj lze vyhodnotit případný poměr rizika a benefitu při podání daného léčebného přípravku. Nicméně pro hodnocení přežívání pacientů je nutné pacienty sledovat v řádu měsíců až let, což je zatěžující faktor některých klinických studií.

PFS, tedy doba do dosažení progresce onemocnění, představuje další důležitý parametr pro sledování účinnosti protinádorové léčby. K dosažení statistické signifikance stačí mnohem méně pacientů a není nutná dlouhá doba sledování. Pomocí PFS však nejsme schopni hodnotit vliv na regresi vlastního nádorového ložiska. Nejčastěji se tedy sleduje u onemocnění, kdy je nízká pravděpodobnost vyléčení, ale benefit pro pacienta může být spojen s prodloužením přežití a kvality života (Demlova, 2005).

Pro hodnocení ORR se používají kritéria RECIST (z angl. response evaluation criteria in solid tumors), která vycházejí zejména z hodnocení velikosti nádorových lézí (Bauer *et al.*, 2018). Kritéria RECIST verze 1 byla definována v roce 2000 na základě předchozí klasifikace WHO (z angl. world health organization), která se opírala o dvourozměrné měření nádorových ložisek. V roce 2009 byla publikována v současnosti používaná nová verze 1.1, která hodnocení ještě více zjednodušila a upřesnila pro rutinní použití. Pokud dojde ke kompletnímu vymizení všech lézí, mluvíme o tzv. kompletní odpovědi (CR, z angl. complete response). V případě zmenšení ložiska o 30 % ve srovnání se vstupním vyšetřením mluvíme o tzv. částečné odpovědi na léčbu (PR, z angl. partial remission). Pokud dojde ke zvětšení cílových lézí o 20 % ve srovnání se vstupním vyšetřením nebo se objeví nové léze, jedná se o progresi onemocnění (PD, z angl. progressive disease). Stabilizace onemocnění (SD, z angl. stable disease) znamená, že nedochází ke zmenšení cílových lézí, ale současně nedochází ani k jejich zvětšení. Uvedená kritéria umožňují poměrně dobře monitorovat odpověď pacienta na léčbu (Eisenhauer *et al.*, 2009). Obecně přijímaným faktem je, že pokud má léčba příslušný protinádorový účinek, musí

dojít ke zmenšení nebo vymizení nádorové masy. Při zvětšení nádorového ložiska a vzniku nových maligních lézí hovoříme o selhání léčby a progresi onemocnění. V takovém případě by mělo dojít k ukončení terapie (Klener and Stastny, 2010).

V posledních letech se však v léčbě onkologických pacientů stále více uplatňuje cílená léčba a imunoterapie. Během imunoterapeutické léčby dochází k aktivaci pacientovy vlastní protinádorové imunity. Důsledkem tohoto procesu může být TME infiltrováno imunitními buňkami, což se může klinicky projevit jako přechodné zvětšení léze, nebo dokonce i vznik nového ložiska (nepatrné ložisko se vlivem infiltrátu zvětší). Tato „pseudoprogrese“ nesmí být ale zaměněna za skutečnou progresi nádorového onemocnění. Striktní posuzování odpovědi podle výše zmíněných kritérií RECIST tedy není zcela spolehlivé, a může dokonce vést k odmítnutí účinného léčiva. Tyto výše uvedené změny nelze popsat pomocí klasifikace WHO ani RECIST, a bylo proto nutné stávající kritéria modifikovat. V roce 2009 byla navržena nová klasifikace irRC (z angl. immune related response criteria), která vychází z původní WHO klasifikace a dvourozměrného měření lézí (Wolchok *et al.*, 2009). V roce 2017 byla publikovaná nová kritéria pro klinické studie testující protinádorovou imunoterapii – tzv. iRECIST, která vychází z RECIST 1.1. (Seymour *et al.*, 2017).

6 Identifikace prognostických a prediktivních ukazatelů pro imunoterapeutickou léčbu karcinomu ovaria

V posledních letech se imunoterapie stala integrální součástí léčebných postupů používaných v klinické onkologii. Navzdory značnému poznání a pokroku v této oblasti ale stále existují podskupiny pacientů, které na imunoterapii nereagují a dochází u nich k časnému relapsu onemocnění. Z tohoto důvodu je nutné hledat vhodné prognostické a prediktivní ukazatele účinné imunoterapeutické protinádorové léčby.

Za prognostické faktory lze považovat klinické nebo biologické charakteristiky, které nás informují o pravděpodobném průběhu onemocnění u neléčeného pacienta. Prognostické faktory tudíž definují prognózu pacienta. Oproti tomu prediktivní faktory jsou klinické nebo biologické charakteristiky, které nás informují o pravděpodobném účinku dané terapie. Některé faktory mohou plnit jak prognostickou, tak prediktivní funkci v terapii pacienta (Vyzula *et al.*, 2018).

Mezi nejvíce charakterizovaný a používaný prognostický ukazatel u karcinomu ovaria patří CA125. Tento antigen je exprimován na epiteliálních nádorových ovariálních buňkách. Míra exprese může být zjištěna ze séra pacientek pomocí monoklonální protilátky OC125. Jeho přítomnost v séru je v klinické praxi běžně užívaná pro identifikaci žen s vysokým rizikem onemocnění karcinomem ovaria, predikci klinického stavu a odpovědi na chemoterapii. Vyšší hladina tohoto faktoru v séru je asociovaná s horší prognózou pacientek s karcinomem ovaria (Huang *et al.*, 2010).

Díky hlubšímu poznání procesu vývoje nádorových onemocnění a pokroku v oblasti molekulární biologie, genomiky, proteomiky a metabolomiky jsou v současnosti identifikovány nové prognostické a prediktivní ukazatele. Patří mezi ně zejména parametry definující složení imunitního infiltrátu TME a parametry definující lokalizaci jednotlivých populací imunitních buněk a jejich funkční kapacitu. Další významnou kategorií prognostických a prediktivních ukazatelů pak představují molekuly vystavované a produkováné samotnými nádorovými buňkami, a to zejména DAMP, jelikož významně ovlivňují aktivaci protinádorové imunitní odpovědi, jak bylo zmíněno v předchozích kapitolách této práce.

6.1 Prognostický význam kalretikulinu

Nádorové buňky jsou rozpoznávány imunitním systémem především díky expresi nádorových antigenů. Nicméně výsledná imunogenicita maligních buněk je zásadním způsobem ovlivněna expresí či uvolněním DAMP molekul. Klíčová role CRT v aktivaci protinádorové imunitní odpovědi byla popsána zejména pomocí *in vitro* (Fucikova *et al.*, 2011; Fucikova *et al.*, 2014; Obeid *et al.*, 2007b) a *in vivo* myších studií (Apetoh *et al.*, 2008; Krysko *et al.*, 2012; Michaud *et al.*, 2011). Z výsledků preklinických studií současně vyplývá, že CRT představuje nový prognostický a prediktivní ukazatel, který by mohl napomáhat stratifikaci pacientů do rizikových skupin s případným dopadem na další léčebnou strategii (Tab. 6).

Pozitivní prognostická role CRT byla prokázána u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic (NSCLC, z angl. non-small-cell lung carcinoma) (Fucikova *et al.*, 2016a). Přítomnost CRT v nádorové tkáni byla sledována pomocí imunohistochemické analýzy v rozsáhlé kohortě (n=270) pacientů s NSCLC. Zastoupení CRT bylo heterogenní u jednotlivých pacientů, nicméně zvýšená exprese korelovala s vyšší frekvencí aktivovaných DC a efektorových CD8⁺ T lymfocytů v nádorové tkáni a současně s lepší prognózou onemocnění. Zastoupení CRT bylo shodné ve skupině pacientů s/bez aplikace neoadjuvantní chemoterapie. Z čehož vyplývá, že exprese CRT je nezávislá na aplikované chemoterapii (Fucikova *et al.*, 2016a).

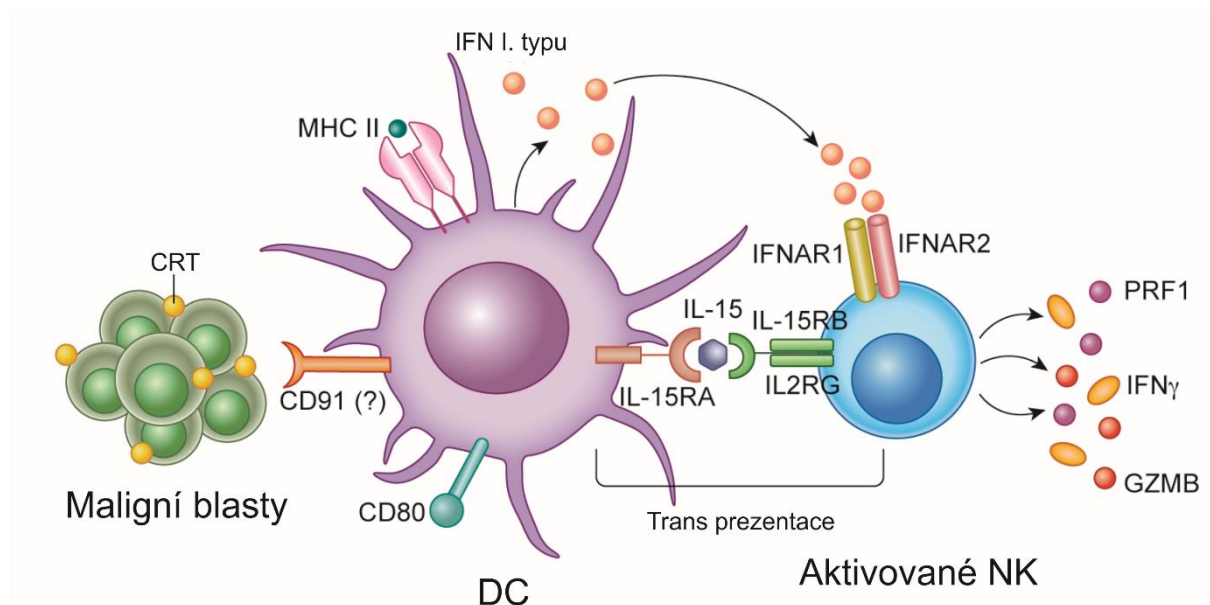
Z dále publikovaných výsledků na dvou nezávislých kohortách pacientů s karcinomem plic také vyplývá, že přítomnost CRT v TME je nezávislá na aplikované chemoterapii, a navíc bylo ukázáno, že probíhá jako odpověď na vnitrobuněčný stres maligních buněk, během kterého dochází ke spuštění apoptotické dráhy asociované s ER a vystavení chaperonových proteinů na povrchu neoplastických buněk (Garg *et al.*, 2015b).

Tab. 6. Přehled klinických studií hodnotící prognostickou roli kalretikulinu u pacientů s nádorovým onemocněním

Nádorové onemocnění	Úroveň CRT	Klinický dopad přítomnosti CRT	Detekční metoda	Reference
<i>akutní myeloidní leukemie</i>	vyšší	delší RFS a OS	průtoková cytometrie	(Fucikova <i>et al.</i> , 2016b)
	vyšší	lepší klinický průběh onemocnění	průtoková cytometrie	(Wemeau <i>et al.</i> , 2010)
<i>karcinom močového měchýře</i>	vyšší	kratší OS	genová exprese	(Chao <i>et al.</i> , 2010)
<i>karcinom prsu</i>	vyšší	kratší MFS	IHC	(Eric <i>et al.</i> , 2009)
	vyšší	CRT je vysoce exprimován v invazivních nádorech	IHC	(Zamanian <i>et al.</i> , 2016)
<i>kolorektální karcinom</i>	vyšší	delší OS	IHC	(Peng <i>et al.</i> , 2010)
<i>karcinom žaludku</i>	vyšší	horší klinický průběh onemocnění	IHC, genová exprese, ELISA	(Chen <i>et al.</i> , 2009)
<i>karcinom plic</i>	vyšší	delší OS	genová exprese	(Stoll <i>et al.</i> , 2016)
	vyšší	koreluje s pokročilejším stadiem onemocnění	IHC, ELISA	(Liu <i>et al.</i> , 2012)
	vyšší	delší OS	genová exprese	(Garg <i>et al.</i> , 2016)
	vyšší	delší OS a lepší klinická odpověď	IHC	(Fucikova <i>et al.</i> , 2016a)
<i>lymfom z plášťových buněk</i>	vyšší	kratší OS	genová exprese	(Chao <i>et al.</i> , 2010)
<i>neuroblastom</i>	vyšší	delší OS	IHC	(Hsu <i>et al.</i> , 2005)
	vyšší	kratší OS	genová exprese	(Chao <i>et al.</i> , 2010)
<i>glioblastom</i>	vyšší	delší OS	IHC	(Muth <i>et al.</i> , 2016)
<i>karcinom ovaria</i>	vyšší	delší OS	genová exprese	(Stoll <i>et al.</i> , 2016)
	vyšší	delší OS	genová exprese	(Garg <i>et al.</i> , 2016)
	vyšší	delší OS a lepší klinická odpověď	IHC, genová exprese	(Kasikova <i>et al.</i> , 2019)
<i>karcinom pankreatu</i>	vyšší	kratší OS	IHC, genová exprese	(Sheng <i>et al.</i> , 2014)
	vyšší	kratší OS	IHC	(Matsukuma <i>et al.</i> , 2016)
<i>osteosarkom</i>	vyšší	u pacientů s metastázami	imunofluorescence, genová exprese	(Zhang <i>et al.</i> , 2017)

Seznam zkratk: ELISA (z angl. enzyme-linked immuno sorbent assay), IHC (z angl. immunohistochemistry), MFS (z angl. metastasis-free survival) – přežití bez metastáz, OS (z angl. overall survival) – celková doba přežití, RFS (z angl. relapse-free survival) – doba bez recidivy. Upraveno podle (Fucikova *et al.*, 2018).

Pozitivní prognostický význam CRT byl zaznamenán také u pacientů s akutní myeloidní leukémií (AML, z angl. acute myeloid leukemia) (Fucikova *et al.*, 2016b; Wemeau *et al.*, 2010). Přítomnost CRT na povrchu maligních blastů byla také v tomto případě nezávislá na aplikované chemoterapii a významně korelovala s aktivací vnitrobuněčného stresu (Fucikova *et al.*, 2016b). Přítomnost CRT byla současně asociována s vyšší frekvencí nádorově specifických T lymfocytů a vyšším počtem NK buněk v periferní krvi a korelovala se signifikantně lepší prognózou tohoto onemocnění. Z výsledků další studie vyplývá, že CRT ovlivňuje nejen počet NK buněk v periferní krvi pacientů s AML, ale má pozitivní vliv také na jejich výslednou cytotoxickou funkci. Ta je aktivována nepřímo prostřednictvím populace myeloidních $CD14^+CD11c^+$ buněk, jak vyplývá z výsledků *in vitro* a *in vivo* testování (Truxova *et al.*, 2019) (Obr. 9).



Obr. 9. Přítomnost kalretikulinu na povrchu maligních blastů u pacientů s akutní myeloidní leukémií indukuje aktivaci NK buněk prostřednictvím populace myeloidních $CD14^+CD11c^+$ buněk. Kalretikulin (CRT) je na povrchu maligních blastů rozpoznáván populací dendritických buněk (DC) pravděpodobně pomocí receptoru CD91. Následně dochází k fenotypické a funkční aktivaci DC, která vede ke zvýšení exprese kostimulačních molekul a MHC molekul II třídy. Takto aktivované DC migrují do sekundárních lymfoidních orgánů, kde prostřednictvím IFN I. typu a transprezentace IL-15 aktivují populaci NK buněk. Seznam zkratk: CRT (z angl. calreticulin), DC (z angl. dendritic cell), GZMB (z angl. granzyme B), IFN (z angl. interferon), IFNAR (z angl. interferon alpha/beta receptor), IL15RA (z angl. interleukin 15 receptor subunit alpha), IL15RB (z angl. interleukin 15 receptor beta), IL2RG (z angl. interleukin 2 receptor gamma), MHC (z angl. major histocompatibility complex), NK (z angl. natural killer) PRF (z angl. perforin-1). Převzato a upraveno podle (Fucikova *et al.*, 2020).

Pozitivní prognostická role CRT byla potvrzena i u dalších nádorových onemocnění, např. u pacientů s neuroblastomem (Hsu *et al.*, 2005), glioblastomem (Muth *et al.*, 2016), karcinomem ovaria, prsu a tlustého střeva (Garg *et al.*, 2016; Peng *et al.*, 2010; Stoll *et al.*, 2016). I v těchto studiích korelovala přítomnost CRT s vyšší infiltrací CD8⁺ T lymfocytů v nádorové tkáni.

Naopak u karcinomu žaludku (Chen *et al.*, 2009) a pankreatu (Matsukuma *et al.*, 2016; Sheng *et al.*, 2014) byla přítomnost CRT asociována se zvýšenou angiogenezí, migrací a proliferací nádorových buněk. Podobně tomu bylo také u pacientů s karcinomem močového měchýře (Chao *et al.*, 2010), prsu (Eric *et al.*, 2009; Lwin *et al.*, 2010; Zamanian *et al.*, 2016) a lymfomem z plášťových buněk (Chao *et al.*, 2010).

Jak dokumentují výsledky výše popsaných studií, prognostický význam CRT u nádorových onemocnění není zcela jednoznačný. Obecně tedy CRT nelze přisuzovat bezvýhradně pozitivní nebo negativní roli v prognóze pacientů. Výsledná prognostická role CRT je závislá na několika faktorech, jakými jsou zejména typ nádorového onemocnění a stav imunitního systému. V neposlední řadě hraje roli také to, jakou detekční metodu pro stanovení přítomnosti CRT dané studie použily. Některé detekce totiž umožňují mapovat celkovou expresi na úrovni mRNA (qPCR, z angl. quantitative polymerase chain reaction) nebo proteinu na povrchu i uvnitř buněk (WB, z angl. western blot; imunohistochemie, IHC, z angl. immunohistochemistry). Jiné technologie, jako je fluorescenční mikroskopie nebo průtoková cytometrie, mapují pouze povrchově exprimovaný CRT (Kasikova *et al.*, 2020; Kepp *et al.*, 2014).

6.2 *Prognostická a prediktivní role imunitního infiltrátu v nádorovém mikroprostředí*

Nádor představuje velice sofistikovanou, složitě regulovanou orgánu podobnou strukturu, která není tvořena pouze maligními buňkami, ale také nádorovým stromatem (Balkwill *et al.*, 2012; Fridman *et al.*, 2017). Nádorové stroma může zásadním způsobem přispívat k nádorovému růstu, invazivitě a jeho úniku před imunitním dohledem a také k rozvoji rezistence vůči protinádorové léčbě (Fridman *et al.*, 2017). Interakce mezi maligními buňkami a buňkami nádorového stromatu pak vytváří komplexní, organizovanou strukturu, kterou nazýváme TME. V TME lze identifikovat fibroblasty, endoteliální buňky, epiteliální buňky, tukové buňky a jednotlivé složky imunity. Imunitní buňky vyskytující se v TME pak lze rozdělit na imunokompetentní buněčné populace (např. CD8⁺ T lymfocyty, DC, B lymfocyty), jejichž přítomnost je u pacientek s karcinomem ovaria spojována s pozitivní prognózou, a na

imunosupresivní subpopulace (např. TREG, M2 makrofágy a MDSC), jejichž výskyt v TME naopak koreluje s negativní prognózou pacientek s karcinomem ovaria, jak bylo detailně diskutováno v předchozích kapitolách této práce.

Složení TME je jak u jednotlivých typů malignit, tak i u jednotlivých pacientů s konkrétním typem nádorového onemocnění velice heterogenní a s ohledem na prognózu pacientů může hrát jak pozitivní, tak negativní roli (Fridman *et al.*, 2012). Složení TME, a to převážně zastoupení imunitního infiltrátu, tak představuje jeden ze základních prognostických ukazatelů, který se stanovuje u různých nádorových onemocnění včetně ovariálního karcinomu. V Tab. 7 jsou shrnuty výsledky studií zabývajících se vztahem mezi zastoupením jednotlivých imunitních subpopulací a prognózou pacientů s karcinomem ovaria.

Tab. 7. Přehled studií hodnotících prognostickou roli imunitního infiltrátu u pacientek s ovariálním karcinomem

Imunitní subpopulace	Specifikace	Prognóza	Reference	
T lymfocyty	intraepiteliální CD3 ⁺ T lymfocyty	+	(Zhang <i>et al.</i> , 2003)	
	intraepiteliální CD3 ⁺ T lymfocyty	+	(Tomsova <i>et al.</i> , 2008)	
	intraepiteliální CD3 ⁺ a CD8 ⁺ T lymfocyty		+	(Han <i>et al.</i> , 2008)
				(Clarke <i>et al.</i> , 2009)
				(Hwang <i>et al.</i> , 2012)
	CD8 ⁺ T lymfocyty	+	(Truxova <i>et al.</i> , 2018)	
	intraepiteliální CD8 ⁺ T lymfocyty		+	(Raspollini <i>et al.</i> , 2005)
				(Leffers <i>et al.</i> , 2009)
				(Stumpf <i>et al.</i> , 2009)
				(Nielsen <i>et al.</i> , 2012)
		(Hermans <i>et al.</i> , 2014)		
	pouze CD8 ⁺ T lymfocyty nikoliv CD3 ⁺ T lymfocyty	+	(Sato <i>et al.</i> , 2005)	
	TREG		-	(Curiel <i>et al.</i> , 2004)
				(Wolf <i>et al.</i> , 2005)
(Kryczek <i>et al.</i> , 2007)				
(Giuntoli <i>et al.</i> , 2009)				
(Barnett <i>et al.</i> , 2010)				
	(Fialova <i>et al.</i> , 2013)			
vyšší poměr CD8/CD4 T lymfocytů		+	(Sato <i>et al.</i> , 2005)	
			(Wolf <i>et al.</i> , 2005)	
			(Kryczek <i>et al.</i> , 2007)	
			(Hermans <i>et al.</i> , 2014)	
Dendritické buňky	DC-LAMP ⁺ DC	+	(Truxova <i>et al.</i> , 2018)	
	DC a CD45RO ⁺ T lymfocyty	+	(Zhang <i>et al.</i> , 2015)	
B lymfocyty	CD20 ⁺ B lymfocyty a CD8 ⁺ T lymfocyty	+	(Nielsen <i>et al.</i> , 2012)	
	CD20 ⁺ B lymfocyty	+	(Truxova <i>et al.</i> , 2018)	
Makrofágy	CD163 ⁺ TAM	-	(Yuan <i>et al.</i> , 2017)	
			(Yafei <i>et al.</i> , 2016)	
	vyšší poměr M1/M2 TAM	+	(Zhang <i>et al.</i> , 2014)	
	vyšší poměr CD206/CD68	-	(Le Page <i>et al.</i> , 2012b)	
	CD163 ⁺ TAM a CD163/CD68	-	(Lan <i>et al.</i> , 2013)	
	CD14 ⁺ HLA-DR ^{-low} MDSC	-	(Wu <i>et al.</i> , 2017)	
Myeloidní supresorové buňky	MDSC	-	(Horikawa <i>et al.</i> , 2017)	

Seznam zkratk: +: pozitivní prognóza, -: negativní prognóza, HLA-DR (z angl. human leukocyte antigen – DR isotype), MDSC (z angl. myeloid-derived suppressor cell), TAM (z angl. tumor-associated macrophage), TREG (z angl. regulatory T cells).

6.2.1 Vliv imunokompetentních buněk na prognózu pacientek s karcinomem ovaria

Nádor infiltrující lymfocyty (TIL, z angl. tumor-infiltrating lymphocytes) představují populaci buněk zásadním způsobem ovlivňující prognózu pacientů s maligním onemocněním (Fridman *et al.*, 2017). TIL mohou být lokalizované jak v nádorových ostrůvcích (tj. intraepiteliální lymfocyty), tak i v nádorovém stromatu, přičemž s pozitivní prognózou je spojována přítomnost zejména intraepiteliálních T lymfocytů (Sato *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2003). Z výsledků nezávislých studií vyplývá, že ačkoliv obecně přítomnost CD3⁺ T lymfocytů koreluje s pozitivní prognózou, na dlouhodobé přežívání pacientek má zcela rozhodující vliv zastoupení intraepiteliálních CD8⁺ T lymfocytů (Hermans *et al.*, 2014; Leffers *et al.*, 2009; Nielsen *et al.*, 2012; Raspollini *et al.*, 2005; Stumpf *et al.*, 2009). Tuto skutečnost potvrzuje i rozsáhlá meta-analýza 1815 vzorků ovariálního karcinomu, která ukazuje, že sledování zastoupení CD8⁺ TIL představují robustní ukazatel pro celkové přežití pacientek bez ohledu na stupeň, stadium a histologický subtyp onemocnění (Hwang *et al.*, 2012).

Z publikovaných studií dále vyplývá, že CD4⁺ TIL mají také pozitivní vliv na prognózu pacientek s karcinomem ovaria (Hamanishi *et al.*, 2011; Tsiatas *et al.*, 2009). Pomocí experimentálního myšího modelu bylo dokumentováno, že CD4⁺ TIL izolované z ovariálních nádorů pacientek po přenesení do myši přitahují do nádorového ložiska populaci CCR5⁺ DC. Tyto DC následně aktivují pomocí interakce CD40 a CD40L přítomné CD4⁺ T lymfocyty, ale současně také CD8⁺ T lymfocyty, které následně zajišťují dlouhodobou cytotoxickou odpověď proti maligním buňkám (Nesbeth *et al.*, 2010).

Jak již bylo zmíněno, DC představují neúčinnější APC, které zajišťují stimulaci naivních T lymfocytů a podílí se na aktivaci protinádorové imunitní odpovědi (Sabado *et al.*, 2017). Z publikovaných výsledků vyplývá, že přítomnost CD45RO⁺ T lymfocytů a současně CD1a⁺ DC, anebo CD45RO⁺ T lymfocytů a současně S-100⁺ DC (S-100 je využíván v publikacích k identifikaci DC v TME) v TME koreluje s lepší prognózou onemocnění (Zhang *et al.*, 2015).

Mezi další APC s pozitivním prognostickým vlivem u karcinomu ovaria patří B lymfocyty. Nielsen a kolegové zaznamenali nejlepší prognózu pacientek s HGSC (z angl. high-grade serous carcinoma, jejichž TME vykazovalo vyšší zastoupení jak CD20⁺ B lymfocytů, tak CD8⁺ T lymfocytů. Podrobná analýza ukázala, že B lymfocyty se nacházely v kontaktu s CD8⁺ T lymfocyty a exprimovaly znaky APC, jako jsou molekuly MHC I. třídy, MHC II. třídy, CD40, CD80 a CD86 (Nielsen *et al.*, 2012), což dokumentuje jejich roli v aktivaci cytotoxické protinádorové imunitní odpovědi.

6.2.2 Vliv imunosupresivních buněčných subpopulací na prognózu pacientek s karcinomem ovaria

Mezi nejlépe charakterizovanou imunosupresivní populací nejčastěji spojovanou se špatnou prognózou u karcinomu ovaria patří populace regulačních T lymfocytů (TREG). Jejich imunosupresivní působení je zprostředkováno jak přímou buněčnou interakcí, tak sekrecí inhibičních cytokinů TGF- β a IL-10 (Kryczek *et al.*, 2009).

Jak vyplývá z výsledků experimentálního testování, zvýšená migrace TREG do ovariálního nádoru souvisí s vyšší expresí CCL28 na povrchu maligních buněk, která je indukována hypoxickým mikroprostředím. Přítomné TREG následně způsobují imunitní toleranci maligních buněk a podporují angiogenezi (Facciabene *et al.*, 2011).

Curiel a kolegové na studii 104 pacientek s ovariálním karcinomem dále popsali, že TREG přispívají k inhibici specifické T buněčné imunity a podporují růst nádoru. Autoři dále uvádějí, že k migraci TREG do TME přispívá zvýšená produkce chemokinu CCL22 populací nádorových buněk. Přítomnost TREG v TME negativně koreluje s prognózou onemocnění (Curiel *et al.*, 2004). Korelace přítomnosti TREG se špatnou prognózou, pokročilým stádiem onemocnění a také jako důsledku nedostatečného operativního odstranění nádorů byla potvrzena také v dalších studiích (Barnett *et al.*, 2010; Giuntoli *et al.*, 2009; Kryczek *et al.*, 2007; Wolf *et al.*, 2005). Naopak optimální cytoredukční léčba s ponecháním jen minimálního nádorového rezidua byla asociována se snížením počtu TREG, navýšením počtu TIL a celkově lepší prognózou onemocnění (Napoletano *et al.*, 2010). Současně Sato a kolegové prokázali, že pacientky s vyšším poměrem CD8⁺/CD4⁺ T lymfocytů vykazovaly lepší prognózu z hlediska přežití, což by mohlo být vysvětleno právě inhibiční rolí CD4⁺ TREG u karcinomu ovaria. S tímto závěrem o inhibiční roli TREG se shodují i další studie (Hermans *et al.*, 2014; Kryczek *et al.*, 2007; Wolf *et al.*, 2005).

V další studii Fialová a kolegové sledovali dynamiku zastoupení tumor infiltrujících imunitních buněk v jednotlivých fázích onemocnění. Rané stadium karcinomu ovaria (stadium I) bylo charakterizováno silnou Th17 imunitní odpovědí. Pacientky ve stadiu II vykazovaly převahu imunitní odpovědi založené na Th1 buňkách a pacientky v pokročilém stádiu onemocnění (stadia III a IV) vykazovaly vyšší přítomnost TREG, tumor asociovaných makrofágů, myeloidních dendritických buněk (mDC, z angl. myeloid dendritic cells) a vyšší expresi chemokinu CCL22. CCL22 je sekretovaný převážně maligními buňkami, monocyty, makrofágy a mDC a je zodpovědný za chemotaxi TREG do TME pomocí vazby na receptor CCR4 (z angl. C-C chemokine receptor). Zdá se tedy, že infiltrace TREG do TME vede

k inhibici protinádorové imunitní odpovědi v pokročilých stádiích ovariálního karcinomu (Fialova *et al.*, 2013).

TAM představují další imunopresivní populaci spojovanou s progresí ovariálního karcinomu. Jejich fenotyp je charakterizován expresí znaků CD163, CD204, CD206 a produkcí cytokinu IL-10. Ze studie publikované Kawamurou a kolegy vyplývá, že kolonie stimulující faktor 1 (CSF-1, z angl. colony stimulating factor 1), produkovaný zejména maligními buňkami, indukuje polarizaci makrofágů do supresivního M2 fenotypu, což je následně spojeno s růstem a progresí karcinomu ovaria (Kawamura *et al.*, 2009). Toto tvrzení je v souladu s výsledky rozsáhlé meta analýzy zahrnující celkem 794 pacientek s ovariálním karcinomem, kde bylo vyšší zastoupení M2 makrofágů jednoznačně spojováno se špatnou prognózou. Naopak vyšší poměr M1/M2 TMA byl asociován s delší dobou do dosažení relapsu onemocnění (Yuan *et al.*, 2017). Také další studie potvrzují imunopresivní roli M2 makrofágů v karcinomu ovaria (Lan *et al.*, 2013; Le Page *et al.*, 2012a; Yafei *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2014).

Ve studii Wu a kolegové charakterizovali subpopulaci monocytárních CD14⁺HL-DR^{-lo} MDSC (M-MDSC) v periferní krvi a v ascitu pacientek s ovariálním karcinomem. Ve srovnání se zdravými dárci měly pacientky s ovariálním karcinomem výrazně vyšší zastoupení M-MDSC jak v periferní krvi, tak i v ascitu. Zvýšené množství těchto buněk bylo spojeno s kratší dobou do dosažení relapsu. Expanze M-MDSC byla závislá na IL-6, IL-10 a STAT3 (Wu *et al.*, 2017). Další studie pak ukázala, že přítomnost MDSC v TME negativně koreluje se zastoupením CD8⁺ T lymfocytů a délkou přežívání. Pomocí přístupu kombinujícího expresní analýzu a IHC bylo objasněno, že infiltrace TME MDSC je závislá na přítomnosti VEGF faktoru. Experimentální snížení, tedy knockdown, exprese genu VEGF vedlo ke snížení infiltrace MDSC do TME a k obnově infiltrace CD8⁺ T lymfocytů (Horikawa *et al.*, 2017).

6.3 *Kontrolní body imunitních reakcí a jejich vztah k prognóze pacientek s karcinomem ovaria*

V TME jsou TIL vystaveny řadě vlivů, které mohou v důsledku vést k jejich inhibici. Mnohé z nich představují molekuly se supresivními účinky, které jsou exprimovány na povrchu nádorových buněk, jako například molekula PD-L1. Jednou z prvních prací, která se zabývala prognostickou rolí molekuly PD-L1, byla studie z roku 2007, kde Hamanish a kolegové popsali, že exprese PD-L1 molekuly v TME je asociovaná s nižším zastoupením TIL v TME a se špatnou prognózou pacientek s ovariálním karcinomem (Hamanishi *et al.*, 2007). Tato práce je

v souladu s výsledky *in vitro* (Matsuzaki *et al.*, 2010) a *in vivo* myších studií (Hirano *et al.*, 2005), které prokázaly, že blokace ligandu PD-L1 vede k obnově efektorové funkce TIL.

Novější práce z roku 2016 ale ukazuje, že zcela zásadním faktorem, který ovlivňuje výslednou prognostickou roli PD-L1, je buněčný typ, který byl hodnocen na pozitivitu tohoto znaku, tedy zda PD-L1 exprimují maligní nebo imunitní buňky. Dle této studie je PD-L1 exprimován primárně na CD68⁺ makrofázích a nikoli na nádorových buňkách. Vyšší exprese PD-L1 na makrofázích je asociována i s vyšší infiltrací CD8⁺ TIL a zároveň s lepší prognózou pacientek s ovariálním karcinomem (Webb *et al.*, 2016). Korelaci exprese PD-L1 s infiltrací CD8⁺ TIL vysvětlují autoři prostřednictvím mechanismu adaptivní rezistence, který spočívá ve zpětnovazebné indukci exprese PD-L1 účinkem IFN- γ sekretovaného TIL. Aktivované T buňky uvolněním IFN- γ indukují expresi PD-L1 na cílových buňkách a ty následně aktivaci T buněk tlumí (Taube *et al.*, 2012). I další studie potvrzují pozitivní prognostickou roli PD-L1 u pacientek s karcinomem ovaria (Darb-Esfahani *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2018). V roce 2015 bylo také ukázáno, že PD-1⁺CD103⁺CD8⁺ TIL si zachovávají funkční kapacitu v boji proti nádorovým buňkám a jejich přítomnost koreluje s lepší klinickou odpovědí pacientek s ovariálním karcinomem (Webb *et al.*, 2015).

Podobně jako u ostatních nádorových malignit prognostická role PD-1/PD-L1 není zcela jednoznačná. Rozhodující bude např. klon použité protilátky pro identifikaci exprese PD-L1, metoda použitá pro stanovení míry exprese PD-L1 či populace buněk nesoucí znak PD-L1.

7 Cíle

Hlavním cílem této práce bylo charakterizovat složení a funkční orientaci imunitního infiltrátu v TME u pacientek s karcinomem ovaria. Dále definovat význam imunitních parametrů a produktů maligních buněk, a to zejména CRT, pro prognózu pacientek s high-grade serózním karcinomem ovaria (HGSC) se snahou najít nové prognostické ukazatele.

1. Sledování vlivu exprese CRT v TME na protinádorovou imunitní odpověď a prognózu pacientek s ovariálním karcinomem.
 - **Hypotéza:** Přítomnost CRT v TME koreluje s přítomností aktivovaných DC, cytotoxických CD8⁺ T lymfocytů a s lepší prognózou pacientek s karcinomem ovaria.
2. Sledování vlivu infiltrace TME aktivovanými DC na prognózu pacientek s karcinomem ovaria.
 - **Hypotéza:** Přítomnost DC v TME pozitivně koreluje s přítomností cytotoxických CD8⁺ T lymfocytů a prognózou pacientek.
3. Sledování vlivu exprese inhibičních molekul na funkční orientaci imunitního infiltrátu a prognózu pacientek s karcinomem ovaria.
 - **Hypotéza:** Přítomnost inhibičních molekul v TME významně ovlivňuje prognózu pacientek s karcinomem ovaria.
4. Sledování vlivu infiltrace TME M2 makrofágy na funkční orientaci imunitního infiltrátu a prognózu pacientek s metastatickým karcinomem ovaria.
 - **Hypotéza:** Přítomnost M2 makrofágů v TME negativně ovlivňuje funkční kapacitu imunitních buněk v metastatickém karcinomu ovaria, což má negativní dopad na prognózu pacientek.
5. Porovnání cytometrické a imunohistochemické analýzy ve sledování zastoupení CRT.
6. Sumarizace literárních poznatků o významu CRT pro klinický průběh nádorových onemocnění.

8 Výsledky

Seznam autorských publikací:

Publikace *in extenso*, které jsou podkladem dizertační práce:

- **Kasikova, L.**, Hensler, M., Truxova, I., Skapa, P., Laco, J., Belicova, L., Praznovec, I., Vosahlikova, S., Halaska, M.J., Brtnicky, T. and Rob, L., 2019. Calreticulin exposure correlates with robust adaptive antitumor immunity and favorable prognosis in ovarian carcinoma patients. *Journal for Immunotherapy of cancer*, 7: 1-12.

IF= 8.728

- Truxova, I.*, **Kasikova, L.***, Hensler, M., Skapa, P., Laco, J., Pecen, L., Belicova, L., Praznovec, I., Halaska, M.J., Brtnicky, T. and Salkova, E., 2018. Mature dendritic cells correlate with favorable immune infiltrate and improved prognosis in ovarian carcinoma patients. *Journal for Immunotherapy of cancer*, 6: 1-13.

*oba autoři přispěli stejným dílem

IF = 8.676

- Fucikova, J., Rakova, J., Hensler, M., **Kasikova, L.**, Belicová, L., Hladikova, K., Truxova, I., Skapa, P., Laco, J., Pecen, L. and Praznovec, I., 2019. TIM-3 dictates functional orientation of the immune infiltrate in ovarian cancer. *Clinical Cancer Research*, pp. clincanres-4175.

IF= 8.911

- Hensler M., **Kasikova L.**, Fiser K., Rakova J., Skapa P., Laco J., Lanickova T., Pecen L., Truxová I., Vosahlikova S., Moserova I., Halaska M., Praznovec, I., Drochytka V., Rehackova M., Brtnicky T., Rob L., Pistolic J., Benes V., Sojka L., Ryska A., Fridman S. C., Galluzi L., Spisek R., Fucikova J., 2020. M2 macrophages dictate functional orientation of the immune infiltrate in metastatic ovarian cancer.

V době odevzdání dizertační práce v revizním řízení v Immunotherapy of Cancer (

- **Kasikova, L.**, Truxova, I., Cremer, I., Sautes-Fridman, C., Kepp, O., Kroemer, G., Spisek, R. and Fucikova, J., 2020. Side-by-side comparison of flow cytometry and immunohistochemistry for detection of calreticulin exposure in the course of immunogenic cell death. *Methods in enzymology*, 632: 15-25.

IF= 1.862

Žadatelka je také spoluautorkou 1 přehledové publikace související s tématem dizertační práce

- Fucikova, J., **Kasikova, L.**, Truxova, I., Laco, J., Skapa, P., Ryska, A. and Spisek, R., 2018. Relevance of the chaperone-like protein calreticulin for the biological behavior and clinical outcome of cancer. *Immunology letters*, 193: 25-34

IF= **2.860**.

Publikace in extenso bez vztahu k tématu dizertační práce:

- Fucikova, J., Truxova, I., Hensler, M., Becht, E., **Kasikova, L.**, Moserova, I., Vosahlikova, S., Klouckova, J., Church, S.E., Cremer, I. and Kepp, O., 2016. Calreticulin exposure by malignant blasts correlates with robust anticancer immunity and improved clinical outcome in AML patients. *Blood*, 128: 3113-3124.

IF= **13.164**

- Truxova, I., **Kasikova, L.**, Salek, C., Hensler, M., Lysak, D., Holicek, P., Bilkova, P., Holubova, M., Chen, X., Mikyskova, R. and Reinis, M., 2019. Calreticulin exposure on malignant blasts correlates with improved natural killer cell-mediated cytotoxicity in acute myeloid leukemia patients. *Haematologica*, pp.haematol-2019.

IF= **7.570**

- Holicek, P., Truxova, I., **Kasikova, L.**, Vosahlikova, S., Salek, C., Rakova, J., Holubova, M., Lysak, D., Cremer, I., Spisek, R. and Fucikova, J., 2019. Assessment of NK cell-mediated cytotoxicity by flow cytometry after rapid, high-yield isolation from peripheral blood. *Methods in enzymology*, 631: 277-287.

IF= **1.862**

- Lustyk, D., Kinský, S., Ullrich, K.K., Yancoskie, M., **Kašiková, L.**, Gergelits, V., Sedláček, R., Chan, Y.F., Odenthal-Hesse, L., Forejt, J. and Jansa, P., 2019. Genomic structure of Hstx2 modifier of Prdm9-dependent hybrid male sterility in mice. *bioRxiv*, p.670422.

IF= **3.564**

8.1 *Přítomnost kalretikulinu v nádorovém mikroprostředí pacientek s karcinomem ovaria koreluje s aktivací adaptivní protinádorové imunitní odpovědi a lepší prognózou onemocnění*

ICD představuje konkrétní formu apoptózy, která je doprovázená expresí a uvolněním DAMP molekul. Během ICD dochází v důsledku stresu ER k preapoptotické translokaci CRT na povrch nádorových buněk. Povrchově exprimovaný CRT hraje klíčovou roli v aktivaci APC, zvláště pak DC, které následně indukují nádorově specifickou T lymfocytární imunitní odpověď. Z výsledků nejnovějších preklinických studií vyplývá, že přítomnost CRT v TME zásadně ovlivňuje prognózu pacientů se solidními i hematologickými malignitami. Nicméně role CRT v aktivaci protinádorové imunitní odpovědi a jeho vliv na prognózu pacientek s HGSC nebyla dosud podrobně popsána.

V této studii jsme analyzovali zastoupení CRT v TME pacientek s HGSC pomocí retrospektivní imunohistochemické analýzy. Z výsledků vyplývá, že zastoupení CRT je značně heterogenní v primární i metastatické tkáni. Současně je přítomnost CRT nezávislá na aplikované chemoterapii a koreluje s mírou vnitrobuněčného stresu. Z výsledků imunohistochemické a cytometrické analýzy a celogenomového sekvenování vyplývá, že přítomnost CRT v TME pozitivně koreluje s vyšší infiltrací imunitních buněk (DC-LAMP⁺ DC, CD20⁺ B lymfocyty, CD8⁺ T lymfocyty) a vyšší cytotoxickou kapacitou efektorových CD8⁺ T lymfocytů. Současně přítomnost CRT koreluje s lepší prognózou onemocnění a společně s hodnocením imunitního infiltrátu v TME napomáhá identifikovat skupinu pacientek s nejhorší prognózou onemocnění.

Autorka v této práci přispěla:

- Optimalizace imunohistochemických protokolů využitých v rámci této studie
- Retrospektivní imunohistochemická analýza zastoupení CRT a CD8⁺ T lymfocytů v nádorové tkáni
- Prospektivní analýza nádorové tkáně – zpracování čerstvé nádorové tkáně a multiparametrická cytometrická analýza vzorků
- Zpracování výsledků celogenomového sekvenování
- Biostatistické a bioinformatické hodnocení výsledků provedených analýz a dat dostupných z veřejné genové databáze TCGA (z angl. the cancer genome atlas)
- Příprava manuskriptu pod vedením školitele

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Calreticulin exposure correlates with robust adaptive antitumor immunity and favorable prognosis in ovarian carcinoma patients



Lenka Kasikova^{1,2}, Michal Hensler², Iva Truxova^{1,2}, Petr Skapa³, Jan Laco⁴, Lucie Belicova², Ivan Praznovec⁵, Sarka Vosahlikova², Michael J. Halaska⁶, Tomas Brtnicky⁷, Lukas Rob⁶, Jiri Presl⁸, Jan Kostun⁸, Isabelle Cremer^{9,10,11}, Ales Ryska⁴, Guido Kroemer^{11,12,13,14,15}, Lorenzo Galluzzi^{11,16,17,18}, Radek Spisek^{1,2} and Jitka Fucikova^{1,2*}

Abstract

Background: Adjuvanticity, which is the ability of neoplastic cells to deliver danger signals, is critical for the host immune system to mount spontaneous and therapy-driven anticancer immune responses. One of such signals, i.e., the exposure of calreticulin (CALR) on the membrane of malignant cells experiencing endoplasmic reticulum (ER) stress, is well known for its role in the activation of immune responses to dying cancer cells. However, the potential impact of CALR on the immune contexture of primary and metastatic high-grade serous carcinomas (HGSCs) and its prognostic value for patients with HGSC remains unclear.

Method: We harnessed a retrospective cohort of primary (no = 152) and metastatic (no = 74) tumor samples from HGSC patients to investigate the CALR expression in relation with prognosis and function orientation of the tumor microenvironment. IHC data were complemented with transcriptomic and functional studies on second prospective cohort of freshly resected HGSC samples. In silico analysis of publicly available RNA expression data from 302 HGSC samples was used as a confirmatory approach.

Results: We demonstrate that CALR exposure on the surface of primary and metastatic HGSC cells is driven by a chemotherapy-independent ER stress response and culminates with the establishment of a local immune contexture characterized by T_H1 polarization and cytotoxic activity that enables superior clinical benefits.

Conclusions: Our data indicate that CALR levels in primary and metastatic HGSC samples have robust prognostic value linked to the activation of clinically-relevant innate and adaptive anticancer immune responses.

Keywords: B cells, Cancer immunotherapy, CD20, DC-LAMP, Dendritic cells, Immunogenic cell death

Introduction

It is now accepted that tumors form, progress and respond to therapy in the context of an intimate, bidirectional interaction with the immune system [1, 2]. In this context, malignant cells progressively escape immunosurveillance by losing their antigenicity, i.e., the exposure on the cell surface of antigens not covered by central thymic tolerance [3, 4] and adjuvanticity, i.e., the emission of immunostimulatory signals through molecules

commonly known as damage-associated molecular patterns (DAMPs) [5, 6]. In physiological conditions, DAMPs are sequestered in the intracellular microenvironment, where they cannot be detected by the host immune system [5, 6]. However, cells experiencing sublethal or lethal stress conditions passively release, actively secrete, or expose on the outer leaflet of the plasma membrane, several DAMPs, hence enabling the latter to mediate a variety of immunomodulatory functions [7–9].

Endoplasmic reticulum (ER) chaperones including calreticulin (CALR) and various heat-shock proteins (HSPs) are well known for their key role as pro-phagocytic DAMPs in the successful activation of anticancer

* Correspondence: fucikova@sotio.com

¹Department of Immunology, Charles University, 2nd Faculty of Medicine and University Hospital Motol, V Uvalu 84, 150 00 Prague 5, Czech Republic

²Sotio, Prague, Czech Republic

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2019 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

immunity by malignant cells undergoing immunogenic cell death [5, 6]. In line with this notion, high expression levels of CALR and/or CALR exposure on the membrane of cancer cells have been linked with superior disease outcome in patients with colorectal carcinoma (CRC) [10], non-small cell lung carcinoma (NSCLC) [11, 12], acute myeloid leukemia (AML) [13], and ovarian cancer [11] generally in association with improved anti-cancer immunity. Conversely, the impact of CALR levels on the composition and functional orientation of the HGSC microenvironment remain unclear.

Here, we investigated the impact of CALR levels on disease outcome in a retrospective cohort of 152 patients with resectable high-grade serous carcinoma (HGSC) who did not receive neoadjuvant chemotherapy. Our data suggest that increased CALR levels in both primary and metastatic tumor tissues are associated with superior disease outcome linked to the establishment of a tumor microenvironment (TME) exhibiting T_H1 polarization and activation of immune effectors.

Materials and methods

Patients

Study group 1. Two retrospective series of 152 primary and 74 metastatic formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples were obtained from patients with HGSC who underwent surgery without neoadjuvant chemotherapy between 2008 and 2014 at University Hospital Hradec Kralove (Czech Republic). Baseline characteristics of these patients are summarized in Table 1. From those 24 patients samples were further analyzed using RNA-seq technology. **Study group 2.** A retrospective cohort of 45 patients with HGSC who received neoadjuvant chemotherapy followed by curative resection between

2008 and 2014 was obtained from University Hospital Hradec Kralove (Czech Republic). Baseline characteristics of these patients are summarized in Additional file 1: Table S1. **Study group 3.** An additional series of 35 samples from HGSC patients who did not receive neoadjuvant chemotherapy was prospectively collected at Hospital Motol (Czech Republic). Written informed consent was obtained from the patients before inclusion in the prospective study. The protocol was approved by the local ethics committee. Baseline characteristics of these patients are summarized in Additional file 1: Table S2. Pathologic staging was performed according to the 8th TNM classification (2017), and histologic types were determined according to the current WHO classification [14, 15]. Data on long-term clinical outcome were obtained retrospectively by interrogation of municipality registers or patients' families. The experimental design of the study is summarized in Additional file 1: Figure S1.

Immunohistochemistry

Tumor specimens from Study Group 1 and Study Group 2 were fixed in neutral buffered 10% formalin solution and embedded in paraffin as per standard procedures. Immunostaining with antibodies specific for lysosomal associated membrane protein 3 (LAMP3; best known as DC-LAMP), CD8, CD20, CALR and natural cytotoxicity triggering receptor 1 (NCR1; best known as NKp46) (Additional file 1: Table S3) was performed according to conventional protocols. Briefly, tissue sections were deparaffinized and rehydrated descending alcohol series (100, 96, 70, and 50%), followed by antigen retrieval with Target Retrieval Solution (Leica) in EDTA pH 8.0 (for DC-LAMP/CD20, CD8, NKp46) or in citrate buffer at pH 6.0 (for CALR), in preheated water bath (97 °C, 30 min). Sections were allowed to cool down to RT for 30 min, and endogenous peroxidase was blocked with 3% H₂O₂ for 15 min. For co-staining, endogenous alkaline phosphatase was blocked by levamisole (Vector). Sections were then treated with protein block (DAKO) for 15 min and incubated with primary antibodies, followed by the revelation of enzymatic activity. Images were acquired using a Leica Aperio AT2 scanner (Leica).

Scoring

CALR expression in the tumor microenvironment was quantified as a function of CALR⁺ positive tumor cells, as published previously [12]. Scores were calculated on 10 different fields visually inspected at 20x magnification under a light microscope (DM2000LED; Leica), and classified into (1) score 1, < 10% CALR⁺ cells; (2) score 2, 10–25% CALR⁺ cells, (3) score 3, 26–50% CALR⁺ cells; (4) score 4, 51–75% CALR⁺ cells; and (5) score 5, > 75% positive cells (Additional file 1: Figure S2.). Quantification was done performed by two independent observers

Table 1 Main clinicopathological features of Study Group 1

Variable	Study Group 1 (n = 152)
Age:	
Mean age ± SEM	65 ± 0.81
Range	41–85
pTNM stage:	
Stage I	20 (13.2%)
Stage II	11 (7.2%)
Stage III	111 (73%)
Stage IV	10 (6.6%)
Debulking	
R0	75 (49.4%)
R1	12 (7.9%)
R2	65 (42.7%)
Vital status of patients	70 (46.1%)

(LK, JF) and reviewed by two expert pathologists (JL, PS). DC-LAMP⁺, CD8⁺, CD20⁺ and NKp46⁺ cells were quantified in the tumor stroma and tumor nests of the whole tumor sections with Calopix (Tribvn). Data are reported as absolute number of positive cells/mm² (for DC-LAMP⁺, CD8⁺ and NKp46⁺ cells) or cell surface/total tumor section surface (for CD20⁺ cells), as previously described [16–19]. Immunostaining and quantifications were reviewed by at least three independent observers (IT, LK, JF, PS, JL) and two expert pathologists (JL, PS).

Flow cytometry

As previously described, fresh ovarian tumor specimens were minced with scissors, digested in PBS containing 1 mg/ml of Collagenase D (Roche) and 0.2 mg/ml DNase I at 37 °C for 30 min mechanically dissociated using the gentleMACS dissociator (Miltenyi Biotec) and passed through a 70 µm nylon cell strainer (BD Biosciences) [16]. To determine the ecto-CALR exposure, mononuclear cells were stained with primary antibodies against CD45, cytokeratin, human epithelial antigen, CD227 to distinguish the population of leukocytes and malignant cells, and antibodies against CALR or isotype control (Additional file 1: Table S4) for 20 min at 4 °C in the dark, following by washing and acquisition on a Fortessa flow cytometer (BD Bioscience). Flow cytometry data were analyzed with the FlowJo software (TreeStar). Gating strategy is depicted in Additional file 1: Figure S3.

Degranulation and IFN-γ production after in vitro stimulation

Mononuclear cells isolated from fresh tumor specimens were stimulated with 50 ng/ml of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) + 1 µg/ml of ionomycin for 1 h followed by 3 h incubation with brefeldin A (BioLegend). Unstimulated cells were used as a control. The cells were then washed in PBS, stained with anti-CD3 Alexa Fluor 700 (EXBIO), anti-CD4 ECD (Beckman Coulter) and anti-CD8 HV500 (BD Biosciences), fixed using fixation/permeabilization buffer (eBioscience), permeabilized with permeabilization buffer (eBioscience) and intracellularly stained with an anti-IFN-γ PE-Cy7 (eBioscience), anti-granzyme B Brilliant Violet 421 (BD Biosciences) (Additional file 1: Table S4). The percentage of CD3⁺CD8⁺ T cells producing IFN-γ and degranulating upon PMA/ionomycin stimulation were determined by flow cytometry. The data were analyzed with the FlowJo software package (Tree Star, Inc.). Gating strategy is depicted in Additional file 1: Figure S4.

TCGA data analysis

Patients with HGSC ($n = 302$) were identified in The Cancer Genome Atlas (TCGA) public database ([https://](https://cancergenome.nih.gov/)

cancergenome.nih.gov/). Differentially expressed genes (DEGs) between the CALR^{Hi} and CALR^{Lo} groups were determined using the LIMMA-R package [20]. Hierarchical clustering analysis was conducted using the ComplexHeatmap package, based on the Euclidean distance and complete clustering method [21]. Immune analyses were performed using ClueGo [22]. The MCP-counter R package was used to estimate the abundance of tissue-infiltrating immune cell populations (Additional file 1: Table S5) [23].

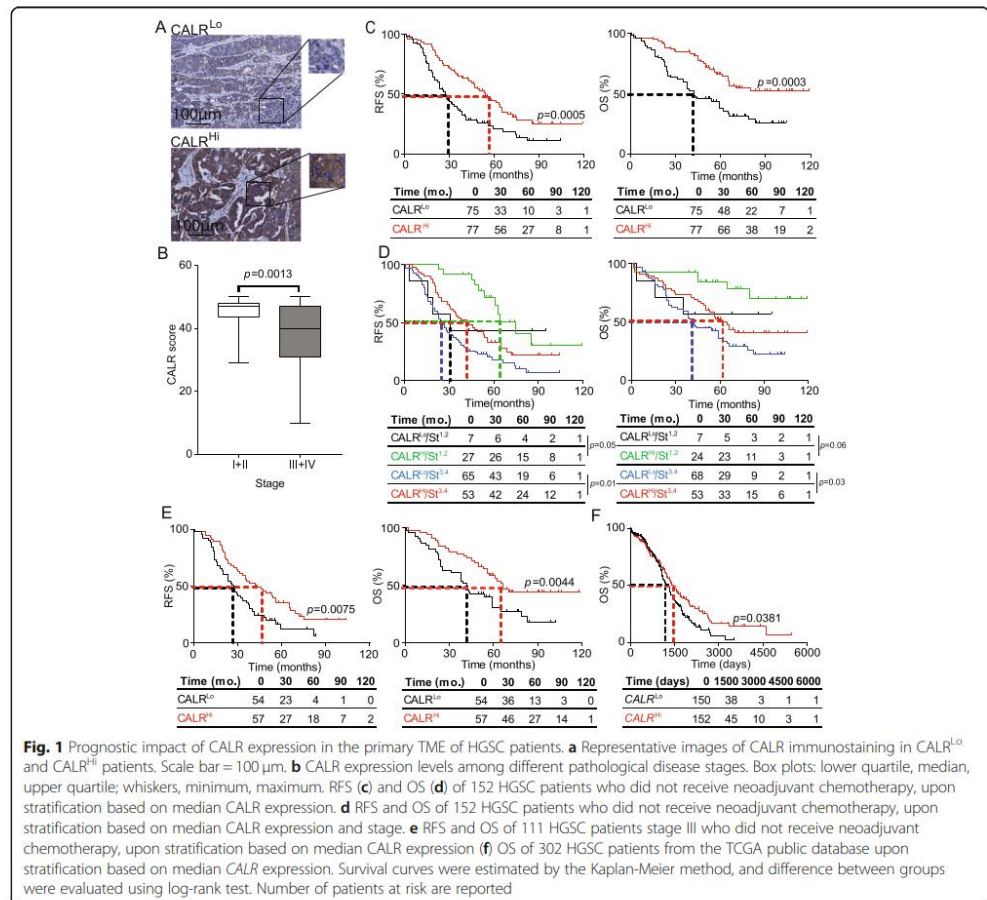
Statistical analysis

Survival analysis was performed using the R package survival analysis. The overall prognostic value of continuous variables was assessed (1) by Wald tests for univariate COX regression models, (2) by log-rank tests using median-based cutoffs. The prognostic value of CALR and immune density was assessed by multivariate Cox regression. Student's *t* tests, Wilcoxon tests and Mann-Whitney tests were used to assess statistical significance, *p* values are reported (considered not significant when > 0.05).

Results

Prognostic impact of CALR expression in TME of primary and metastatic HGSC

Primary tumor (PT) samples from a retrospective series of 152 patients with HGSC who did not receive neoadjuvant chemotherapy (Study Group 1) (Table 1) were analyzed for CALR expression by immunohistochemistry (IHC) (Fig. 1a). CALR levels were rather heterogeneous within samples from the same TNM stage, with a trend for decreased CALR expression in Stage III-IV lesions that was statistically significant as compared to Stage I-II lesions ($p = 0.0013$) (Fig. 1b). To evaluate the prognostic impact of CALR expression in primary HGSC tissues, we investigated relapse-free survival (RFS) and overall survival (OS) upon stratifying the entire patient cohort based on the median CALR expression score. We found that CALR^{Hi} patients had a significantly improved RFS and OS as compared with their CALR^{Lo} counterparts (median RFS: 54 mo. versus 27 mo.; $p = 0.0005$; median OS; > 120 mo. versus 42 mo.; $p = 0.0003$) (Fig. 1c). As CALR levels tend to correlate with disease stage and both these factors have prognostic significance (Fig. 1d, Additional file 1: Figure S5A), we harnessed univariate and multivariate Cox regression models to demonstrate that such significance is mutually independent (Tables 2 and 3). Consistent with this, survival curves of the patient cohort stratified for stage (I,II versus III/IV) and CALR expression (CALR^{Lo} versus CALR^{Hi}) documented significantly improved OS for CALR^{Hi}/Stage^{III,IV} patients over their CALR^{Lo}/Stage^{III,IV} counterparts ($p = 0.03$) (Fig. 1d). A similar trend not reaching statistical significance (potentially due to the limited amount of patients in this subset) was



observed for CALR^{Hi}/Stage^{III} patients compared to their CALR^{Lo}/Stage^{III} counterparts ($p = 0.06$) (Fig. 1d). RFS data further comforted these findings (Fig. 1d). We therefore decided to focus on patients with Stage III HGSC ($n = 111$), the majority of patients from Study Group 1, to remove the potential confounding effect linked to disease stage, thus eliminating patients at other stages from further analyses. Importantly, CALR levels in both PT (Fig. 1e) and metastatic tumors (MT) (Additional file 1: Figure S5B) were significantly associated with improved RFS and OS (median RFS PT: 43 mo. versus 27 mo.; $p = 0.0075$; median OS PT: 66 mo. versus 42 mo.; $p = 0.0044$; median RFS MT: 41.5 mo. versus 21 mo.; $p = 0.01$; median OS MET; > 120 mo. versus 34 mo.; $p = 0.0012$). Both univariate and multivariate Cox analyses confirmed the prognostic impact of CALR levels in patients with Stage III HGSC (Tables 2 and 3). To validate

these findings in a larger patient cohort, we analyzed the prognostic role of CALR mRNA levels in 302 patients with primary ovarian cancer from The Cancer Genome Atlas (TCGA) database, based on the median cutoff approach [12, 13]. High intratumoral CALR mRNA levels were strongly associated with improved OS ($p = 0.0381$) (Fig. 1f). Altogether, these results demonstrate that CALR expression in both primary and metastatic lesions constitutes a strong prognostic biomarker for the identification of chemotherapy-naïve HGSC patients with favorable disease outcome upon tumor resection.

CALR levels in HGSC correlate with signs of an ongoing ER stress response

CALR expression on the surface of cells undergoing ICD relies on the activation of the ER stress response in

Table 2 Univariate Cox proportional hazard analysis

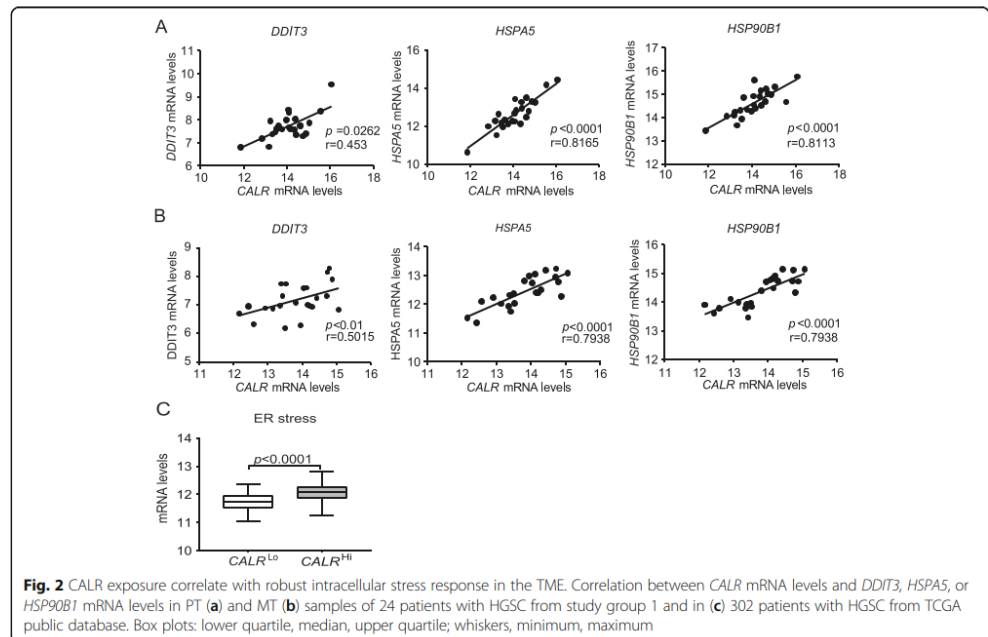
Variable	Overall survival		Relapse-free survival	
	HR (95% CI)	<i>p</i>	HR (95% CI)	<i>p</i>
CA125	1 (1–1)	0.14	1 (1–1)	0.31
Stage		0.55		0.8
Stage I	1		1	
Stage II	0.61 (0.12–3.14)	0.52	1.14 (0.4–3.19)	0.808
Stage III	2.99 (1.21–7.43)	0.018	2.64 (1.33–5.26)	0.006
Stage IV	5.35 (1.63–17.57)	0.006	4.84 (1.79–13.09)	0.002
Debulking		0.22		0.08
Debulking R0	1		1	
Debulking R1	1.67 (0.73–3.8)	0.224	1.84 (0.92–3.67)	0.084
Debulking R2	2.17 (1.36–3.47)	0.001	2.76 (1.85–4.13)	< 0.0001
Age	1 (0.98–1)	0.73	1 (0.99–1)	0.48
CALR	0.96 (0.94–0.98)	< 0.0001	0.97 (0.95–0.98)	< 0.0001
DC-LAMP summary	0.86 (0.76–0.96)	0.0097	0.98 (0.94–1)	0.19
CD8 summary	1 (1–1)	0.011	1 (1–1)	0.057
CD20	0.2 (0.039–0.97)	0.046	0.5 (0.23–1.1)	0.087
NKp46	1 (0.82–1.2)	0.98	0.91 (0.73–1.1)	0.42

dying cells [24, 25]. We therefore checked whether the mRNA levels encoding 3 distinct components of the canonical ER stress response, namely DNA damage inducible transcript 3 (DDIT3, best known as CHOP), heat shock protein family A (Hsp70) member 5 (HSPA5, best known as BIP), and heat shock protein 90 beta family member 1 (HSP90B1) [26], would correlate with *CALR* mRNA levels in samples from Study Group 1. We

Table 3 Multivariate Cox proportional hazard analysis

Variable	Overall survival		Relapse-free survival	
	HR (95% CI)	<i>p</i>	HR (95% CI)	<i>p</i>
CA125	1 (1–1)	0.495	1 (1–1)	0.98
Stage		0.5		0.98
Stage I	1		1	
Stage II	0.76 (0.14–4.18)	0.755	1.3 (0.45–3.77)	0.627
Stage III	2.21 (0.76–6.41)	0.145	1.75 (0.79–3.87)	0.165
Stage IV	4.89 (1.33–17.9)	0.017	2.84 (0.96–8.4)	0.06
Debulking		0.39		0.9
Debulking R0	1		1	
Debulking R1	0.62 (0.21–1.84)	0.386	0.95 (0.4–2.24)	0.91
Debulking R2	1.35 (0.8–2.27)	0.262	1.92 (1.21–3.06)	0.006
Age	1 (0.98–1.03)	0.743	1.01 (0.99–1.03)	0.508
CALR	0.96 (0.94–0.99)	0.0003	0.97 (0.96–0.99)	0.002
DC-LAMP summary	0.8 (0.7–0.91)	0.001	0.97 (0.94–1.0)	0.12
CD8 summary	0.99 (0.99–0.99)	0.0007	0.99 (0.99–1)	0.13
CD20	0.23 (0.3–1.54)	0.13	1 (0.33–1.5)	0.86
NKp46	1.08 (0.9–1.3)	0.37	1.11 (0.93–1.35)	0.24

observed a statistically significant positive correlation between *CALR* levels and *DDIT3*, *HSPA5* and *HSP90B1* in both PT and MT samples (Fig. 2a and b). To validate our findings in an independent patient cohort, we retrieved normalized expression data on *DDIT3*, *HSPA5* and *HSP90B1*, as well as on transcripts encoding the ER stress-relevant proteins activating transcription factor 6 (ATF6) and X-box binding protein 1 (XBP1) for 302 patients with primary ovarian cancer from the TCGA database, and analyzed their correlation with *CALR* abundance. Also in this setting, *DDIT3*, *HSPA5*, *HSP90B1*, *ATF6*, and *XBP1* levels exhibited a highly significant positive correlation with *CALR* expression (Fig. 2c), corroborating the notion that ovarian cancer cells are subjected to ER stress irrespective of treatment, resulting in spontaneous *CALR* upregulation in a majority of patients. Next, we decided to evaluate the potential impact of platinum- and paclitaxel-based chemotherapy, which is a common standard of care for patients with ovarian cancer [27], on the adjuvanticity of HGSC cells. To this aim, we analyzed *CALR* expression in PT samples from an independent cohort of 45 patients who received neoadjuvant chemotherapy before surgery (Study Group 2) (Additional file 1: Table S1). We observed no difference in *CALR* levels in PT samples from chemotherapy-naïve patients versus patients who underwent neoadjuvant chemotherapy (Additional file 1: Figure S5C). Moreover, OV90 ovarian cancer cells exposed to carboplatin plus paclitaxel for 24 h failed to manifest increased *CALR* exposure on the plasma membrane, at odds with OV90 cancer cells exposed to idarubicin (an anthracycline that triggers ICD) (Additional



file 1: Figure S5D). Taken together, these findings lend further support to the notion that HGSC cells are exposed to microenvironmental conditions that favor *CALR* upregulation irrespective of chemotherapy.

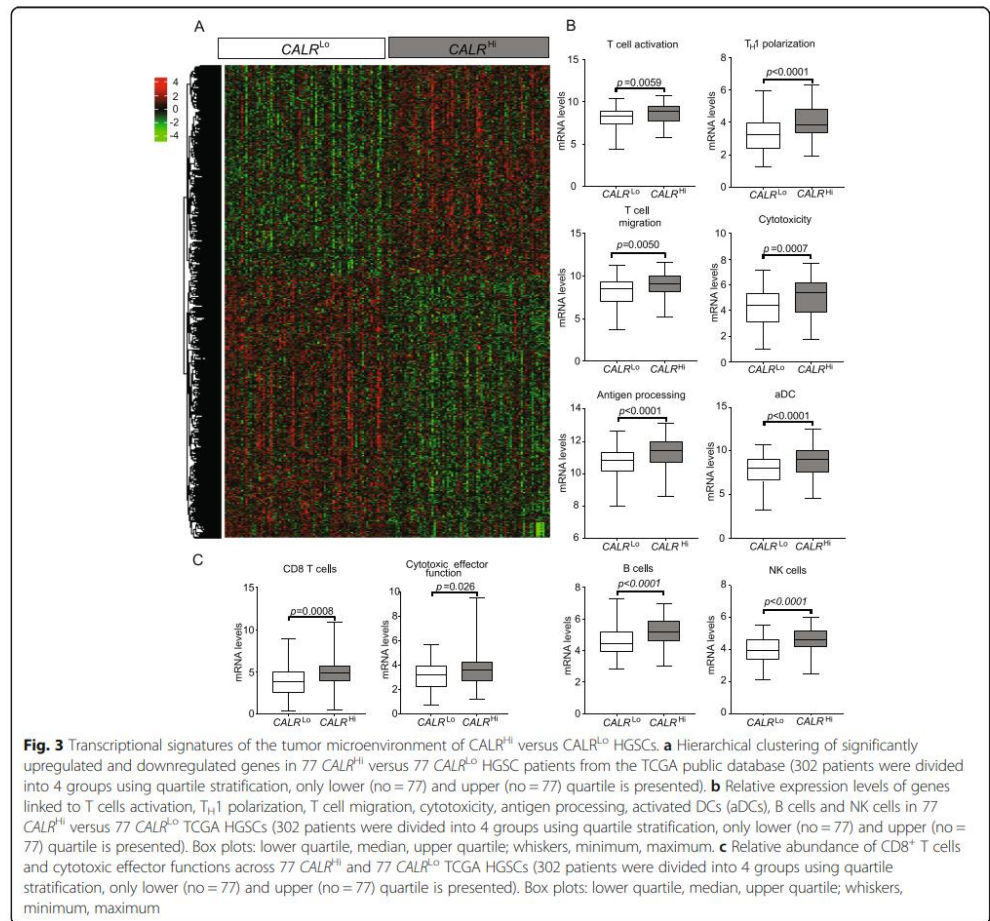
High *CALR* levels are associated with a T_H1 -polarized, cytotoxic $CD8^+$ T-cell response

To characterize the impact of *CALR* expression on the composition and functional polarization of the HGSC immune infiltrate, we compared transcriptional signatures of 77 *CALR*^{Hi} patients and 77 *CALR*^{Lo} patients from the TCGA database. We identified a set of 1563 genes that were significantly over-represented in *CALR*^{Hi} PTs as compared to their *CALR*^{Lo} counterparts (Fig. 3a) (Additional file 1: Table S6). Bioinformatic analyses revealed a strong association between such DEGs and T cell activation, T_H1 polarization, T cell migration, cytotoxicity, antigen processing, dendritic cell (DC) activation as well as B and natural killer (NK) cell function (Fig. 3b and Additional file 1: Figure S6A; Table S7). Alongside, we used the MCP-counter R package to estimate the relative abundance of different immune cell population in the TME of *CALR*^{Hi} versus *CALR*^{Lo} patients. Compared to their *CALR*^{Lo} counterparts, *CALR*^{Hi} PTs exhibited were enriched in gene sets specific for $CD8^+$ T cells ($p = 0.008$) and cytotoxic effector functions

($p = 0.026$) (Fig. 3c; Additional file 1: Table S5). To further characterize the impact of *CALR* expression on the composition of the immune infiltrate in HGSC metastases, we used RNAseq to characterize the expression profile of 13 *CALR*^{Lo} versus 11 *CALR*^{Hi} patients from Study Group 1. We identified a set of 406 genes that were significantly overrepresented in samples from *CALR*^{Hi} patients as compared to their *CALR*^{Lo} counterparts (Additional file 1: Figure S6B). Bioinformatic analyses revealed a strong association between such DEGs with B cell-dependent immunity and complement activation (Additional file 1: Figure S6C). Thus, in both primary and metastatic HGSC samples, high *CALR* levels are associated with biomarkers of a T_H1 -polarized, cytotoxic immune response.

CALR expression is associated with HGSC infiltration by activated DCs and B cells

Surface-exposed *CALR* acts as a pro-phagocytic signal for antigen-presenting cells (APCs), promoting the efficient uptake of dying cells in the context of immunostimulatory signals [28]. As we observed a positive correlation between *CALR* levels and the levels of several transcripts associated with DC and B cell activation (Fig. 3b), we set to evaluate the abundance of mature DC-LAMP⁺ DCs and CD20⁺ B cells in PT lesions from HGSC patients (Fig. 4a). We found a higher density of mature DC-LAMP⁺ DCs and CD20⁺ B

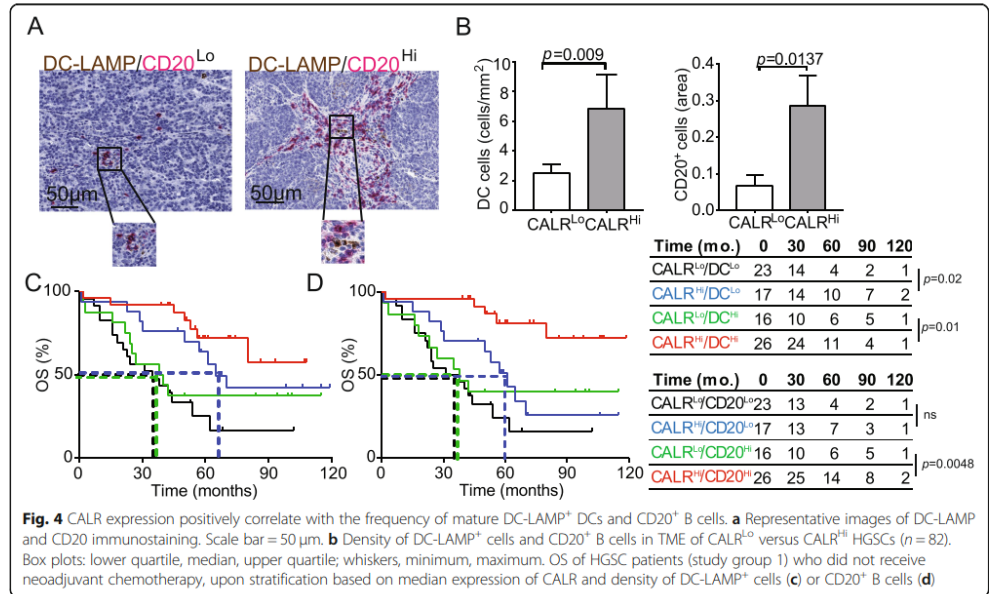


cells in the TME of CALR^{Hi} patients compared to their CALR^{Lo} counterparts (DC-LAMP: $p = 0.009$; CD20: $p = 0.0137$) (Fig. 4B). Using biomolecular analyses, we demonstrated that the expression of C-C motif chemokine ligand 4 (*CCL4*), *CCL5*, *CCL7*, *CCL8*, *CCL13*, *CCL23*, *CCL25* and C-X-C motif chemokine ligand 5 (*CXCL5*), *CXCL6*, *CXCL9*, *CXCL10*, *CXCL11*, *CXCL13* and *CXCL17* is more pronounced in CALR^{Hi} samples as compared to their CALR^{Lo} counterparts (Additional file 1: Figure S7A). Bioinformatic analyses revealed that such DEGs are mainly involved in tumor infiltration by lymphocytes and leukocytes chemotaxis and migration (Additional file 1: Figure S7B). Tumor infiltration by mature DC-LAMP⁺ DCs and CD20⁺ B cells impact disease outcome in chemotherapy-naïve patients with HGSC undergoing surgical tumor resection

[16]. Indeed, stratifying patients from Study Group 1 into four subsets based on CALR score and the frequency of tumor-infiltrating DC-LAMP⁺ DCs (Fig. 4c) or CD20⁺ B cells (Fig. 4d) revealed a superior survival for CALR^{Hi} patients as compared to their CALR^{Lo} amongst all patients subgroups (DC-LAMP^{Hi}: $p = 0.01$; DC-LAMP^{Lo}: $p = 0.02$; CD20^{Hi}: $p = 0.0048$; CD20^{Lo}: $p = 0.06$). These results suggest that CALR expression can be harnessed to ameliorate the prognostic stratification of patients with HGSC based on DC-LAMP and CD20 only.

CALR levels are associated with HGSC infiltration by IFN- γ producing CD8⁺ T cells

CALR expression has been positively correlated with CD8⁺ T cell infiltration in multiple human tumors, but



not HGSC [25]. Moreover, little is known on the potential links between CALR levels and tumor infiltration by NK cells [29]. Driven by these premises and by the transcriptional signature of *CALR*^{Hi} versus *CALR*^{Lo} patients, we decided to investigate PT and MT samples from Study Group 1 for CD8⁺ T cell and NK cell infiltration by IHC (Fig. 5a, b). We observed a higher density of CD8⁺ T cells in PT samples from *CALR*^{Hi} patients as compared to their *CALR*^{Lo} counterparts ($p = 0.0078$) (Fig. 5c). A similar trend that failed to reach statistical significance was documented for MT samples (Additional file 1: Figure S8A). Conversely, CALR expression had no impact on the abundance of NK cells in PT (Fig. 5d) and MT (Additional file 1: Figure S8B) samples. To address the functional capacity of CD8⁺ T cells from the TME of *CALR*^{Hi} versus *CALR*^{Lo} patients, we used flow cytometry on freshly resected PTs. Non-specific stimulation caused a more pronounced increase in CD8⁺ T cells staining positively for the effector molecule interferon gamma (IFN γ) alone ($p = 0.005$) or together with the cytolytic enzyme granzyme B (GZMB) ($p = 0.004$) in *CALR*^{Hi} versus *CALR*^{Lo} samples (Fig. 5e). In line with this notion, the mRNA levels of *IFNG*, *GZMB*, *GZMA*, *GZMM*, *GZMH*, and granulysin (*GNLY*, coding for yet another effector molecule of T cells) are higher in *CALR*^{Hi} patients from the TCGA database as compared to their *CALR*^{Lo} counterparts (Fig. 5f). Univariate and multivariate Cox analyses confirmed prior observations from us and

others [16, 30] indicating that high densities of CD8⁺ T cells have a positive impact on the OS of patients with HGSC (Tables 2 and 3). Next, we assessed the combined prognostic impact of CALR expression and CD8⁺ T cells by stratifying patients from Study Group 1 based on CALR score and median CD8⁺ T cell density into 4 subgroups (*CALR*^{Hi}/*CD8*^{Hi}, *CALR*^{Lo}/*CD8*^{Hi}, *CALR*^{Hi}/*CD8*^{Lo}, *CALR*^{Lo}/*CD8*^{Lo}). We were unable to document a statistically significant difference in the survival of *CALR*^{Hi}/*CD8*^{Lo} patients as compared to their *CALR*^{Lo}/*CD8*^{Lo} counterparts (Fig. 5g). However, *CALR*^{Hi}/*CD8*^{Hi} patients had a robust survival advantage over their *CALR*^{Lo}/*CD8*^{Hi} counterparts ($p = 0.001$) (Figs. 5g), indicating that CALR expression can be employed to identify HGSC patients with extensive tumor infiltration by CD8⁺ T cells but relatively poor disease outcome.

As we observed a positive correlation between CALR levels and tumor infiltration by diverse immune cell subsets, we next evaluated the global immunological profile of the TME of *CALR*^{Lo} versus *CALR*^{Hi} PT samples from Study Group 1 by IHC. This approach identified 4 different clusters of patients corresponding to high versus low CALR expression in the context of elevated versus reduced tumor infiltration by DC-LAMP⁺ mature DCs, CD20⁺ B cells and CD8⁺ T cells (Immune^{Hi} and Immune^{Lo}, respectively) (Fig. 5h). Importantly, CALR status improved the prognostic assessment on RFS and OS amongst both Immune^{Hi} (RFS: $p = 0.01$; OS: $p = 0.01$)

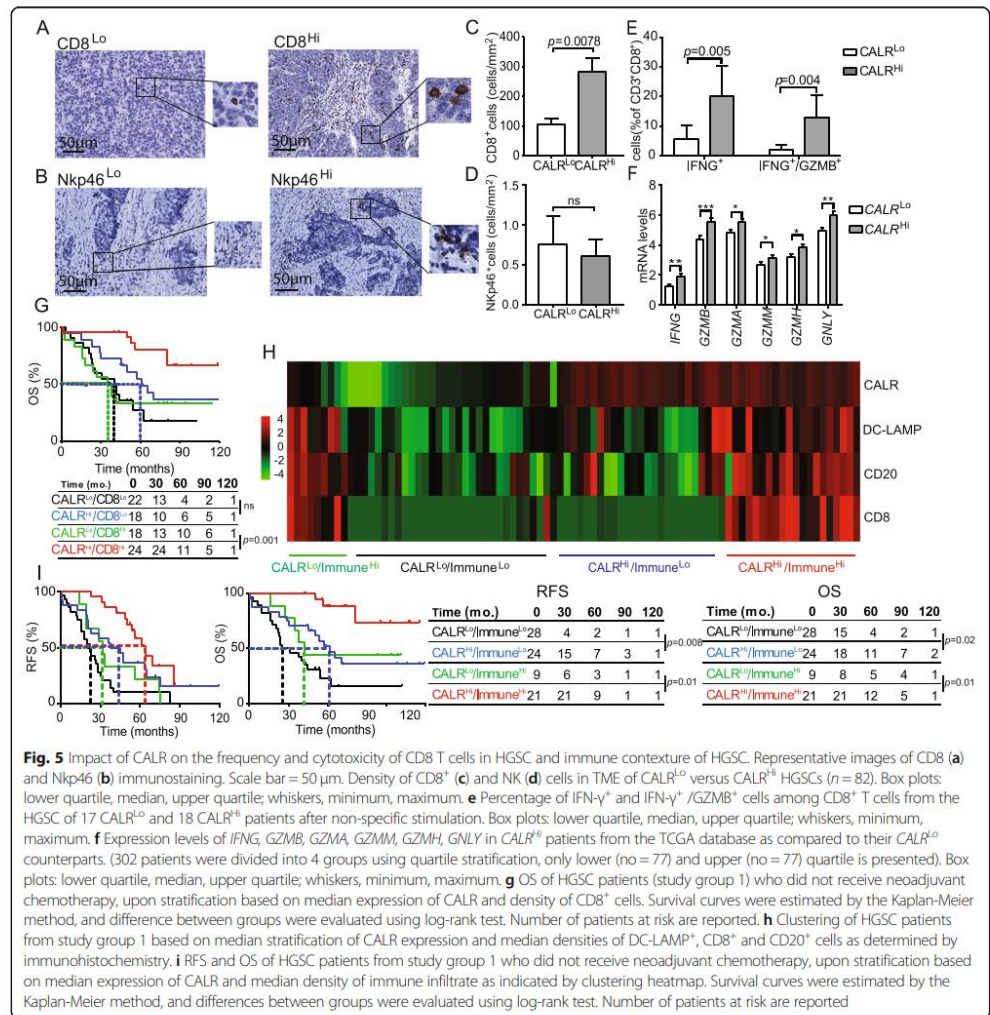


Fig. 5 Impact of CALR on the frequency and cytotoxicity of CD8 T cells in HGSC and immune contexture of HGSC. Representative images of CD8 (a) and Nkp46 (b) immunostaining. Scale bar = 50 μ m. Density of CD8⁺ (c) and NK (d) cells in TME of CALR^{Lo} versus CALR^{Hi} HGSCs (n = 82). Box plots: lower quartile, median, upper quartile; whiskers, minimum, maximum. e Percentage of IFN- γ ⁺ and IFN- γ ⁺/GZMB⁺ cells among CD8⁺ T cells from the HGSC of 17 CALR^{Lo} and 18 CALR^{Hi} patients after non-specific stimulation. Box plots: lower quartile, median, upper quartile; whiskers, minimum, maximum. f Expression levels of *IFNG*, *GZMB*, *GZMA*, *GZMM*, *GZMH*, *GNLY* in CALR^{Hi} patients from the TCGA database as compared to their CALR^{Lo} counterparts. (302 patients were divided into 4 groups using quartile stratification, only lower (no = 77) and upper (no = 77) quartile is presented). Box plots: lower quartile, median, upper quartile; whiskers, minimum, maximum. g OS of HGSC patients (study group 1) who did not receive neoadjuvant chemotherapy, upon stratification based on median expression of CALR and density of CD8⁺ cells. Survival curves were estimated by the Kaplan-Meier method, and difference between groups were evaluated using log-rank test. Number of patients at risk are reported. h Clustering of HGSC patients from study group 1 based on median stratification of CALR expression and median densities of DC-LAMP⁺, CD8⁺ and CD20⁺ cells as determined by immunohistochemistry. i RFS and OS of HGSC patients from study group 1 who did not receive neoadjuvant chemotherapy, upon stratification based on median expression of CALR and median density of immune infiltrate as indicated by clustering heatmap. Survival curves were estimated by the Kaplan-Meier method, and differences between groups were evaluated using log-rank test. Number of patients at risk are reported

and Immune^{Lo} (RFS: $p = 0.008$; OS: $p = 0.02$) patient subgroups (Fig. 5i). Altogether, our findings document a robust independent prognostic value for CALR levels of chemotherapy-naïve patients with HGSC, linked to the impact of CALR on the establishment of a T_H1-polarized TME that supports anticancer immunity.

Discussion

Despite recent developments in diagnostic and treatment modalities leading to an improvement in the short-term survival of patients with ovarian cancer, most of patients

are diagnosed at advanced stage of the disease with metastatic spreading, due to the non-specific symptoms and the absence of effective screening methods [31]. Therefore, there is an urgent need for new diagnostic, including prognostic and predictive biomarkers and therapeutic tools for a clinical management of cancer patients, which still represents the principal cause of mortality from gynecologic malignancies. Accumulating preclinical and clinical evidence indicates that DAMPs and DAMP-associated processes impact disease outcome in patients with various malignancies [25]. In particular,

the prognostic relevance of CALR expression levels or exposure on the membrane of cancer cells has been investigated by us and others in the context of multiple malignancies [10–13, 32–34]. Nevertheless, the influence of CALR levels on the composition and functional orientation of the immune infiltrate of HGSCs and their link with disease outcome in chemotherapy-naïve patients remain have not been elucidated until now.

As documented in numerous *in vitro* and *in vivo* models, ecto-CALR serves as a signal to facilitate the engulfment of tumor cells by DCs, which leads to tumor antigen presentation and stimulation tumor-specific cytotoxic T lymphocytes responses [35, 36]. Here, we analyzed 3 different cohorts of primary and metastatic samples from patients with HGSCs who did not receive chemotherapy prior to tumor resection. By combining IHC and biomolecular analyses, we demonstrated that a high CALR expression is strongly associated with higher density of both mature DC-LAMP⁺ DCs and CD20⁺ B cells resulting in T_H1-polarized immune contexture that acquired effector functions. These findings recapitulate previous findings by us and others demonstrating that CALR exposure by neoplastic cells is associated with increased tumor infiltration by myeloid cells and effector memory CD8⁺ T cells in patients with NSCLC [12], increased frequency of T cells in TME of colorectal carcinoma [10] and increased proportion of LAA-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells in patients with AML [13]. Moreover, here we observed correlation between high CALR expression in the TME and higher cytotoxic functions of effector tumor infiltrating CD8⁺ T cells and NK cells, although the number of later population was not significantly increased in CALR^{Hi} patients, suggesting the impact of CALR exposure on enhanced NK cell cytotoxic and secretory functions. These results are in line with our recent findings demonstrating that spontaneous CALR exposure on malignant blasts supports innate anticancer immunity by NK cells via an indirect mechanism relying on myeloid CD11c⁺CD14⁺ cells resulting in overall superior survival of AML patients [37, 38]. Altogether, we demonstrated that high CALR levels bear independent positive prognostic value and hence can be harnessed to improve patient stratification based on previously identified factors including DC-LAMP⁺ DC, CD20⁺ B cell and CD8⁺ T cell infiltration. These findings extend previous data by us and others on the improved immunological functions linked to increased CALR levels in the context of AML [13], NSCLC [12] and CRC [10].

We also demonstrate that CALR is expressed by HGSC cells independent of standard-of-care chemotherapy, possibly reflecting malignant transformation itself [39] and/or the limited immunogenicity of carboplatin-based chemotherapy [40]. Accordingly, we identified a

robust correlation between CALR expression and 3 distinct genes involved in ER stress responses in two independent HGSC patient cohorts. Similar observations have been made by us and others in the context of AML [13, 41] and NSCLC [12]. Interestingly, we also identified a significant decreased in CALR expression in samples from advanced stages of disease, which is in line with the notion that progressing tumors tend to lose both antigenicity and adjuvanticity [3, 5, 42].

In conclusion, CALR stand out as a robust prognostic biomarker for chemotherapy-naïve patients with HGSC. It can be speculated that CALR^{Lo} patients would benefit from neoadjuvant or adjuvant chemotherapeutic regimens that are known to drive robust ER stress responses in the context of ICD, such as oxaliplatin, doxorubicin and other anthracyclines [6]. As ovarian cancer still represents one of the top 5 leading causes of cancer-related death amongst women in the US (source <https://www.cdc.gov/cancer/uscs/index.htm>), clinical trials specifically addressing this possibility are urgently awaited.

Supplementary information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0781-z>.

Additional file 1: Figure S1. Experimental design of the study. **Figure S2.** Representative images of CALR immunostaining. Scale bar = 100 μm. **Figure S3.** Flow cytometry-assisted quantification of surface exposed CALR. **Figure S4.** Degranulation and IFN-γ production after *in vitro* stimulation. **Figure S5.** Prognostic impact of CALR expression in the metastatic TME of HGSC patients and impact of chemotherapy on the final CALR exposure. **Figure S6.** Transcriptional signatures of the tumor microenvironment of CALR^{Lo} versus CALR^{Hi} PT and MT samples of HGSCs patients. **Figure S7.** Chemokine signatures of the tumor microenvironment of CALR^{Hi} versus CALR^{Lo} of HGSCs patients. **Figure S8.** Impact of CALR on the frequency of CD8⁺ T cells and Nkp46⁺ NK cells in MT samples of HGSC patients. **Table S1.** Main clinical and biological characteristics of 45 HGSC patients after neo-adjuvant chemotherapy treatment (study group 2) (University Hospital Hradec Kralove). **Table S2.** Main clinical and biological characteristics of 35 HGSC patients without neo-adjuvant chemotherapy treatment prospectively collected (study group 3) (University Hospital Motol). **Table S3.** The list of antibodies use for IHC staining. **Table S4.** The list of antibodies used for flow cytometry. **Table S5.** The list of genes used by MCP counter for identification of distinct cell populations. **Table S6.** List of genes significantly overrepresented in CALR^{Hi} versus CALR^{Lo} HGSC samples from TCGA public database. **Table S7.** List of genes in boxplot significantly overrepresented in CALR^{Hi} versus CALR^{Lo} HGSC samples from TCGA public database.

Acknowledgments

Not applicable.

Conflict-of-interest disclosure

LG provides remunerated consulting to OmniSEQ (Buffalo, NY, USA), Astra Zeneca (Gaithersburg, MD, USA), VL47 (New York, NY, USA) and the Luke Heller TECPR2 Foundation (Boston, MA, USA), and he is member of the Scientific Advisory Committee of OmniSEQ (Buffalo, NY, USA). Dr. Kroemer reports grants and personal fees from Bayer Healthcare and grants from Genentech, Glaxo Smyth Kline, Lytix Pharma, PharmaMar, Sotio and Vasculox. He is member of the executive board of Bristol Myers Squibb Foundation France, as well as scientific co-founder of everImmune and Samsara therapeutics, outside of the submitted work.

Authors' contributions

Concept and design: PS, JL, AR, LG, RS, JF; development of the methodology: LK, MH, IT; acquisition of the data: LK, MH, IT, LB, JF; analysis and interpretation of the data: LK, MH, IT, PS, JL, IP, SV, MH, TB, LR, JP, JK; preparation, review, and/or revision of the manuscript and Figs: LK, MH, IC, LG, GK, RS, JF; study supervision: LR, RS, JF. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This study was supported by Sotio, Prague, Czech Republic; by the program PROGRES Q40/11 and PROGRES 28 (Oncology), by the project BBMRI-CZ LM2015089 and by the European Regional Development Fund-Project BBMRI-CZ: Biobank network – a versatile platform for research on the etio-pathogenesis of diseases, No: EF16 013/0001674. LG is supported by a Break-through Level 2 grant from the US Department of Defense (DoD), Breast Cancer Research Program (BRCP) (#BC180476P1), by a startup grant from the Dept. of Radiation Oncology at Weill Cornell Medicine (New York, US), by industrial collaborations with Lytix (Oslo, Norway) and Phosplatin (New York, US), and by donations from Phosplatin (New York, US), the Luke Heller TECPR2 Foundation (Boston, US) and Sotio a.s. (Prague, Czech Republic).

Availability of data and materials

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Ethics approval and consent to participate

The study was approved by the ethics committees at the University Hospital Motol and University Hradec Kralove in accordance with Czech law.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

LG provides remunerated consulting to OmniSEQ (Buffalo, NY, USA), Astra Zeneca (Gaithersburg, MD, USA), VL47 (New York, NY, USA) and the Luke Heller TECPR2 Foundation (Boston, MA, USA). All other authors have no financial interests to disclose.

Author details

¹Department of Immunology, Charles University, 2nd Faculty of Medicine and University Hospital Motol, V Uvalu 84, 150 00 Prague 5, Czech Republic. ²Sotio, Prague, Czech Republic. ³Department of Pathology and Molecular Medicine, Charles University, 2nd Faculty of Medicine and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic. ⁴The Fingerland Department of Pathology, Charles University, Faculty of Medicine and University Hospital, Hradec Kralove, Czech Republic. ⁵Department of Gynecology and Obstetrics, Charles University, Faculty of Medicine and University Hospital, Hradec Kralove, Czech Republic. ⁶Department of Gynecology and Obstetrics, Charles University, 3rd Faculty of Medicine and University Hospital Kralovske Vinohrady, Prague, Czech Republic. ⁷Department of Gynecology and Obstetrics, Charles University, 2nd Faculty of Medicine and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic. ⁸Department of Gynecology and Obstetrics, Faculty of Medicine and University Hospital Plzen, Pilsen, Czech Republic. ⁹Inflammation, Complement and Cancer, INSERM, U1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France. ¹⁰Sorbonne Université, Paris, France. ¹¹Université Paris Descartes, Paris, France, Paris, France. ¹²Metabolomics and Cell Biology Platforms, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France. ¹³Pôle de Biologie, Hôpital Européen Georges Pompidou, AP-HP, Paris, France. ¹⁴Suzhou Institute for Systems Biology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou, China. ¹⁵Karolinska Institute, Department of Women's and Children's Health, Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden. ¹⁶Department of Radiation Oncology, Weill Cornell Medical College, New York, NY, USA. ¹⁷Sandra and Edward Meyer Cancer Center, New York, NY, USA. ¹⁸Department of Dermatology, Yale School of Medicine, New Haven, CT, USA.

Received: 8 July 2019 Accepted: 22 October 2019

References

1. Becht E, Giraldo NA, Dieu-Nosjean MC, Sautes-Fridman C, Fridman WH. Cancer immune contexture and immunotherapy. *Curr Opin Immunol*. 2016; 39:7–13.
2. Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*. 2012;12: 298–306.
3. Schumacher TN, Schreiber RD. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science*. 2015;348:69–74.
4. Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature*. 2017;541:321–30.
5. Galluzzi L, Yamazaki T, Kroemer G. Linking cellular stress responses to systemic homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19:731–45.
6. Galluzzi L, Buque A, Kepp O, Zitvogel L, Kroemer G. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. *Nat Rev Immunol*. 2017;17:97–111.
7. Yatim N, Cullen S, Albert ML. Dying cells actively regulate adaptive immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2017;17:262–75.
8. Krysko DV, Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Agostinis P, Vandenabeele P. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2012;12:860–75.
9. Pol J, Vacchelli E, Aranda F, Castoldi F, Eggermont A, Cremer I, et al. Trial watch: immunogenic cell death inducers for anticancer chemotherapy. *Oncimmunology*. 2015;4:e1008866.
10. Peng RQ, Chen YB, Ding Y, Zhang R, Zhang X, Yu XJ, et al. Expression of calreticulin is associated with infiltration of T-cells in stage IIIb colon cancer. *World J Gastroenterol*. 2010;16:2428–34.
11. Stoll G, Iribarren K, Michels J, Leary A, Zitvogel L, Cremer I, et al. Calreticulin expression: interaction with the immune infiltrate and impact on survival in patients with ovarian and non-small cell lung cancer. *Oncimmunology*. 2016;5:e1177692.
12. Fucikova J, Becht E, Iribarren K, Goc J, Remark R, Damotte D, et al. Calreticulin expression in human non-small cell lung cancers correlates with increased accumulation of antitumor immune cells and favorable prognosis. *Cancer Res*. 2016;76:1746–56.
13. Fucikova J, Truxova I, Hensler M, Becht E, Kasikova L, Moserova I, et al. Calreticulin exposure by malignant blasts correlates with robust anticancer immunity and improved clinical outcome in AML patients. *Blood*. 2016;128: 3113–24.
14. Meinhold-Heerlein I, Fotopoulou C, Harter P, Kurzeder C, Mustea A, Wimberger P, et al. The new WHO classification of ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer and its clinical implications. *Arch Gynecol Obstet*. 2016;293:695–700.
15. O'Sullivan B, Brierley J, Byrd D, Bosman F, Kehoe S, Kossary C, et al. The TNM classification of malignant tumours-towards common understanding and reasonable expectations. *Lancet Oncol*. 2017;18:849–51.
16. Truxova I, Kasikova L, Hensler M, Skapa P, Laco J, Pecan L, et al. Mature dendritic cells correlate with favorable immune infiltrate and improved prognosis in ovarian carcinoma patients. *J Immunother Cancer*. 2018;6:139.
17. Goc J, Germain C, Vo-Bourgeois TK, Lupo A, Klein C, Knockaert S, et al. Dendritic cells in tumor-associated tertiary lymphoid structures signal a Th1 cytotoxic immune contexture and license the positive prognostic value of infiltrating CD8+ T cells. *Cancer Res*. 2014;74:705–15.
18. Platonova S, Cherfils-Vicini J, Damotte D, Crozet L, Vieillard V, Validire P, et al. Profound coordinated alterations of intratumoral NK cell phenotype and function in lung carcinoma. *Cancer Res*. 2011;71:5412–22.
19. Germain C, Gnjatich S, Tamzait F, Knockaert S, Remark R, Goc J, et al. Presence of B cells in tertiary lymphoid structures is associated with a protective immunity in patients with lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;189:832–44.
20. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:e47.
21. Gu Z, Eils R, Schlesner M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics*. 2016;32: 2847–9.
22. Bindea G, Mlecnik B, Hackl H, Charoentong P, Tosolini M, Kirilovsky A, et al. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics*. 2009;25:1091–3.

23. Becht E, Giraldo NA, Lacroix L, Buttard B, Elarouci N, Petitprez F, et al. Estimating the population abundance of tissue-infiltrating immune and stromal cell populations using gene expression. *Genome Biol.* 2016;17:218.
24. Panaretakis T, Kepp O, Brockmeier U, Tesniere A, Bjorklund AC, Chapman DC, et al. Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *EMBO J.* 2009;28:578–90.
25. Fucikova J, Moserova I, Urbanova L, Bezu L, Kepp O, Cremer I, et al. Prognostic and predictive value of DAMPs and DAMP-associated processes in Cancer. *Front Immunol.* 2015;6:402.
26. Hetz C, Papa FR. The unfolded protein response and cell fate control. *Mol Cell.* 2018;69:169–81.
27. Ray-Coquard I, Morice P, Lorusso D, Prat J, Oaknin A, Pautier P, et al. Non-epithelial ovarian cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2018;29:iv1–iv18.
28. Gardai SJ, McPhillips KA, Frasch SC, Janssen WJ, Starefeldt A, Murphy-Ullrich JE, et al. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell.* 2005;123:321–34.
29. Lopez-Soto A, Gonzalez S, Smyth MJ, Galluzzi L. Control of metastasis by NK cells. *Cancer Cell.* 2017;32:135–54.
30. Nielsen JS, Sahota RA, Milne K, Kost SE, Nesslinger NJ, Watson PH, et al. CD20+ tumor-infiltrating lymphocytes have an atypical CD27- memory phenotype and together with CD8+ T cells promote favorable prognosis in ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2012;18:3281–92.
31. Torre LA, Trabert B, DeSantis CE, Miller KD, Samimi G, Runowicz CD, et al. Ovarian cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 2018;68:284–96.
32. Hsu WM, Hsieh FJ, Jeng YM, Kuo ML, Chen CN, Lai DM, et al. Calreticulin expression in neuroblastoma—a novel independent prognostic factor. *Ann Oncol.* 2005;16:314–21.
33. Matsukuma S, Yoshimura K, Ueno T, Oga A, Inoue M, Watanabe Y, et al. Calreticulin is highly expressed in pancreatic cancer stem-like cells. *Cancer Sci.* 2016;107:1599–609.
34. Muth C, Rubner Y, Semrau S, Ruhle PF, Frey B, Strnad A, et al. Primary glioblastoma multiforme tumors and recurrence: Comparative analysis of the danger signals HMGB1, HSP70, and calreticulin. *Strahlentherapie und Onkologie: Organ der Deutschen Röntgengesellschaft [et al.].* 2016;192:146–55.
35. Martins I, Kepp O, Galluzzi L, Senovilla L, Schlemmer F, Adjemian S, et al. Surface-exposed calreticulin in the interaction between dying cells and phagocytes. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1209:77–82.
36. Vacchelli E, Vitale I, Eggermont A, Fridman WH, Fucikova J, Cremer I, et al. Trial watch: dendritic cell-based interventions for cancer therapy. *Oncoimmunology.* 2013;2:e25771.
37. Truxova I, Kasikova L, Salek C, Hensler M, Lysak D, Holicek P, Bilkova P, Holubova M, Chen X, Mikyskova R, Reinis M, Kovar M, Tomalova B, Kline J, Galluzzi L, Spisek R, Fucikova J. Calreticulin exposure on malignant blasts correlates with improved NK cell-mediated cytotoxicity in AML patients. *Haematologica.* 2019; in press.
38. Fucikova J, Kline J, Galluzzi L, Spisek R. Calreticulin arms NK cells against leukemia. *Oncoimmunology.* 2019; in press.
39. Bettigole SE, Glimcher LH. Endoplasmic reticulum stress in immunity. *Annu Rev Immunol.* 2015;33:107–38.
40. Bezu L, Gomes-de-Silva LC, Dewitte H, Breckpot K, Fucikova J, Spisek R, et al. Combinatorial strategies for the induction of immunogenic cell death. *Front Immunol.* 2015;6:187.
41. Wemeau M, Kepp O, Tesniere A, Panaretakis T, Flament C, De Botton S, et al. Calreticulin exposure on malignant blasts predicts a cellular anticancer immune response in patients with acute myeloid leukemia. *Cell Death Dis.* 2010;1:e104.
42. Vitale I, Sistigu A, Manic G, Rudqvist NP, Trajanoski Z, Galluzzi L. Mutational and Antigenic Landscape in Tumor Progression and Cancer Immunotherapy. *Trends Cell Biol.* 2019;29(5):396–416.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



8.2 *Přítomnost aktivovaných dendritických buňky koreluje s vyšší infiltrací imunitních buněk a lepší prognózou pacientek s ovariálním karcinomem*

TME představuje vysoce organizovanou strukturu, která hraje zásadní roli v podpoře růstu, proliferaci a schopnosti maligních buněk tvořit metastatická ložiska. TME je tvořeno převážně z endoteliálních, epiteliálních a stromálních buněk, ale také z buněk imunitního systému. Složení TME je značně heterogenní nejen mezi jednotlivými nádorovými malignitami, ale také mezi jednotlivými pacienty. Z výsledků preklinických studií je zřejmé, že jak složky imunitního systému, tak neimunologické komponenty TME plní prognostickou i prediktivní roli v terapii pacientů. Zvláště CD8⁺ T lymfocyty infiltrující do nádoru hrají podstatnou roli v nádorově specifické imunitě a jsou silně asociované s lepší prognózou pacientek s karcinomem ovaria. Nicméně role aktivovaných DC v TME karcinomu ovaria nebyla dosud jednoznačně popsána.

V této studii jsme sledovali zastoupení aktivovaných DC infiltrujících do nádoru pomocí znaku DC-LAMP ve třech nezávislých kohortách pacientek s HGSC. Zjistili jsme, že vyšší infiltrace DC-LAMP⁺ DC koreluje s přítomností CD20⁺ B lymfocytů, cytotoxických CD8⁺ T lymfocytů a NK buněk v TME. Z našich výsledků také vyplývá, že přítomnost jak aktivovaných DC, tak zastoupení CD20⁺ B lymfocytů zásadním způsobem ovlivňuje výsledné složení imunitního infiltrátu a výslednou cytotoxickou odpověď přítomných CD8⁺ T lymfocytů a NK buněk. Z výsledků imunohistochemické a cytometrické analýzy a celogenomového sekvenování vyplývá, že vyšší zastoupení DC-LAMP⁺ DC v TME je asociováno s Th1 a cytotoxickou odpovědí a lepší prognózou onemocnění.

Autorka v této práci přispěla:

- Optimalizace imunohistochemických protokolů využitých v rámci této studie
- Retrospektivní imunohistochemická analýza zastoupení CD8⁺ T lymfocytů v nádorové tkáni
- Prospektivní analýza nádorové tkáně – zpracování čerstvé nádorové tkáně a multiparametrická cytometrická analýza vzorků
- Příprava manuskriptu pod vedením školitele

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Mature dendritic cells correlate with favorable immune infiltrate and improved prognosis in ovarian carcinoma patients

Iva Truxova^{1,2†}, Lenka Kasikova^{1,2†}, Michal Hensler², Petr Skapa³, Jan Laco⁴, Ladislav Pecen², Lucie Belicova², Ivan Praznovec⁵, Michael J. Halaska⁶, Tomas Brtnicky⁷, Eva Salkova³, Lukas Rob⁶, Roman Kodet³, Jeremy Goc^{8,9,10}, Catherine Sautes-Fridman^{8,9,10}, Wolf Herman Fridman^{8,9,10}, Ales Ryska⁴, Lorenzo Galluzzi^{10,11,12}, Radek Spisek^{1,2} and Jitka Fucikova^{1,2*}

Abstract

A high density of tumor-infiltrating CD8⁺ T cells and CD20⁺ B cells correlates with prolonged survival in patients with a wide variety of human cancers, including high-grade serous ovarian carcinoma (HGSC). However, the potential impact of mature dendritic cells (DCs) in shaping the immune contexture of HGSC, their role in the establishment of T cell-dependent antitumor immunity, and their potential prognostic value for HGSC patients remain unclear. We harnessed immunohistochemical tests and biomolecular analyses to demonstrate that a high density of tumor-infiltrating DC-LAMP⁺ DCs is robustly associated with an immune contexture characterized by T_H1 polarization and cytotoxic activity. We showed that both mature DCs and CD20⁺ B cells play a critical role in the generation of a clinically-favorable cytotoxic immune response in HGSC microenvironment. In line with this notion, robust tumor infiltration by both DC-LAMP⁺ DCs and CD20⁺ B cells was associated with most favorable overall survival in two independent cohorts of chemotherapy-naïve HGSC patients. Our findings suggest that the presence of mature, DC-LAMP⁺ DCs in the tumor microenvironment may represent a novel, powerful prognostic biomarker for HGSC patients that reflects the activation of clinically-relevant anticancer immunity.

Keywords: Dendritic cells, DC-LAMP, CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes, Natural killer cells, Tertiary lymphoid structures

Introduction

Tumors emerge and evolve in the context of a complex metabolic, trophic and immunological crosstalk with cells of different types, including (but not limited to) epithelial, endothelial, stromal and immune cells [1, 2]. Thus, the microenvironment of solid malignancies exhibit a considerable degree of heterogeneity, not only across different types of disease, but also across the same tumor type in different patients or even different malignant lesions in the same individual [3]. Not surprisingly, both non-immunological and immunological components of the tumor microenvironment (TME) have been attributed

robust prognostic and/or predictive value in multiple cohorts of patients with cancer [4–8]. In particular, high levels of tumor-infiltrating CD8⁺ T lymphocytes (CTLs), which are key mediators of anticancer immunity, are strongly associated with prolonged survival in patients affected by various solid tumors including high-grade serous ovarian carcinoma (HGSC) [9–12]. Intriguingly, the majority of HGSCs containing high frequencies of CD8⁺ CTLs are also robustly infiltrated by CD20⁺ B cells [13], and patients whose tumors exhibit such an abundant co-infiltration have higher survival rates than patients with tumors that only contain high amounts of CD8⁺ CTLs [14, 15]. That said, the cellular mechanisms that govern the recruitment of CD8⁺ CTLs and CD20⁺ B cells to the microenvironment of HGSCs and their activation remain unclear.

It has previously been shown that CD8⁺ and CD20⁺ cells often co-localize in lymphoid aggregates of different

* Correspondence: fucikova@sotio.com

[†]Iva Truxova and Lenka Kasikova contributed equally to this work.

¹Department of Immunology, Charles University, 2nd Faculty of Medicine and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

²Sotio, Prague, Czech Republic

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2018 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

sizes and morphologies in the HGSC microenvironment [15]. These aggregates, which have previously been identified as tertiary lymphoid structures (TLSs), are known for their ability to initiate tumor-targeting immunity and for their positive prognostic value in patients with various tumor types [16–19]. TLSs harbor indeed prominent B-cell follicles adjacent to discrete zones containing CD4⁺ and CD8⁺ T cells, dendritic cells (DCs) and high endothelial venules [18, 20]. Since mature DCs selectively home to TLS, they constitute a reliable and specific marker of these structures [21, 22]. Nevertheless, the impact of mature DCs on the composition and functional orientation of the tumor infiltrate, their ability to drive T cell-dependent anticancer immunity, and their potential prognostic and predictive value in the setting of HGSC remain to be deciphered.

Here, we investigated the clinical impact of tumor infiltration by mature DCs in three independent cohorts of 81, 66 and 20 patients with resectable HGSC who did not receive neoadjuvant chemotherapy. Our data suggest that while both mature DC-LAMP⁺ DCs and CD20⁺ B cells participate in the generation of anticancer immunity, only the former are critical for licensing a CTL-dependent tumor-targeting immune response that translates into clinical benefit for HGSC patients.

Materials and methods

Patients

Study groups 1 and 2. Two retrospective series of 81 and 66 formalin-fixed paraffin-embedded (PFPE) samples were obtained from patients with HGSC who underwent primary surgery in the absence of neoadjuvant chemotherapy between 2008 and 2014 at University Hospital Hradec Kralove and University Hospital Motol (Czech Republic). Baseline characteristics of these patients are summarized in Table 1 and Additional file 1: Table S1, respectively.

Table 1 Main clinical and biological characteristics of 81 HGSC patients enrolled in the study (University Hospital Hradec Kralove)

Variable	Overall cohort (n = 81)
Age	
Mean age (y) ± SEM	61 ± 10
Range	31–84
pTNM stage	
Stage I	20 (24,5%)
Stage II	6 (7,4%)
Stage III and IV	55 (68,1%)
Debulking	
R0	38 (47,0%)
R1	11 (13,5%)
R2	32 (39,5%)
Vital status of patients	39 (47,5%)

Pathologic staging was performed according to the 8th TNM classification (2017), and histologic types were determined according to the current WHO classification [23, 24]. Data on long-term clinical outcome were obtained retrospectively by interrogation of municipality registers or the patient's families. **Study group 3.** An additional series of 20 samples from HGSC patients was prospectively collected at Hospital Motol (Czech Republic) (Additional file 1: Table S5). **Study group for NGS.** 18 HGSC patient samples collected at Hospital Motol (Czech Republic) were used for NGS data analysis (Additional file 1: Table S6). Written informed consent was obtained from patients before inclusion in the study. The protocol was approved by the local ethics committee.

Immunohistochemistry

Tumor specimens from study groups 1 and 2 were fixed in neutral buffered 10% formalin solution and embedded in paraffin as per standard procedures. Immunostaining with antibodies specific for lysosomal associated membrane protein 3 (LAMP3; best known as DC-LAMP), CD8, CD20 and natural cytotoxicity triggering receptor 1 (NCR1; best known as NKp46) (Additional file 1: Table S2) was performed according to conventional protocols. Briefly, tissue sections were deparaffinized, followed by antigen retrieval with Target Retrieval Solution (Leica) in EDTA pH 8 in preheated water bath (98 °C, 30 min). The sections were allowed to cool down to RT for 30 min, and endogenous peroxidase was blocked with 3% H₂O₂ for 15 min. Thereafter, sections were treated with protein block (DAKO) for 15 min and incubated with primary antibodies, followed by the revelation of enzymatic activity. Images were acquired using a Leica Aperio AT2 scanner (Leica).

Cell quantification

DC-LAMP⁺ cells were differentially quantified in the tumor stroma and tumor nests of the whole section with Calopix (Tribvn). The total number of CD8, NKp46 and CD20 density was analyzed on the entire tumor section of all 81 HGSC patients using Calopix software without further division for tumor stroma and tumor nest based on previous published protocols [14, 22, 25]. The NKp46 staining was performed based on previously optimized and published protocols [22, 25] and appropriate isotype controls were used throughout the study. The antibody against NKp46/NCR1 (R&D), clone 195,314 is suitable for immunohistochemistry analysis as indicated by manufacturer. Data are reported as absolute number of positive cells/mm² (for DC-LAMP⁺, CD8⁺ NKp46⁺ cells) or cell surface/total tumor section surface (for CD20⁺ cells), as previously described [14, 21]. TLS were enumerated in whole sections using upon assessment of co-localizing DC-LAMP⁺ and CD20⁺ B cells, as previously described

[14, 21]. Immunostaining and quantifications were reviewed by at least three independent observers (IT, LK, JF, PS, JL) and an expert pathologist (JL, PS).

Flow cytometry

Total live mononuclear cells were isolated from fresh tumor specimens, as previously described [26]. Mononuclear cells were stained with several panels of fluorescent primary antibodies (Additional file 1: Table S3) or appropriate isotype controls for 20 min at 4 °C in the dark, following by washing and acquisition on a Fortessa flow cytometer (BD Bioscience). Flow cytometry data were analyzed with the FlowJo software (TreeStar). Gating strategies are depicted in Additional file 1: Figure S3A and 3C.

Degranulation and IFN- γ production after in vitro stimulation

Mononuclear cells isolated from fresh tumor specimens were stimulated with 50 ng/mL phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) + 1 μ g/ml ionomycin in the presence of anti-CD107a FITC monoclonal antibody (BioLegend) for 1 h followed by 3 h incubation with brefeldin A (BioLegend). Unstimulated cells were used as control. Cells were then washed in PBS, stained with anti-CD45 PerCP (EXBIO), anti-CD3 Alexa Fluor 700 (EXBIO) or APC-eFluor780 (eBioscience), anti-CD4 ECD (Beckman Coulter), anti-CD8 HV500 (BD Biosciences) and anti-CD56 Alexa Fluor 700 (BioLegend) monoclonal antibodies, fixed in fixation/permeabilization buffer (eBioscience), permeabilized with permeabilization buffer (eBioscience) and stained with anti-IFN- γ PE-Cy7 (eBioscience), anti-granzyme B Brilliant Violet 421 (BD Biosciences) and anti-perforin APC (BioLegend) monoclonal antibodies. The percentage of CD3⁺CD8⁺ T cells and CD3⁺CD56⁺ NK cells producing IFN- γ and degranulating upon PMA/ionomycin stimulation were determined by flow cytometry. The data were analyzed with the FlowJo software package (Tree Star, Inc.).

NGS data analysis

Hierarchical clustering analysis was conducted for differentially expressed genes (DEGs) using the PHEATMAP package in R, based on The Euclidean distance and complete clustering method. GO, KEGG and REACTOME analyses were performed using ClueGo [27]. The MCP-counter R package was used to estimate the abundance of tissue-infiltrating immune cell populations [28].

Statistical analysis

Survival analysis was performed using the Survival R package, using both log-rank tests and Cox proportional hazard regressions. For log-rank tests, the prognostic value of continuous variables was assessed using median-based cutoffs. For Cox proportional hazard regressions, immune densities were log-transformed. Variables that

were not significantly associated with prognosis in univariate Cox regression (Wald test $p > 0.05$), as well as variables that were intrinsically correlated, were not included in multivariate Cox regressions. Fisher's exact tests, Student's t tests, and the Wilcoxon and Mann-Whitney tests were used to assess statistical significance, p values are reported (considered not significant when > 0.05).

Results

Prognostic impact of mature DC infiltration in HGSC

Tumor samples from a retrospective series of 81 patients with HGSC who did not receive neoadjuvant chemotherapy (Table 1), were analyzed for the density of DC-LAMP⁺ DCs by immunohistochemistry (IHC) (Additional file 1: Figure S1A). Although density was relatively heterogeneous across samples, mature DCs were mainly localized to the tumor stroma (median = 3.66 cells/mm²) rather than in direct apposition with tumor cell nests (median = 0.42 cells/mm²) (Additional file 1: Figure S1B). To evaluate the prognostic impact of DC-LAMP⁺ cells in this patient cohort, we stratified it based on median density of DC-LAMP⁺ cells in the tumor stroma and tumor nest, followed by retrospective RFS and OS analysis. Patients with high density of DC-LAMP⁺ cells (DC-LAMP^{Hi}) in the tumor stroma exhibited significantly longer RFS and OS as compared to their DC-LAMP^{Lo} counterparts (median RFS: 55 mo. versus 28 mo.; $p < 0.0001$; median OS; > 120 mo. versus 41 mo.; $p = 0.0002$) (Fig. 1 a, b). We also identified a trend toward improved OS (but not RFS) for HGSC patients with a high density of DC-LAMP⁺ DCs in tumor nests (Additional file 1: Figure S1C). Univariate Cox analysis confirmed the prognostic impact of mature DC infiltration in both the tumor stroma ($p = 0.0008$) and the tumor nest ($p = 0.018$) (Table 2). To validate these findings in an independent cohort, we evaluated the prognostic role of mature DCs in a group of 66 patients with HGSC who did not receive neoadjuvant chemotherapy (Additional file 1: Table S1). Also in this set of samples, DC-LAMP⁺ cells were mainly found in the tumor stroma compared to the tumor nest (data not shown). Moreover, low densities of DC-LAMP⁺ cells in the tumor stroma were also associated with an increased risk of relapse and poor prognosis in this cohort (Fig. 1c, d). Indeed, median OS was only 49 mo. for DC-LAMP^{Lo} patients, compared to > 120 mo. for their DC-LAMP^{Hi} counterparts (Fig. 1d). These results demonstrate that the presence of DC-LAMP⁺ cells in the tumor stroma constitutes a strong prognostic biomarker for the identification of HGSC patients with favorable disease outcome upon tumor resection, as confirmed by multivariate Cox analysis (Table 3).

To evaluate the density of mature DCs within TLSs as well as the prognostic impact of the latter, we quantified TLSs by examining the co-localization of DC-LAMP⁺

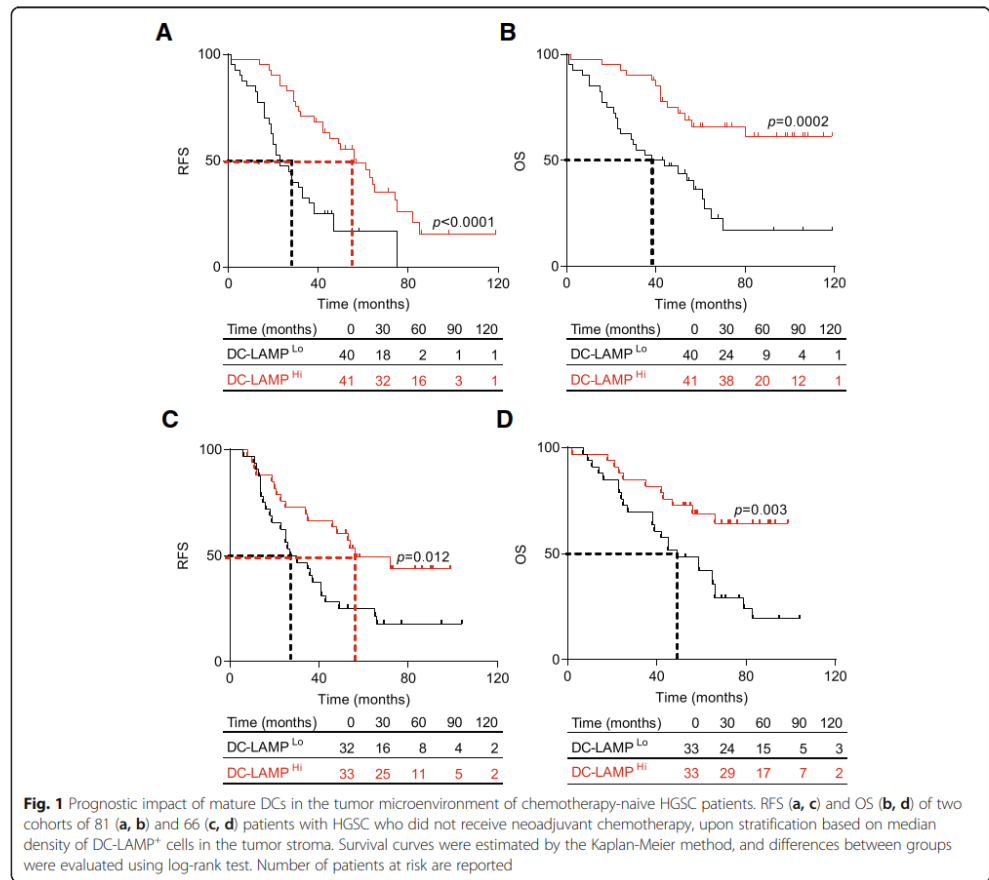


Table 2 Univariate Cox proportional hazard analysis

Variable	Overall survival HR (95% CI)	<i>p</i>
Age	1.03 (1.00–1.06)	0.045
CA125	1.23 (0.99–1.54)	0.058
CD8	0.78 (0.63–0.96)	0.022
CD20	0.09 (0.01–0.72)	0.023
DC-LAMP stroma	0.53 (0.37–0.77)	0.0008
DC-LAMP tumor	0.48 (0.27–0.88)	0.018
DC-LAMP summary	0.52 (0.34–0.81)	0.0037
Debulking	1.48 (1.07–2.03)	0.018
NKp46	0.57 (0.25–1.42)	0.24
Stage	2.03 (1.34–3.07)	0.0008

DCs with CD20⁺ B cells. In line with previous findings [15], TLSs were only found in 10% of specimens from both cohorts of HGSC patients included in this study (data not shown). Next, we stratified patients from both cohorts based on the presence of TLSs within their TME and investigated whether TLS^{Neg} and TLS^{Pos} patients differed in terms of OS. The presence of TLS did not influence OS in these retrospective cohorts of HGSC patients (Additional file 1: Figure S2, Table 2).

Table 3 Multivariate Cox proportional hazard analysis

Variable	Overall survival HR (95% CI)	<i>p</i>
Stage	2.15 (1.31–3.59)	0.0024
DC-LAMP stroma	0.62 (0.44–0.87)	0.0057

Mature DCs correlate with signs of a T_H1-polarized effector immune response

To characterize the impact of mature DCs on the composition of the HGSC immune infiltrate, we used RNA-Seq to compare gene expression profiles of 9 DC-LAMP^{Lo} and 9 DC-LAMP^{Hi} patients, as identified by IHC (Additional file 1: Table S6). We identified a set of 199 genes that were significantly overrepresented in from DC-LAMP^{Hi} patients as compared to their DC-LAMP^{Lo} counterparts (Fig. 2a; Additional file 1: Table S4). Functional studies revealed a strong association between DEGs with immune system activation and inflammation. Alongside, we used the MCP-counter R package to estimate the relative abundance of different cell populations in the TME of DC-LAMP^{Hi} versus DC-LAMP^{Lo} patients. Thus, compared to their DC-LAMP^{Lo} counterparts, DC-LAMP^{Hi} tumors exhibited overrepresentation for sets of genes specific of T cells ($p = 0.0003$), CD8⁺ T cells ($p = 0.01$), cytotoxic lymphocytes ($p = 0.0006$) and NK cells ($p = 0.017$) (Fig. 2b). To extend these findings to other genes potentially involved in the activity of distinct immune cell subsets, we included known markers of subpopulations of T cells, CD8⁺ T cells, helper T cells, NK cells and B cells (Fig. 2c). Compared to their DC-LAMP^{Lo} counterparts, DC-LAMP^{Hi} tumors exhibited an overrepresentation of gene sets specifically clustering to the following immunological functions: T cells, CD8 cytotoxicity, T_H1 polarization, T cell activation, NK cells and plasma cells (Fig. 2c). The expression of genes related to T_H2 polarization, T cell phenotype and B cells did not differ between DC-LAMP^{Hi} and DC-LAMP^{Lo} samples (Fig. 2c). We next validated these findings by assessing the expression levels of the most significant DEGs in a large group of HGSC patients ($n = 46$). Confirming RNA-Seq data, C-C motif chemokine ligand 5 (*CCL5*), C-C motif chemokine receptor 4 (*CCR4*), *CD3*, *CD4*, *CD40*, *CD40 ligand* (*CD40L*), *CD8A*, cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4 (*CTLA4*), granzyme A (*GZMA*), granzyme B (*GZMB*), *IL18* and perforin 1 (*PRF1*) were all significantly overrepresented in DC-LAMP^{Hi} HGSCs as compared to their DC-LAMP^{Lo} counterparts (Fig. 2d). Altogether, these results demonstrate that an abundant infiltration by mature DCs correlates with an immune contexture characterized by T_H1 polarization, infiltration by effectors cells (T cells, NK cells and plasma cells) and cytotoxic effector functions.

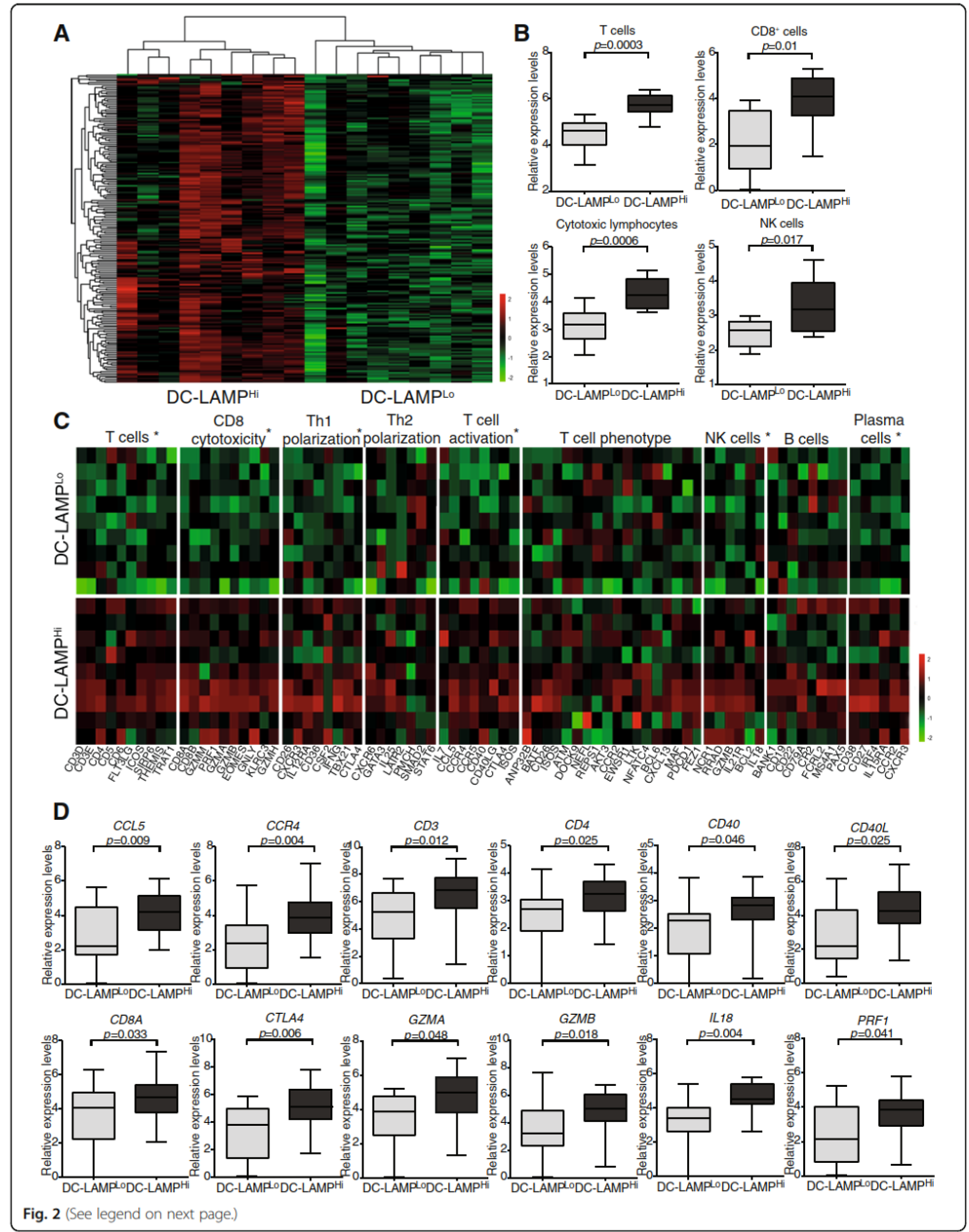
Mature DCs are associated with HGSC infiltration by IFN- γ -producing CD8⁺ T cells

A correlation between robust tumor infiltration by CD8⁺ T cells and an elevated intratumoral frequency of mature DCs has previously been reported for many types of human cancers [21, 22, 29]. As we observed a positive correlation between DC-LAMP⁺ DC density and the

levels of several transcripts associated with CD8⁺ T cell responses, we further evaluated CD8⁺ T cell infiltrate in HGSC samples by IHC (Fig. 3a). We observed a higher density of CD8⁺ T cells in DC-LAMP^{Hi} HGSCs as compared to their DC-LAMP^{Lo} counterparts ($p = 0.001$ and $p = 0.0001$, respectively) (Fig. 3b), corroborating the notion that DC-LAMP^{Lo} lesions have a less abundant infiltrate than DC-LAMP^{Hi} tumors. To address the functional capacity of CD8⁺ T cells found in the HGSC TME, we employed flow cytometry on tumors freshly resected from a prospective cohort of 20 HGSC patients (Additional file 1: Table S5), which were also analyzed for DC-LAMP⁺ cell density by IHC. In line with our previous results, we observed a significantly higher percentage of CD3⁺CD45⁺ and CD3⁺CD8⁺ T cells amongst live mononuclear cells in DC-LAMP^{Hi} versus DC-LAMP^{Lo} HGSCs (Additional file 1: Figure S3B). Moreover, non-specific stimulation caused a more pronounced increase in CD8⁺ T cells staining positively for IFN- γ , IFN- γ /GZMB and IFN- γ /CD107a (CD107a is a marker of degranulation) when CD8⁺ T cells were isolated from DC-LAMP^{Hi} versus DC-LAMP^{Lo} tumors ($p = 0.041$, $p = 0.027$ and $p = 0.021$, respectively) (Fig. 3c, Additional file 1: Figure S3A). These data corroborate our previous findings showing the overrepresentation of *IFNG*, *PRF1* and *GZMB* amongst 23 patients with DC-LAMP^{Hi} HGSC, compared to their 23 DC-LAMP^{Lo} counterparts by qRT-PCR (Fig. 2d). Thus, in both retrospective and prospective cohorts of patients, the presence of mature DCs correlated with increased frequencies of CD8⁺ T cells with enhanced effector functions. Confirming prior observations, high densities of CD8⁺ T cells had a positive impact on the OS of HGSC patients (study group 1) (Fig. 3d, Table 2). Since both mature DCs and CD8⁺ T cells influence disease outcome in patients with HGSC not receiving neoadjuvant chemotherapy, we assessed OS upon stratifying patients from study group 1 into four subsets (DC-LAMP^{Hi}/CD8^{Hi}, DC-LAMP^{Hi}/CD8^{Lo}, DC-LAMP^{Lo}/CD8^{Hi} and DC-LAMP^{Lo}/CD8^{Lo}). DC-LAMP^{Hi}/CD8^{Hi} patients exhibited the best disease outcome in this setting (median OS > 120 mo.), which was significantly better than OS amongst DC-LAMP^{Lo}/CD8^{Lo} patients (median OS: 50 mo., $p = 0.0004$) (Fig. 3e). Intriguingly, DC-LAMP^{Lo}/CD8^{Hi} patients had an even poorer median OS (18 mo.) (Fig. 3e). However, the size of this specific patient group was too small to enable a statistical assessment of this observation.

Mature DCs are associated with HGSC infiltration by cytotoxic NK cells

Both the innate and adaptive arm of the immune system contribute to cancer immunosurveillance [30]. Thus, driven by the positive correlation between the density of mature DCs in the HGSC TME and the abundance of NK cell-related transcripts, we next evaluated the



(See figure on previous page.)

Fig. 2 Transcriptional signatures of the tumor microenvironment of DC-LAMP^{hi} versus DC-LAMP^{lo} HGSCs. **a** Hierarchical clustering of genes significantly upregulated in 9 DC-LAMP^{hi} versus 9 DC-LAMP^{lo} HGSCs, as determined by RNA-Seq. Highly expressed genes are in red, and lowly expressed genes are in green. **b** Relative abundance of T cells, CD8⁺ T cells, cytotoxic lymphocytes and NK cells across DC-LAMP^{hi} and DC-LAMP^{lo} HGSCs, as determined by MCP-counter on RNA-Seq data. Box plots: lower quartile, median, upper quartile; whiskers, minimum, maximum. **c** Relative expression levels of genes linked to T cells, CD8 cytotoxicity, T_H1 polarization, T_H2 polarization, T cell activation, T cell phenotype, NK cells, B cells and plasma cells in 9 DC-LAMP^{hi} versus 9 DC-LAMP^{lo} HGSCs, as determined by RNA-Seq and IHC. Benjamin-Hochberg correction was used for RNA-Seq data. Highly expressed genes are in red, and lowly expressed genes are in green. **d** qRT-PCR-assisted quantification of *CCL5*, *CCR4*, *CD3*, *CD4*, *CD40*, *CD40L*, *CD8A*, *CTLA4*, *GZMA*, *GZMB*, *IL18* and *PRF1* expression levels in 23 DC-LAMP^{hi} and 23 DC-LAMP^{lo} HGSCs patients who did not receive neoadjuvant chemotherapy. Box plots: lower quartile, median, upper quartile; whiskers, minimum, maximum. Ct values were normalized using the global normalization method ($n = 46$ samples). qRT-PCR data were analyzed by unpaired Student's *t* tests using GenEx software (MultiD Analysis). All values are presented as mean \pm SD

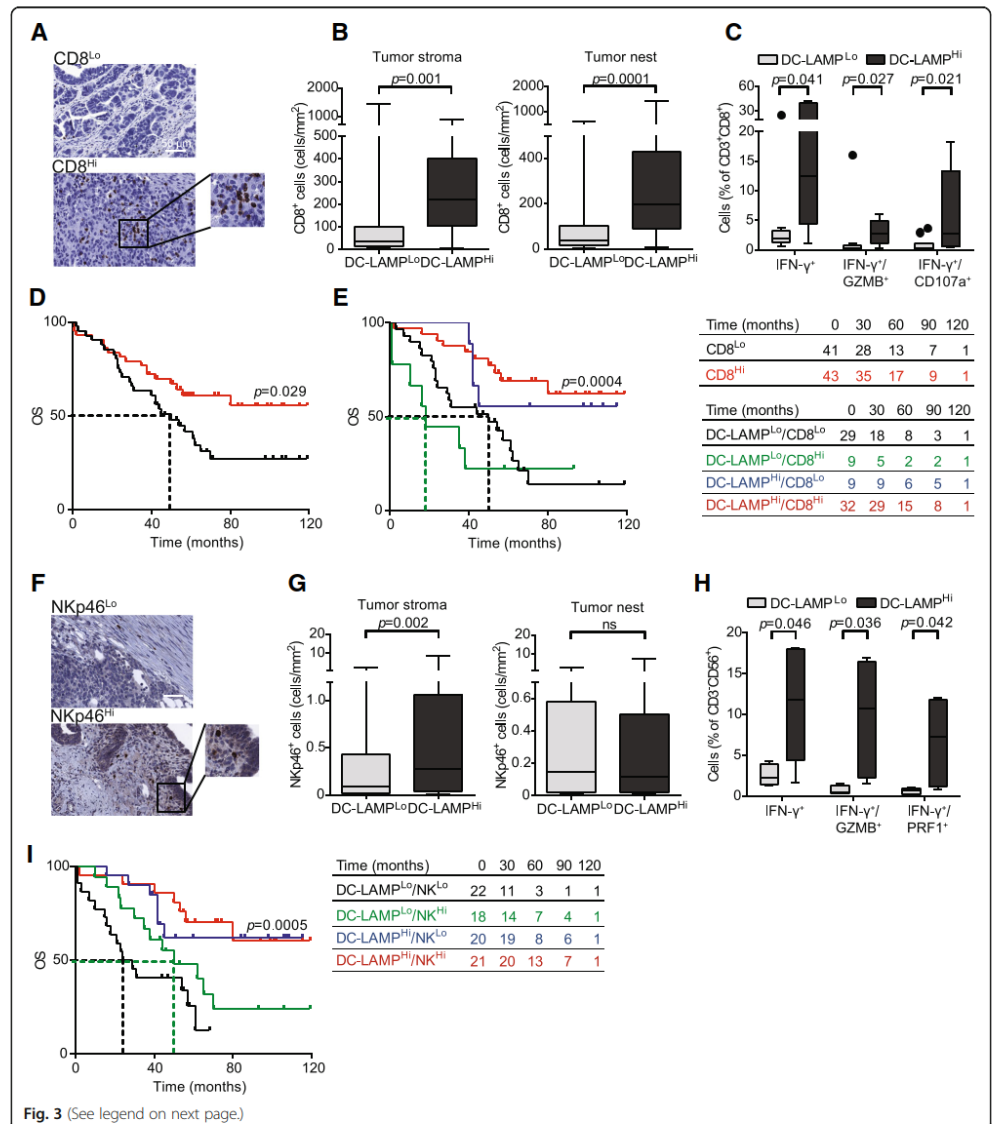
association between DC-LAMP⁺ DCs and NK cells by IHC (based on the specific NK cell marker Nkp46) [31]. NK cells were mainly localized to tumor invasive margin and stroma, were rarely in contact with malignant cells, and were generally found outside of TLSs (Fig. 3f). We observed a higher density of NK cells in the tumor stroma (but not in tumor nests) in DC-LAMP^{hi} versus DC-LAMP^{lo} samples (Fig. 3g), corroborating RNA-Seq data (Fig. 2c). To obtain insights into the functional capacity of NK cells infiltrating the TME, we used flow cytometry on freshly resected samples from a prospective cohort of 20 patients with HGSC (Additional file 1: Table S5), which were also analyzed for DC-LAMP⁺ cell density by IHC (Additional file 1: Figure S3C). We next compared the expression of 15 NK cell markers amongst CD3⁺CD56⁺ NK cells isolated from freshly resected DC-LAMP^{hi} or DC-LAMP^{lo} HGSCs. Although NK cell receptors were not differentially expressed in these two groups of samples (data not shown), non-specific stimulation was much more effective at inducing the acquisition of effector functions amongst NK cells from DC-LAMP^{hi} patients (versus their DC-LAMP^{lo} counterparts), as assessed by the percentage of NK cells expressing IFN- γ , IFN- γ /GZMB and IFN- γ /PRF1 ($p = 0.046$, $p = 0.036$ and $p = 0.042$, respectively) (Fig. 3h). These results suggest that intratumoral NK cells from DC-LAMP^{lo} patients display an impaired capacity to acquire effector functions, even though their surface phenotype is unaltered.

Although NK cells have been associated with improved disease outcome in patients with some solid tumors [22], their prognostic impact on HGSC is unknown. We therefore stratified HGSC patients based on median Nkp46⁺ cell density in the TME, finding no significant differences in OS between these two groups (Additional file 1: Figure S3D, Table 2). Importantly, when we stratified patients into four groups based on both DC-LAMP⁺ cell density and Nkp46⁺ NK cell density, we observed that DC-LAMP^{hi}/Nkp46^{hi} patients had superior disease outcome (median OS > 120 mo.) as compared to DC-LAMP^{lo}/Nkp46^{lo} patients (median OS 26.5 mo.; $p = 0.0005$) (Fig. 3i).

CD20⁺ B cells in the HGSC TME correlate with mature DCs and long-term survival

B cell density strongly correlates with CD8⁺ T cell infiltration and favorable disease outcome in patients with HGSC [13]. Nevertheless, the association between CD20⁺ cells and mature DCs, as well as their impact on the immune contexture of HGSC remain unknown. Tumor-infiltrating CD20⁺ B cells were found in > 50% of patients with HGSC by IHC (data not shown), exhibiting a robust positive correlation with DC-LAMP⁺ DC density, in both the tumor stroma and tumor nests ($p = 0.0001$ and $p = 0.0004$, respectively) (Fig. 4a, b). These results are in line with our previous findings showing that a high density of DC-LAMP⁺ cells in the TME is associated with the overrepresentation of a plasma cell gene signature (Fig. 2c). Next, we divided our entire patient cohort into 4 groups according to the density of mature DCs and CD20⁺ B cells (DC-LAMP^{lo}/CD20^{lo}, DC-LAMP^{lo}/CD20^{hi}, DC-LAMP^{hi}/CD20^{lo}, DC-LAMP^{hi}/CD20^{hi}), with the specific aim to assess CD8⁺ T cell infiltration. Interestingly, we observed a significantly higher density of CD8⁺ T cells in DC-LAMP^{hi}/CD20^{hi} patients as compared to all other groups. Moreover, DC-LAMP^{hi}/CD20^{lo} samples exhibited a significantly higher density of CD8⁺ T cells than DC-LAMP^{lo}/CD20^{lo} group (Fig. 4c). By combining IHC and biomolecular analyses, we demonstrated that *CCR4*, *CXCL14*, *CCR7*, *CCL5*, *CCR2*, *CCL19*, *CCL22*, *CCR1*, *CCL18*, *CCRL2*, *CXCR3*, *CCR10*, *CCR5* and *CXCL9* are overrepresented in DC-LAMP^{hi}/CD20^{hi} samples as compared their DC-LAMP^{lo}/CD20^{lo} counterparts (Fig. 4d). Functional analyses revealed that all these DEGs are mainly involved in lymphocyte, DC and monocyte chemotaxis (Additional file 1: Figure S4). Finally, by combining IHC and flow cytometry, we detected a significantly higher percentage of IFN- γ ⁺ and PRF1⁺ cells amongst CD8⁺ T cells from DC-LAMP^{hi}/CD20^{lo} tumors compared to their DC-LAMP^{lo}/CD20^{lo} counterparts (Fig. 4e).

Confirming prior observations [15], robust tumor infiltration by CD20⁺ B cells had a positive impact on the survival of patients with HGSC ($p = 0.018$) (Fig. 4f, Table 2). Importantly, high levels of both CD8⁺ CTLs and CD20⁺ B cells were associated with most favorable clinical outcome



(See figure on previous page.)

Fig. 3 Impact of mature DCs on the frequency and cytotoxicity of CD8⁺ T cells and NK cells in HGSC. **a** Representative images of CD8 immunostaining. Scale bar = 50 μ m. **b** Density of CD8⁺ T cells in the tumor stroma and tumor nest in DC-LAMP^{Lo} versus DC-LAMP^{Hi} HGSCs ($n = 81$). Box plots: lower quartile, median, upper quartile; whiskers, minimum, maximum. **c** Percentage of IFN- γ ⁺, IFN- γ ⁺/GZMB⁺ and IFN- γ ⁺/CD107a⁺ cells among CD8⁺CD3⁺ T cells from the HGSC of 10 DC-LAMP^{Lo} and 10 DC-LAMP^{Hi} patients after non-specific stimulation. Box plots: lower quartile, median, upper quartile; whiskers, minimum, maximum. **d, e** OS of HGSC patients who did not receive neoadjuvant chemotherapy, upon stratification based on median density of CD8⁺ cells alone (**d**) or plus DC-LAMP⁺ cells (**e**). Survival curves were estimated by the Kaplan-Meier method, and differences between groups were evaluated using log-rank test. Number of patients at risk are reported. **f** Representative images of Nkp46 immunostaining. Scale bar = 50 μ m. **g** Density of Nkp46⁺ cells in the tumor stroma and tumor nest in DC-LAMP^{Lo} versus DC-LAMP^{Hi} HGSCs ($n = 81$). Box plots: lower quartile, median, upper quartile; whiskers, minimum, maximum. **h** Percentage of IFN- γ ⁺, IFN- γ ⁺/GZMB⁺ and IFN- γ ⁺/PRF1⁺ cells among CD3⁺CD56⁺ NK cells from the HGSCs of 10 DC-LAMP^{Lo} and 10 DC-LAMP^{Hi} patients after non-specific stimulation. Box plots: lower quartile, median, upper quartile; whiskers, minimum, maximum. **i** OS of HGSC patients who did not receive neoadjuvant chemotherapy, upon stratification based on median density of DC-LAMP⁺ cells plus Nkp46⁺ cells. Survival curves were estimated by the Kaplan-Meier method, and differences between groups were evaluated using log-rank test. Number of patients at risk are reported

amongst the patients involved in this study ($p = 0.049$) (Fig. 4g). Indeed, median survival for CD8^{Hi}/CD20^{Hi} patients was > 120 mo., where it was only 47 mo. for CD8^{Lo}/CD20^{Lo} patients ($p = 0.0004$). These findings are in accordance with the results from survival analysis showing that DC-LAMP^{Hi} patients have the best OS irrespective of CD20⁺ B cell density (Fig. 4h). Altogether, our data suggest that while both mature DC-LAMP⁺ DCs and CD20⁺ B cells shape the immune contexture of HGSCs, only the former are critical for enabling a clinically relevant anticancer response driven by CD8⁺ CTLs.

Finally, we evaluated the combined prognostic value of DC-LAMP⁺, CD8⁺ and CD20⁺ cell density by stratifying our cohort in three groups of patients: DC-LAMP^{Hi}/CD8^{Hi}/CD20^{Hi} patients, DC-LAMP^{Lo}/CD8^{Lo}/CD20^{Lo} patients, and patients in which either of the three parameters was discordant with the remaining two (which we named DC-LAMP/CD8/CD20^{Mix}). DC-LAMP^{Hi}/CD8^{Hi}/CD20^{Hi} patients had superior RFS (not shown) and OS (median > 120 mo.) compared with their DC-LAMP^{Lo}/CD8^{Lo}/CD20^{Lo} counterparts (median OS: 47 mo.) as well as DC-LAMP/CD8/CD20^{Mix} patients (median OS 40 mo.) (Fig. 4i). Taken together, these findings indicate that the concomitant assessment of DC-LAMP⁺ DCs, CD20⁺ B cells and CD8⁺ CTLs in the TME of patients with HGSC conveys robust prognostic information.

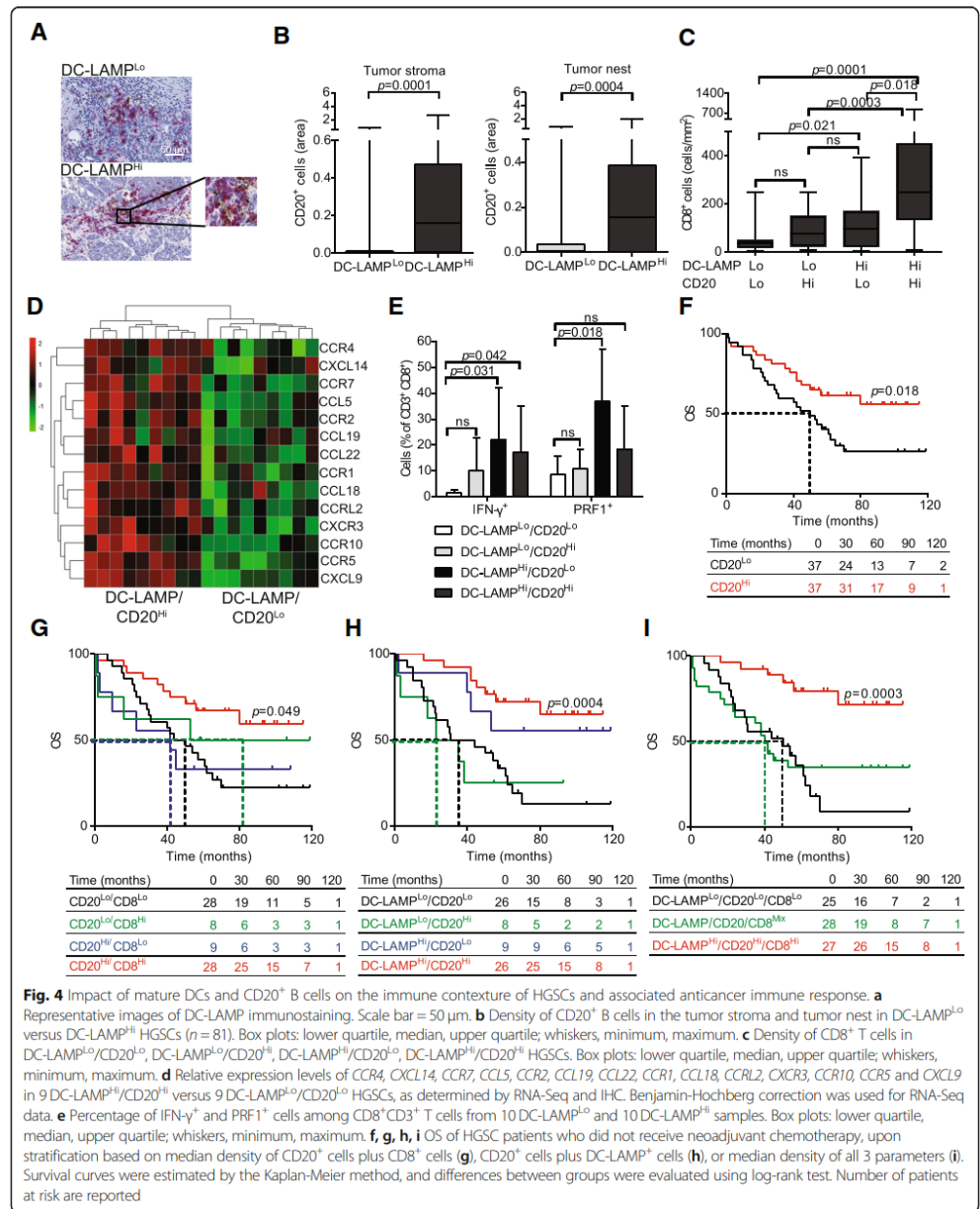
Discussion

The composition of the immune infiltrate in human solid tumors, its localization and functional orientation are major predictors of patient survival, as previously documented [5, 32]. In particular, high densities of intratumoral CD8⁺ CTLs and CD20⁺ B cells have been associated with improved clinical outcome in patients affected by a variety of tumors, including HGSC [13, 21]. Elevated intratumoral levels of DC-LAMP⁺ DCs also constitute a robust positive prognostic value in multiple oncological settings, including non-small-cell lung carcinoma (NSCLC) [14, 21, 33], melanoma [34], renal cell carcinoma (RCC) [29], breast cancer [35] and colorectal carcinoma (CRC) [22].

Nevertheless, the impact of DC-LAMP⁺ cells on the composition and functional orientation of the immune contexture of HGSC and its prognostic role remained to be elucidated. Here, we assessed the prognostic value of DC-LAMP⁺ cell densities in two independent retrospective cohorts of patients with HGSC who did not receive neoadjuvant chemotherapy ($n = 81$ and $n = 66$).

We observed a major inter-individual variability in DC-LAMP⁺ cell densities. The great majority of mature DCs were localized in the tumor stroma and associated with TLSs (rather than being in direct contact with malignant cell nests), as previously observed in samples from NSCLC, RCC and CRC [14, 21, 22, 29]. In NSCLCs, mature DCs provide a specific marker for TLSs and constitute a favorable prognostic biomarker for survival [21, 33]. TLSs were identified only in 19% of our HGSC samples, which is in line with previous findings, and their abundance did not correlate with OS [15]. We therefore decided to evaluate the prognostic impact of DC-LAMP⁺ DCs in the entire tumor stroma and tumor nest. High densities of mature DCs in the TME were strongly associated with improved RFS and, most importantly, superior OS in both independent retrospective cohorts.

By combining IHC and biomolecular analyses, we demonstrated that a high density of tumor-infiltrating mature DCs is associated with a T_H1-polarized immune contexture that acquired effector functions. These results recapitulate previous findings in the setting of NSCLC [21, 33] and CRC [22, 36]. The presence of tumor-infiltrating CD8⁺ CTLs is strongly associated with improved clinical outcome amongst patients with HGSC [9, 12, 13]. Accordingly, we found a strong correlation between CD8⁺ CTL density and improved OS in our cohorts of HGSC patients. In both prospective and retrospective studies, we showed that CD8⁺ T cells co-localize preferentially with mature DCs in the HGSC TME, and that the density of CD8⁺ T cells is profoundly diminished in DC-LAMP^{Lo} tumors. DC-LAMP^{Hi} patients with a concomitantly elevated density of CD8⁺ CTLs in their tumors had a significant clinical benefit as compared to patients with low intratumoral levels of both



mature DCs and CD8⁺ CTLs. Moreover, DC-LAMP^{Lo}/CD8^{Hi} patients had significantly worse disease outcome than their DC-LAMP^{Hi}/CD8^{Hi} counterparts. Thus, DC-LAMP stands out as a robust biomarker allowing for the identification of CD8^{Hi} HGSC patients with higher risk of death.

In contrast to the well-established antitumor activity of CD8⁺ CTLs, there is little evidence in support of a similar function from NK cells (in the setting of HGSC) [37]. NKp46⁺ NK cells were mainly localized at invasive tumor margins and within the stroma of HGSC samples, which is in line with previous finding in the NSCLC, CRC and RCC setting [22, 25]. Importantly, increased intratumoral levels of NK cells have been associated with good prognosis in patients with RCC, although a similar prognostic value could not be documented in NSCLC and CRC [22, 25]. Along similar lines, the density of NK cells did not influence clinical outcome in our cohorts of HGSC patients. Although the cell surface properties of NK cells did not differ between DC-LAMP^{Hi} and DC-LAMP^{Lo} samples, we observed significantly a higher frequency of IFN- γ ⁺/PRF1⁺ and IFN- γ ⁺/GZMB⁺ NK cells after non-specific stimulation in the former. Finally, in line with previous observations on CRC, DC-LAMP^{Hi} patients with concomitantly elevated amounts of intratumoral NK cells had a significant clinical benefit compared with DC-LAMP^{Lo}/NKp46^{Lo} individuals [22]. Taken together, our data demonstrate that robust tumor infiltration by mature DCs generates an immune contexture characterized by T_H1 polarization and cytotoxic functions.

Importantly, the presence of CD20⁺ B cells correlates with improved OS in our cohorts of chemotherapy-naive patients with HGSC, which is line with previous observations from other oncological settings [13, 14, 38–41]. Notably, HGSCs containing elevated amounts of both CD8⁺ CTLs and CD20⁺ B cells are associated with superior survival than HGSCs containing high levels of either CD8⁺ CTLs or CD20⁺ B cells [13]. These findings suggest not only the existence of cooperative interactions between CD8⁺ CTLs and CD20⁺ B cells in the TME of HGSCs, but also the critical role of B cells in regulation of the immune infiltrate, as previously reported in a variety of other cancers [42, 43]. CD8⁺ CTLs and CD20⁺ B cells often co-localize in lymphoid aggregates of various sizes and morphology in HGSC samples, as previously described in detail [15]. In all such aggregates, especially in TLSs, B cells form follicles adjacent to discrete zones containing not only CD4⁺ and CD8⁺ T cells, but also high densities of DCs [18]. Accordingly, we identified a robust correlation between the presence of DC-LAMP⁺ DCs and CD20⁺ B cells in the TME of HGSC lesions.

In conclusion, by combining IHC and biomolecular analyses, we comprehensively documented for the first time the influence of both mature DCs and CD20⁺ B

cells on the establishment of the immune contexture of HGSC. That said, DCs stand out as the critical attribute for the initiation of an immune response to HGSC which exhibits T_H1 polarization, is armed with immune effectors, and mediates clinical benefits. These findings are in line with previous studies documenting the critical role of mature DCs in the activation of antitumor immunity [44, 45]. Accordingly, we identified tumor infiltration by DC-LAMP⁺ DCs as a robust, positive prognostic biomarker for HGSC patients, as confirmed by both univariate and multivariate analyses.

Additional file

Additional file 1: Figure S1. Density of mature DCs in the tumor stroma and malignant cell nest of patients with HGSCs. **(A)** Representative images of DC-LAMP immunostaining (in brown) and CD20 immunostaining (in red) are shown. Scale bar = 50 μ m. **(B)** Density of DC-LAMP⁺ cells in the tumor stroma and nest of patients with HGSCs (n = 81). **(C)** RFS and OS of 81 patients with HGSC who did not receive neoadjuvant chemotherapy, upon stratification based on median density of DC-LAMP⁺ cells in the tumor nest. **Figure S2.** Prognostic impact of tertiary lymphoid structures in HGSC patients. OS of 147 patients with HGSC who did not receive neoadjuvant chemotherapy, upon stratification based on presence or absence of TLSs. **Figure S3.** Evaluation of the functional profile of CD8⁺ T cells and NK cells from DC-LAMP^{Hi} versus DC-LAMP^{Lo} HGSC samples. **(A)** Gating strategy for CD8⁺ T cells. The percentage of cells in each gate is reported. **(B)** Percentage of CD45⁺CD3⁺ cells and CD3⁺CD8⁺ cells from freshly resected DC-LAMP^{Hi} (n = 10) and DC-LAMP^{Lo} (n = 10) HGSCs. Boxplots: lower quartile, median, upper quartile; whiskers, minimum, maximum. **(C)** Gating strategy for NK cells. The percentage of cells in each gate is reported. **(D)** OS of 81 patients with HGSC who did not receive neoadjuvant chemotherapy, upon stratification based on median NK cell density. **Figure S4.** ClueGo analysis of genes overrepresented in DC-LAMP^{Hi}/CD20⁺ versus DC-LAMP^{Lo}/CD20⁺ HGSCs. **Table S1.** Main clinical and biological characteristics of 66 HGSC patients enrolled in the validation cohort (University Hospital Motol). **Table S2.** The list of antibodies used for IHC staining. **Table S3.** The list of antibodies used for flow cytometry. **Table S4.** List of genes significantly overrepresented in DC-LAMP^{Hi} versus DC-LAMP^{Lo} HGSC samples as per RNA-Seq. **Table S5.** Main clinical and biological characteristics of 20 HGSC patients in which the freshly resected tumors were analyzed using flow cytometry (University Hospital Motol). **Table S6.** Main clinical and biological characteristics of 18 HGSC patients whose tumor samples were used for NGS data analysis (University Hospital Motol). (PDF 785 kb)

Acknowledgements
Not applicable.

Funding

This study was supported by the program PROGRES Q40/11 and PROGRES 28 (Oncology), by the project BBMRI-CZ LM2015089 and by the European Regional Development Fund-Project BBMRI-CZ: Biobank network—a versatile platform for research on the etiopathogenesis of diseases, No: EF16.013/0001674. LG is supported by startup grant from the Department of Radiation Oncology at Weill Cornell Medicine (New York, US) and by donations from Phosplatin Therapeutics (New York, US), Sotio a.s. (Prague, Czech Republic) and the Luke Heller TECPR2 Foundation (Boston, US).

Availability of data and materials

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Authors' contributions

Concept and design: PS, JL, AR, RS, JF; development of the methodology: IT, LK, MH, JF; acquisition of the data: IT, LK, LB, MH, ES, JF; analysis and

interpretation of the data: IT, LK, MH, LP, IP, MH, TB, LR, RK, JG, JF; preparation, review, and/or revision of the manuscript and figures: IT, LK, MH, PS, JL, CSF, WHF, AR, LG, RS, JF; study supervision: RS, JF. All authors read and approved the final manuscript.

Authors' information

Not applicable

Ethics approval and consent to participate

The study was approved by the ethics committees at the University Hospital Motol and University Hospital Hradec Kralove in accordance with Czech law.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

LG provides remunerated consulting to OmniSEQ (Buffalo, NY, USA), Astra Zeneca (Gaithersburg, MD, USA), VL47 (New York, NY, USA) and the Luke Heller TECPR2 Foundation (Boston, MA, USA). All other authors have no financial interests to disclose.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Department of Immunology, Charles University, 2nd Faculty of Medicine and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic. ²Sotio, Prague, Czech Republic. ³Department of Pathology and Molecular Medicine, Charles University, 2nd Faculty of Medicine and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic. ⁴The Fingerland Department of Pathology, Charles University, Faculty of Medicine and University Hospital Hradec Kralove, Hradec Kralove, Czech Republic. ⁵Department of Gynecology and Obstetrics, Charles University, Faculty of Medicine and University Hospital Hradec Kralove, Hradec Kralove, Czech Republic. ⁶Department of Gynecology and Obstetrics, Charles University, 3rd Faculty of Medicine and University Hospital Kralovske Vinohrady, Prague, Czech Republic. ⁷Department of Gynecology and Obstetrics, Charles University, 2nd Faculty of Medicine and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic. ⁸INSERM, U1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France. ⁹Sorbonne Université, Paris, France. ¹⁰Université Paris Descartes/Paris V, Paris, France. ¹¹Department of Radiation Oncology, Weill Cornell Medical College, New York, NY, USA. ¹²Sandra and Edward Meyer Cancer Center, New York, NY, USA.

Received: 26 October 2018 Accepted: 8 November 2018

Published online: 04 December 2018

References

- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144:646–74.
- Rybstein MD, Bravo-San Pedro JM, Kroemer G, Galluzzi L. The autophagic network and cancer. *Nat Cell Biol*. 2018;20:243–51.
- Maley CC, Aktipis A, Graham TA, Sottoriva A, Boddy AM, Janiszewska M, et al. Classifying the evolutionary and ecological features of neoplasms. *Nat Rev Cancer*. 2017;17:605–19.
- Becht E, Giraldo NA, Dieu-Nosjean MC, Sautes-Fridman C, Fridman WH. Cancer immune contexture and immunotherapy. *Curr Opin Immunol*. 2016;39:7–13.
- Fridman WH, Zitvogel L, Sautes-Fridman C, Kroemer G. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14:717–34.
- Fucikova J, Moserova I, Urbanova L, Bezu L, Kepp O, Cremer I, et al. Prognostic and predictive value of DAMPs and DAMP-associated processes in Cancer. *Front Immunol*. 2015;6:402.
- Senovilla L, Vacchelli E, Galon J, Adjemian S, Eggermont A, Fridman WH, et al. Trial watch: prognostic and predictive value of the immune infiltrate in cancer. *Oncoimmunology*. 2012;1:1323–43.
- Turajlic S, Xu H, Litchfield K, Rowan A, Chambers T, Lopez JJ, et al. Tracking Cancer evolution reveals constrained routes to metastases: TRACERx renal. *Cell*. 2018;173:581–94 e12.
- Hwang WT, Adams SF, Tahirovic E, Hagemann IS, Coukos G. Prognostic significance of tumor-infiltrating T cells in ovarian cancer: a meta-analysis. *Gynecol Oncol*. 2012;124:192–8.
- Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature*. 2017;541:321–30.
- Savas P, Salgado R, Denkert C, Sotiriou C, Darcy PK, Smyth MJ, et al. Clinical relevance of host immunity in breast cancer: from TILs to the clinic. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016;13:228–41.
- Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med*. 2003;348:203–13.
- Nielsen JS, Sahota RA, Milne K, Kost SE, Nesslinger NJ, Watson PH, et al. CD20+ tumor-infiltrating lymphocytes have an atypical CD27- memory phenotype and together with CD8+ T cells promote favorable prognosis in ovarian cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012;18:3281–92.
- Germain C, Grnjatic S, Tamzalit F, Knockaert S, Remark R, Goc J, et al. Presence of B cells in tertiary lymphoid structures is associated with a protective immunity in patients with lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;189:832–44.
- Kroeger DR, Milne K, Nelson BH. Tumor-infiltrating plasma cells are associated with tertiary lymphoid structures, Cytolytic T-cell responses, and superior prognosis in ovarian Cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2016;22:3005–15.
- Di Caro G, Bergomas F, Grizzi F, Doni A, Bianchi P, Malesci A, et al. Occurrence of tertiary lymphoid tissue is associated with T-cell infiltration and predicts better prognosis in early-stage colorectal cancers. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2014;20:2147–58.
- Lee HJ, Park IA, Song IH, Shin SJ, Kim JY, Yu JH, et al. Tertiary lymphoid structures: prognostic significance and relationship with tumour-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer. *J Clin Pathol*. 2016;69:422–30.
- Sautes-Fridman C, Lawand M, Giraldo NA, Kaplan H, Germain C, Fridman WH, et al. Tertiary lymphoid structures in cancers: prognostic value, regulation, and manipulation for therapeutic intervention. *Front Immunol*. 2016;7:407.
- Wirsing AM, Rikardsen OG, Steigen SE, Uhlin-Hansen L, Hadler-Olsen E. Characterisation and prognostic value of tertiary lymphoid structures in oral squamous cell carcinoma. *BMC Clin Pathol*. 2014;1:438.
- de Chaisemartin L, Goc J, Damotte D, Validire P, Magdeleinat P, Alifano M, et al. Characterization of chemokines and adhesion molecules associated with T cell presence in tertiary lymphoid structures in human lung cancer. *Cancer Res*. 2011;71:6391–9.
- Goc J, Germain C, Vo-Bourgeois TK, Lupo A, Klein C, Knockaert S, et al. Dendritic cells in tumor-associated tertiary lymphoid structures signal a Th1 cytotoxic immune contexture and license the positive prognostic value of infiltrating CD8+ T cells. *Cancer Res*. 2014;74:705–15.
- Remark R, Alifano M, Cremer I, Lupo A, Dieu-Nosjean MC, Riquet M, et al. Characteristics and clinical impacts of the immune environments in colorectal and renal cell carcinoma lung metastases: influence of tumor origin. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2013;19:4079–91.
- Meinhold-Heerlein I, Fotopoulou C, Harter P, Kurzedler C, Mustea A, Wimberger P, et al. The new WHO classification of ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer and its clinical implications. *Arch Gynecol Obstet*. 2016;293:695–700.
- O'Sullivan B, Brierley J, Byrd D, Bosman F, Kehoe S, Kossary C, et al. The TNM classification of malignant tumours-towards common understanding and reasonable expectations. *The Lancet Oncology*. 2017;18:849–51.
- Platonova S, Cherfils-Vicini J, Damotte D, Crozet L, Vieillard V, Validire P, et al. Profound coordinated alterations of intratumoral NK cell phenotype and function in lung carcinoma. *Cancer Res*. 2011;71:5412–22.
- Fialova A, Partlova S, Sojka L, Hromadkova H, Brtnicky T, Fucikova J, et al. Dynamics of T-cell infiltration during the course of ovarian cancer: the gradual shift from a Th17 effector cell response to a predominant infiltration by regulatory T-cells. *Int J Cancer*. 2013;132:1070–9.
- Bindea G, Mlecnik B, Hackl H, Charoentong P, Tosolini M, Kirilovsky A, et al. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics*. 2009;25:1091–3.

28. Becht E, Giraldo NA, Lacroix L, Buttard B, Elarouci N, Petitprez F, et al. Estimating the population abundance of tissue-infiltrating immune and stromal cell populations using gene expression. *Genome Biol.* 2016;17:218.
29. Giraldo NA, Becht E, Pages F, Skliris G, Verkarre V, Vano Y, et al. Orchestration and prognostic significance of immune checkpoints in the microenvironment of primary and metastatic renal cell Cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2015;21:3031–40.
30. Kroemer G, Senovilla L, Galluzzi L, Andre F, Zitvogel L. Natural and therapy-induced immunosurveillance in breast cancer. *Nat Med.* 2015;21:1128–38.
31. Lopez-Soto A, Gonzalez S, Smyth MJ, Galluzzi L. Control of metastasis by NK cells. *Cancer Cell.* 2017;32:135–54.
32. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:235–71.
33. Dieu-Nosjean MC, Antoine M, Danel C, Heudes D, Wislez M, Poulot V, et al. Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2008;26:4410–7.
34. Ladanyi A, Kiss J, Somlai B, Gilde K, Fejos Z, Mohos A, et al. Density of DC-LAMP(+) mature dendritic cells in combination with activated T lymphocytes infiltrating primary cutaneous melanoma is a strong independent prognostic factor. *Cancer immunology, immunotherapy: Cll.* 2007;56:1459–69.
35. Martinet L, Filleron T, Le Guellec S, Rochemaix P, Garrido I, Girard JP. High endothelial venule blood vessels for tumor-infiltrating lymphocytes are associated with lymphotoxin beta-producing dendritic cells in human breast cancer. *J Immunol.* 2013;191:2001–8.
36. Coppola D, Nebozhyn M, Khalil F, Dai H, Yeatman T, Loboda A, et al. Unique ectopic lymph node-like structures present in human primary colorectal carcinoma are identified by immune gene array profiling. *Am J Pathol.* 2011; 179:37–45.
37. Carlsten M, Norell H, Bryceson YT, Poschke I, Schedvins K, Ljunggren HG, et al. Primary human tumor cells expressing CD155 impair tumor targeting by down-regulating DNAM-1 on NK cells. *J Immunol.* 2009;183:4921–30.
38. Ladanyi A, Kiss J, Mohos A, Somlai B, Liszkay G, Gilde K, et al. Prognostic impact of B-cell density in cutaneous melanoma. *Cancer immunology, immunotherapy : Cll.* 2011;60:1729–38.
39. Mahmoud SM, Lee AH, Paish EC, Macmillan RD, Ellis IO, Green AR. The prognostic significance of B lymphocytes in invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;132:545–53.
40. Milne K, Kobel M, Kalloger SE, Barnes RO, Gao D, Gilks CB, et al. Systematic analysis of immune infiltrates in high-grade serous ovarian cancer reveals CD20, FoxP3 and TIA-1 as positive prognostic factors. *PLoS One.* 2009;4:e6412.
41. Schmidt M, Bohm D, von Torne C, Steiner E, Puhl A, Pilch H, et al. The humoral immune system has a key prognostic impact in node-negative breast cancer. *Cancer Res.* 2008;68:5405–13.
42. Martinet L, Garrido I, Filleron T, Le Guellec S, Bellard E, Fournie JJ, et al. Human solid tumors contain high endothelial venules: association with T- and B-lymphocyte infiltration and favorable prognosis in breast cancer. *Cancer Res.* 2011;71:5678–87.
43. Nelson BH. CD20+ B cells: the other tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunol.* 2010;185:4977–82.
44. Senovilla L, Aranda F, Galluzzi L, Kroemer G. Impact of myeloid cells on the efficacy of anticancer chemotherapy. *Curr Opin Immunol.* 2014;30:24–31.
45. Steinman RM. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:1–22.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



8.3 TIM-3 určuje funkční orientaci imunitního infiltrátu u karcinomu ovaria

Přítomnost inhibičních molekul v TME má zásadní vliv na případnou inhibici protinádorové imunitní odpovědi a prognózu pacientů u řady maligních onemocnění. V souladu s touto skutečností jsou blokační protilátky imunitních kontrolních bodů používány v klinické praxi pro léčbu pacientů s melanomem, nemalobuněčným karcinomem plic, urotheliálním a renálním karcinomem. Ze současných výsledků klinického testování vyplývá, že ovariální karcinom vykazuje jen relativně nízkou míru odpovědi na tento typ terapie (5–20 % pacientek). Z tohoto důvodu je nutné hlubší pochopení role inhibičních molekul v procesu aktivace či inhibice protinádorové imunitní odpovědi a současná definice prognostické role těchto molekul v TME karcinomu ovaria.

Z výsledků naší studie vyplývá, že vyšší exprese PD-1 a PD-L1 v TME karcinomu ovaria je asociovaná s aktivací protinádorové imunitní odpovědi zprostředkované zejména Th1 a cytotoxickou odpovědí přítomných CD8⁺ T lymfocytů a lepší prognózou onemocnění. Signalizace pomocí molekul PD-1/PD-L1 tedy nepředstavuje hlavní inhibiční dráhu lymfocytů infiltrujících do nádoru, jako je tomu u většiny nádorových onemocnění. Pomocí imunofluorescenční analýzy, celogenomového sekvenování a průtokové cytometrie jsme identifikovali klíčovou imunosupresivní roli molekuly TIM-3 v TME karcinomu ovaria. CD8⁺ T lymfocyty nesoucí na svém povrchu molekulu TIM-3 vykazují znaky funkčního vyčerpání a zvýšená frekvence těchto buněk v TME pacientek koreluje s horší prognózou onemocnění. Z našich výsledků souhrnně vyplývá, že molekuly PD-1 a TIM-3 představují prognosticky významné ukazatele aktivace (PD-1) a inhibice (TIM-3) lymfocytů infiltrujících do nádoru, současně dokumentují klinický význam blokačních protilátek proti molekule TIM-3 a možný terapeutický benefit z takovéto léčby u pacientek s karcinomem ovaria.

Autorka v této práci přispěla:

- Optimalizace imunohistochemických protokolů využitých v rámci této studie
- Retrospektivní imunohistochemická analýza zastoupení CD8⁺ T lymfocytů v nádorové tkáni
- Prospektivní analýza nádorové tkáně – zpracování čerstvé nádorové tkáně a multiparametrická cytometrická analýza vzorků
- Účast na revizi manuskriptu

TIM-3 Dictates Functional Orientation of the Immune Infiltrate in Ovarian Cancer

Jitka Fucikova^{1,2}, Jana Rakova², Michal Hensler², Lenka Kasikova^{1,2}, Lucie Belicova², Kamila Hladikova^{1,2}, Iva Truxova^{1,2}, Petr Skapa³, Jan Laco⁴, Ladislav Pecen², Ivan Praznovec⁵, Michael J. Halaska⁶, Tomas Brtnicky⁷, Roman Kodet³, Anna Fialova², Josephine Pineau^{8,9}, Alain Gey^{8,9}, Eric Tartour^{8,9}, Ales Ryska⁴, Lorenzo Galluzzi^{10,11,12,13}, and Radek Spisek^{1,2}



Abstract

Purpose: In multiple oncological settings, expression of the coinhibitory ligand PD-L1 by malignant cells and tumor infiltration by immune cells expressing coinhibitory receptors such as PD-1, CTLA4, LAG-3, or TIM-3 conveys prognostic or predictive information. Conversely, the impact of these features of the tumor microenvironment on disease outcome among high-grade serous carcinoma (HGSC) patients remains controversial.

Experimental Design: We harnessed a retrospective cohort of 80 chemotherapy-naïve HGSC patients to investigate PD-L1 expression and tumor infiltration by CD8⁺ T cells, CD20⁺ B cells, DC-LAMP⁺ dendritic cells as well as by PD-1⁺, CTLA4⁺, LAG-3⁺, and TIM-3⁺ cells in relation with prognosis and function orientation of the tumor microenvironment. IHC data were complemented with transcriptomic and functional studies on a second prospective cohort of freshly

resected HGSC samples. *In silico* analysis of publicly available RNA expression data from 308 HGSC samples was used as a confirmatory approach.

Results: High levels of PD-L1 and high densities of PD-1⁺ cells in the microenvironment of HGSCs were strongly associated with an immune contexture characterized by a robust T_H1 polarization and cytotoxic orientation that enabled superior clinical benefits. Moreover, PD-1⁺TIM-3⁺CD8⁺ T cells presented all features of functional exhaustion and correlated with poor disease outcome. However, although PD-L1 levels and tumor infiltration by TIM-3⁺ cells improved patient stratification based on the intratumoral abundance of CD8⁺ T cells, the amount of PD-1⁺ cells failed to do so.

Conclusions: Our data indicate that PD-L1 and TIM-3 constitute prognostically relevant biomarkers of active and suppressed immune responses against HGSC, respectively.

Introduction

The composition, localization, and functional orientation of the immunologic tumor microenvironment (TME) exhibit considerable degrees of variation, not only across patients, cancer types, and disease stages, but also across distinct metastatic lesions of the same primary tumor (1). Although little is known on how the immunologic profile of metastatic lesions affects disease outcome, in a large number of oncological indications, the immunologic configuration of the primary tumor bears robust prognostic or predictive information (2). For instance, high levels of the coinhibitory molecule CD274 (best known as PD-L1) predict (at least to some extent) the sensitivity of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients to immune-checkpoint blockers targeting PD-L1 or its cognate receptor, i.e., programmed cell death 1 (PDCD1, best known as PD-1; refs. 3, 4). Moreover, abundant infiltration by CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes (CTL) as well as signs of a T_H1-polarized immune response is associated with improved disease outcome in a variety of tumors (2, 5–7). However, little is known about the impact of PD-L1 levels and tumor infiltration by immune cells expressing PD-1 and other coinhibitory receptors such as cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4 (CTLA4), lymphocyte activating 3 (LAG-3), or hepatitis A virus cellular receptor 2 (HAVCR2, best known as TIM-3) on disease outcome in high-grade serous carcinoma (HGSC) patients.

On the one hand, Hatanishi and colleagues reported that PD-L1 expressed by cancer cells negatively correlates with limited

¹Department of Immunology, Charles University, 2nd Faculty of Medicine and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic. ²Sotio, Prague, Czech Republic. ³Department of Pathology and Molecular Medicine, Charles University, 2nd Faculty of Medicine and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic. ⁴The Fingerland Department of Pathology, Charles University, Faculty of Medicine and University Hospital Hradec Kralove, Czech Republic. ⁵Department of Gynecology and Obstetrics, Charles University, Faculty of Medicine and University Hospital Hradec Kralove, Czech Republic. ⁶Department of Gynecology and Obstetrics, Charles University, 3rd Faculty of Medicine and University Hospital Kralovske Vinohrady, Prague, Czech Republic. ⁷Department of Gynecology and Obstetrics, Charles University, 2nd Faculty of Medicine and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic. ⁸INSERM U970, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris-Cité, Paris, France. ⁹Service d'Immunologie Biologique, AP-HP, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France. ¹⁰Department of Radiation Oncology, Weill Cornell Medical College, New York, New York. ¹¹Sandra and Edward Meyer Cancer Center, New York, New York. ¹²Department of Dermatology, Yale School of Medicine, New Haven, Connecticut. ¹³Université Paris Descartes/Paris V, Paris, France.

Note: Supplementary data for this article are available at Clinical Cancer Research Online (<http://clincancerres.aacrjournals.org/>).

L. Galluzzi and R. Spisek share senior authorship of this article.

Corresponding Author: Jitka Fucikova, Charles University and Sotio, V Uvalu 84, Prague, 150 00, Czech Republic. Phone: 42-022-417-5114; Fax: 42-022-417-5114; E-mail: fucikova@sotio.com

Clin Cancer Res 2019;XX:XX-XX

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-4175

©2019 American Association for Cancer Research.

www.aacrjournals.org

AAGR OF1

Downloaded from clincancerres.aacrjournals.org on July 19, 2019. © 2019 American Association for Cancer Research.

Translational Relevance

The precise impact of PD-L1 expression levels and infiltration by PD-1⁺, CTLA4⁺, LAG-3⁺, and TIM-3⁺ T cells on the immunologic configuration of the tumor microenvironment in high-grade serous carcinoma (HGSC) has not yet been determined. Similarly, how these immunologic parameters influence survival in chemotherapy-naïve patients with HGSC undergoing curative surgery remains an open conundrum. Here, we demonstrate that elevated levels of PD-L1 in malignant cells as well as robust infiltration by PD-1⁺, CTLA4⁺, or LAG-3⁺ T cells are not indicative of T-cell exhaustion in patients with HGSC, but rather point to an ongoing IFN γ -dependent immune response with beneficial effects. Conversely, abundant infiltration by TIM-3⁺ is associated with poor disease outcome, indicating that TIM-3 has a prominent role in limiting immune responses against HGSCs. Our data suggest that TIM-3 inhibitors should be tested as neoadjuvant or adjuvant agents for the management of chemotherapy-naïve patients with HGSC.

infiltration by immune effector cells and hence poor disease outcome, reflecting the largely immunosuppressive activity of this molecule (8). On the other hand, various reports demonstrate that PD-L1 expression as a consequence of interferon gamma (IFN γ , best known as IFN γ) signaling is associated with strong infiltration by CD8⁺ CTLs, representing a mechanism of compensation against a therapeutically beneficial tumor-targeting immune response (9–13). Similarly, although some reports attribute to robust infiltration by PD-1⁺ cells a negative prognostic value, potentially linked to the highly exhausted status of these cells (14–16), other studies point to a rather beneficial effect (17, 18), perhaps linked to the fact that CD103⁺PD-1⁺CD8⁺ T cells appear to retain functional competence in the ovarian TME (19). We have recently demonstrated that CD20⁺ B cells and DC-LAMP⁺ dendritic cells (DC) infiltrating HGSC lesions have a positive prognostic value as they orchestrate a T_H1-polarized immune response coupled to abundant CD8⁺ CTL infiltration (5). However, the specific effect of PD-L1 levels and infiltration by immune cells expressing coinhibitory receptors on the composition and functional orientation of the TME in ovarian cancer patients, and how this influences disease outcome, remains to be clarified.

Here, we demonstrate that both elevated PD-L1 levels and high densities of PD-1⁺ cells in the HGSC TME are strongly associated with robust T_H1 polarization and cytotoxic orientation that enable superior clinical benefits, but only the former can be used to improve patient stratification based on the intratumoral abundance of CD8⁺ T cells. Conversely, not only CD8⁺ CTLs coexpressing PD-1 and TIM-3 present all the features of functional exhaustion, but their abundance has a negative independent prognostic value. Our data demonstrate that immunosuppression in the TME of therapy-naïve HGSC patients is dictated mainly by TIM-3.

Materials and Methods

Patients

Study group 1. A retrospective series of 80 formalin-fixed paraffin-embedded (PPFE) samples were obtained from patients with

Table 1. Main clinical and biological characteristic of study group 1

Variable	Overall cohort (n = 80)
Age	
Mean age (y) \pm SEM	61 \pm 10
Range	41–79
pTNM stage	
Stage I	20 (25%)
Stage II	7 (8.7%)
Stages III and IV	53 (66.3%)
Debulking	
R0	39 (48.5%)
R1	4 (5%)
R2	37 (46.3%)
Vital status of patients	
Alive	35 (43.7%)
Death	45 (56.3%)

HGSC who underwent primary surgery in the absence of neoadjuvant chemotherapy between 2008 and 2014 at University Hospital Hradec Kralove (Czech Republic). Baseline characteristics of these patients are summarized in Table 1. Pathology staging was performed according to the 8th TNM classification (2017), and histologic types were determined according to the current WHO classification (20, 21). Data on long-term clinical outcome were obtained retrospectively by interrogation of municipality registers or families. The protocol was approved by the local ethics committee (reference number 201607 S14P).

Study group 2. An additional series of 20 samples from HGSC patients was prospectively collected at University Hospital Motol (Prague, Czech Republic). This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and the protocol was approved by the local ethics committee (Progress UK, Q40/11). Written informed consent was obtained from patients before inclusion in the study. Baseline characteristics of these patients are summarized in Supplementary Table S1. The experimental design of the study is summarized in Supplementary Fig. S1.

IHC

As previously described, tumor specimens from study group 1 were fixed in neutral buffered 10% formalin solution and embedded in paraffin as per standard procedures (5). Immunostaining with antibodies specific for programmed cell death 1 (PDCD1, best known as PD1), CD274 (best known as PD-L1), lymphocyte activating gene 3 (LAG-3), cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4 (CTLA4), lysosomal associated membrane protein 3 (LAMP3; best known as DC-LAMP), CD8, and CD20 was performed according to conventional protocols (Supplementary Table S2). Briefly, tissue sections were deparaffinized, followed by antigen retrieval with Target Retrieval Solution (Leica) at pH 6.0 (for PD-L1), in TRIS EDTA pH 9.0 (for CTLA4, LAG-3, and PD-1) or pH 8.0 (for CD8, CD20, and DC-LAMP) in preheated water bath (98°C, 30 minutes). Sections were allowed to cool down to room temperature for 30 minutes, and endogenous peroxidase and alkaline phosphatase was blocked with 3% H₂O₂, levamisole, and blocking solution Bloxall (Vector), respectively, for 15 minutes. Thereafter, sections were treated with protein block (DAKO) for 15 minutes and incubated with primary antibodies, followed by the revelation of enzymatic activity. Sections were counterstained with hematoxylin (DAKO)

for 30 seconds. Images were acquired using a Leica Aperio AT2 scanner (Leica).

Cell quantification

PD-1⁺, CTLA4⁺, and LAG-3⁺ cells were differentially quantified in the stroma and tumor nests of whole tumor sections with Calopix software (Tribvn). As previously described, the density of CD8⁺ T cells, DC-LAMP⁺ DCs, and CD20⁺ B cells was quantified in the entire TME (5). Data are reported as the absolute number of positive cells/mm² (for PD-1⁺, CTLA4⁺, LAG-3⁺, DC-LAMP⁺, CD8⁺ cells) or cell surface/tumor section surface (for CD20⁺ cells). PD-L1 expression was scored in the intratumoral and stromal compartments as a percentage of tumor area and categorized as 1 (0%), 2 (1%–4%), 3 (5%–9%), and 4 (>10%), as previously described (22). Quantitative assessments were performed by three independent investigators (J. Fucikova, J. Rakova, L. Belicova) and reviewed by an expert pathologist (J. Laco and P. Skapa).

Flow cytometry

As previously described, total live mononuclear cells were isolated from fresh tumor specimens (5). Mononuclear cells were stained with multiple panels of fluorescent primary antibodies (Supplementary Table S3) or appropriate isotype controls for 20 minutes at 4°C in the dark, followed by washing and acquisition on a Fortessa flow cytometer (BD Biosciences). Flow cytometry data were analyzed with the FlowJo software (TreeStar).

Degranulation and IFN γ production after anti-PD-1 and anti-TIM-3 cultivation and *in vitro* stimulation

Mononuclear cells isolated from fresh tumor specimens (study group 2) were incubated with 10 μ g/mL anti-PD-1, 10 μ g/mL anti-TIM-3, and combination of both antibodies for 24 hours in 37°C and 5% CO₂. After cultivation, mononuclear cells were stimulated with 50 ng/mL phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) + 1 μ g/mL ionomycin in the presence of anti-CD107a FITC monoclonal antibody (BioLegend) for 1 hour followed by 3-hour incubation with brefeldin A (BioLegend). Unstimulated cells were used as control. Cells were then washed in PBS, stained with anti-CD45 PerCP (EXBIO), anti-CD3 Alexa Fluor 700 (EXBIO), anti-CD4 ECD (Beckman Coulter), and anti-CD8 HV500 (BD Biosciences) monoclonal antibodies, fixed in fixation/permeabilization buffer (eBioscience), permeabilized with permeabilization buffer (eBioscience), and intracellularly stained with anti-IFN γ PE-Cy7 (eBioscience) monoclonal antibody. Flow cytometry was performed on the LSRFortessa analyzer, and data were analyzed with the FlowJo software package (Supplementary Fig. S6B; Tree Star, Inc.).

Next-generation sequencing data analysis

As previously described, hierarchical clustering analysis was conducted for differentially expressed genes (DEG) using the PHEATMAP package in R, based on the Euclidean distance and complete clustering method (5). The MCP-counter R package was used to estimate the abundance of tissue-infiltrating immune cell populations (Supplementary Table S4; ref. 23).

The Cancer Genome Atlas (TCGA) data analysis

Patients with HGSC ($n = 308$) were identified in TCGA public database (<https://cancergenome.nih.gov/>). DEGs between the PD-L1^{hi} and PD-L1^{Lo} groups were determined using the

LIMMA-R package (24). Hierarchical clustering analysis was conducted using the ComplexHeatmap package, based on the Euclidean distance and complete clustering method (25). Immune analyses were performed using ClueGo (26). The MCP-counter R package was used to estimate the abundance of tissue-infiltrating immune cell populations (23).

In situ immunofluorescence of tumor-infiltrating lymphocytes

Tumor specimens from study group 1 were fixed in neutral buffered 10% formalin solution and embedded in paraffin as per standard procedures. Sections were therefore subjected to indirect immunofluorescence based on nonlabeled primary antibodies specific for PD-1, TIM-3, and CD8 coupled to appropriate HRP-polymer secondary antibodies, followed by Tyramide Signal Amplification reagents with fluorescent dyes (Supplementary Table S5). Isotype-matched antibodies were used as negative controls and DAPI-containing mounting medium (DAKO) was used for nuclear counterstaining.

Image analysis and automated cell count

Stained sections were imaged with an automated Vectra microscope (PerkinElmer), followed by analysis by inForm software (PerkinElmer) as described previously in detail (27). Data are reported as means of positive cells from 5 imaging fields acquired using a 20 \times objective. An independent operator and an expert pathologist confirmed phenotyping by visual inspection. In particular, each phenotyping image was double checked to minimize the risk of false determinations owing to potential overlaps in fluorescence and interoperator variance.

Statistical analysis

As previously described, survival analysis was performed using the Survival R package, using both log-rank tests and Cox proportional hazard regressions (5). For log-rank tests, the prognostic value of continuous variables was assessed using median cutoffs. For Cox proportional hazard regressions, cell densities were log-transformed. In multivariate Cox regressions, variables that were not significantly associated with prognosis in univariate analysis were not included, as well as variables intrinsically correlated. Cox proportional hazard regression analysis, log-rank analysis, Fisher exact tests, Student t tests, and the Wilcoxon and Mann-Whitney tests were used to assess statistical significance. P values are reported (considered not significant when >0.05).

Results

Tumor infiltration by CD8⁺ T lymphocytes, CD20⁺ B cells, and DC-LAMP⁺ DCs correlate with prolonged survival in patients with HGSC

Tumor samples from a retrospective series of 80 patients with HGSC who did not receive neoadjuvant chemotherapy (study group 1; Table 1) were analyzed for the densities of CD8⁺ T cells, CD20⁺ B cells, and DC-LAMP⁺ DCs by IHC (Supplementary Fig. S2A). As published previously by our group, HGSC patients with high density of CD8⁺ T cells (CD8^{hi}), CD20⁺ B cells (CD20^{hi}), and DC-LAMP⁺ DCs (DC-LAMP^{hi}) exhibited significantly longer relapse-free survival (RFS) and overall survival (OS) as compared with their low counterparts (CD8⁺ T cells RFS: $P = 0.03$, OS $P = 0.01$; CD20⁺ B cells RFS: $P = 0.02$, OS $P = 0.02$; DC-LAMP⁺ DCs RFS: $P = 0.0001$, OS $P < 0.0001$; Supplementary Fig. S2B and S2C). To assess whether infiltration by either CD20⁺ B cells or

Fucikova et al.

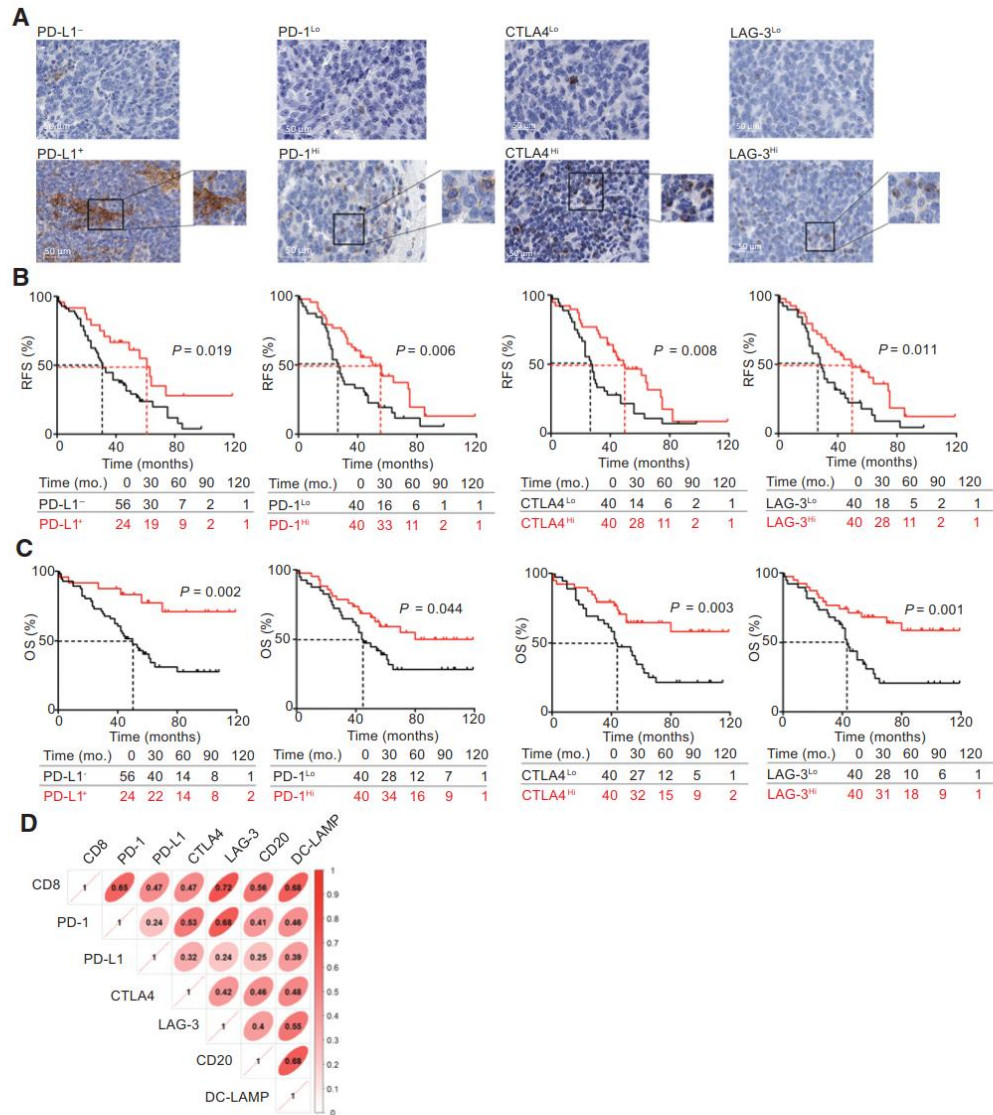


Figure 1. Prognostic impact of PD-L1⁺, PD-1⁺, CTLA4⁺, and LAG-3⁺ cells in the TME of chemotherapy-naïve HGSC patients. **A**, Representative images of PD-L1, PD-1, CTLA4, and LAG-3 immunostaining. Scale bar, 50 μm. RFS (**B**) and OS (**C**) of 80 patients with HGSC (study group 1) who did not receive neoadjuvant chemotherapy, upon stratifying patients based on a cutoff of 5% malignant cells with PD-L1 expression and median density of PD-1⁺, CTLA4⁺, and LAG-3⁺ cells in the tumor nests. Survival curves were estimated by the Kaplan-Meier method, and differences between groups were evaluated using the log-rank test. The number of patients at risk is reported. **D**, The correlation matrix for CD8⁺, PD-1⁺, PD-L1⁺, CTLA4⁺, LAG-3⁺, CD20⁺, and DC-LAMP⁺ cells in the tumor nest of HGSC patients (study group 1).

DC-LAMP⁺ DCs would improve the prognostic value of intratumoral CD8⁺ T cells only, we evaluated RFS and OS upon stratifying patients from study group 1 into four subsets for each marker (CD8^{Hi}/CD20^{Hi}, CD8^{Hi}/CD20^{Lo}, CD8^{Lo}/CD20^{Hi}, and CD8^{Lo}/CD20^{Lo} and CD8^{Hi}/DC-LAMP^{Hi}, CD8^{Hi}/DC-LAMP^{Lo}, CD8^{Lo}/DC-LAMP^{Hi}, and CD8^{Lo}/DC-LAMP^{Lo}). Indeed both CD8^{Hi}/CD20^{Hi} and CD8^{Hi}/DC-LAMP^{Hi} patients exhibited improved OS as compared with their CD8^{Hi}/CD20^{Lo} and CD8^{Lo}/DC-LAMP^{Lo} counterparts ($P = 0.006$ and $P = 0.005$, respectively; Supplementary Fig. S2D and S2E). These data confirm previous findings from our group indicating that a high density of tumor-infiltrating CD8⁺ T cells, CD20⁺ B cells, and DC-LAMP⁺ DCs correlates with improved disease outcome in chemotherapy-naïve HGSC patients, and that the density of CD20⁺ B cells and DC-LAMP⁺ DCs can be harnessed to identify CD8^{Hi} patients with relatively poor OS (5).

Activation of immune checkpoints correlates with improved disease outcome in HGSC patients

To elucidate the prognostic impact of immune-checkpoint status among chemotherapy-naïve HGSC patients, tumor samples from study group 1 (Table 1) were analyzed for the expression of PD-L1 in the tumor nest, as well as for the density of PD-1⁺, CTLA4⁺, and LAG-3⁺ cells by IHC (Fig. 1A; Supplementary Figs. S3 and S4). PD-L1 levels as well as infiltration by PD-1⁺, CTLA4⁺, and LAG-3⁺ cells were heterogeneous across samples but did not differ based on the site of assessment (tumor stroma vs. tumor nests; Supplementary Fig. S5A) and pathologic disease stage (Supplementary Fig. S5B).

To assess the prognostic impact of PD-L1 expression in the TME, we evaluated RFS and OS upon stratifying patients (study group 1) based on a cutoff of 5% malignant cells with membranous PD-L1 expression, which is currently used in the clinic to identify patients eligible for PD-1/PD-L1 targeting immune-checkpoint blockers (28). Patients with PD-L1⁺ tumor nests (24 out of 80 patients) had prolonged RFS and OS as compared with their PD-L1⁻ counterparts (RFS: $P = 0.019$; OS: $P = 0.002$; Fig. 1B and C). Univariate Cox regression analysis confirmed a strong prognostic impact for PD-L1 expression in tumor nests [hazard ratio (HR) = 0.28; 95% confidence interval = 0.12–0.67; $P = 0.004$; Table 2], and the significance of this association was confirmed by multivariate analysis (HR = 0.3; 95% confidence interval = 0.12–0.61; $P = 0.007$; Table 3). These data suggest that high PD-L1 levels in the TME may be indicative of an ongoing immune response that favorably affects disease outcome among HGSC patients, regardless of the stage of the disease.

Next, we investigated RFS and OS upon stratifying study group 1 based on the median density of PD-1⁺, CTLA4⁺, or LAG-3⁺ cells infiltrating tumor nests (Fig. 1A; Supplementary Figs. S3 and S4). Patients with high density of PD-1⁺ cells (PD-1^{Hi}) in their TME exhibited significantly longer RFS and OS as compared with their PD-1^{Lo} counterparts (RFS: $P = 0.006$; OS: $P = 0.044$; Fig. 1B and C). Similar results were obtained when patients were stratified according to the median density of CTLA4⁺ and LAG-3⁺ cells (CTLA4 RFS: $P = 0.008$; OS: $P = 0.003$; LAG-3 RFS: $P = 0.011$; OS: $P = 0.001$; Fig. 1B and C). Univariate Cox regression analysis identified a positive prognostic impact only for tumor infiltration by CTLA4⁺ cells (HR = 0.89; 95% confidence interval = 0.8–0.98; $P = 0.017$; Table 2), which could not be confirmed on multivariate analysis (Table 3). Most likely, these findings reflect the strong correlation between the density of tumor-infiltrating CD8⁺ T cells

Table 2. Univariate Cox proportional hazard analysis

Variable	OS	
	HR (95% CI)	P
Stage 2	0.5 (0.058–4.25)	0.523
Stage 3	3.87 (1.51–9.9)	0.004
Stage 4	5.34 (1.27–22.4)	0.022
Age	1 (1–1)	0.04
Debulking R1	1.24 (0.29–5.43)	0.02
Debulking R2	2.14 (1.13–4.03)	0.02
CA125	1.00 (1.00–1.00)	0.14
PD-1	0.98 (0.96–1.00)	0.10
PD-L1	0.28 (0.12–0.67)	0.004
CTLA4	0.89 (0.8–0.98)	0.017
LAG-3	0.98 (0.95–1.00)	0.084
TIM-3	1.03 (1.00–1.06)	0.04
CD8	1 (1.00–1.00)	0.017
DC-LAMP	0.86 (0.76–0.97)	0.014
CD20	0.23 (0.05–1.00)	0.05

and the intratumoral abundance of PD-1⁺, CTLA4⁺, and LAG-3⁺ cells (Fig. 1D), suggesting that PD-1, CTLA4, and LAG-3 largely behave as T-cell markers in this setting.

PD-L1 levels positively correlate with antitumor immunity and improved disease outcome in HGSC

To further characterize the impact of PD-L1 expression on the immunologic profile of HGSCs, we used RNA-seq to compare gene-expression profiles in PD-L1⁻ vs. PD-L1⁺ patients. We identified a set of 1,114 genes that were significantly overrepresented in samples from PD-L1⁺ patients as compared with their PD-L1⁻ counterparts (Fig. 2A). Functional studies revealed a strong association between such DEGs with immune system activation and inflammation. Alongside, we used the MCP-counter R package to estimate the relative expression levels of different cell populations in the TME of PD-L1⁺ and PD-L1⁻ patients. Compared with their PD-L1⁻ counterparts, PD-L1⁺ tumors were enriched in gene sets specific for T cells ($P < 0.0001$) and CD8⁺ T cells ($P < 0.0001$; Fig. 2B). To validate these findings with another technique, we next analyzed the relationship between PD-L1 expression and the intratumoral abundance of CD8⁺ CTLs by IHC (study group 1). We observed significantly higher densities of CD8⁺ CTLs infiltrating tumor nests ($P < 0.0001$) in samples from PD-L1⁺ versus PD-L1⁻ patients (Fig. 2C). Similar results were obtained for CD20⁺ B cells and DC-LAMP⁺ DCs (Fig. 2C), confirming previous results from our group (5). Moreover, to address the functional properties of HGSC-infiltrating CD8⁺ CTLs from PD-L1⁺ versus PD-L1⁻ patients, we performed a flow cytometry analysis on 20 freshly resected HGSCs (study group 2; Supplementary Table S1) on which PD-L1 status had been previously assessed by IHC. We observed significantly higher percentages of CD8⁺ CTLs expressing IFN γ ($P = 0.015$), as well as of CD8⁺ CTLs coexpressing IFN γ and granzyme B (GZMB, a key CTL effector; $P = 0.044$) or CD107a (a marker of CTL activation; $P = 0.039$), in PD-L1⁺ versus PD-L1⁻ patients (Fig. 2D). Moreover, we observed a correlation between CD274 mRNA levels and IFN γ mRNA levels ($R = 0.61$;

Table 3. Multivariate Cox proportional hazard analysis

Variable	OS	
	HR (95% CI)	P
Stage 4	119.78 (2.18–4518.48)	0.01
PD-L1	0.3 (0.12–0.61)	0.007
TIM-3	1.41 (1.1–1.9)	0.03

Fucikova et al.

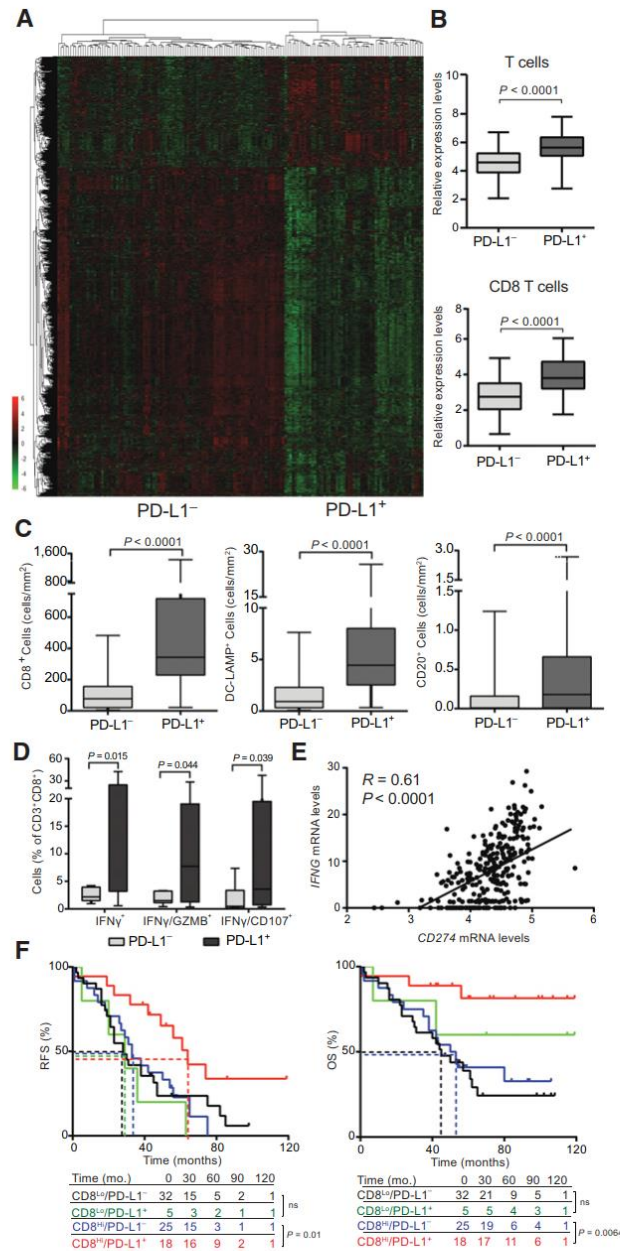
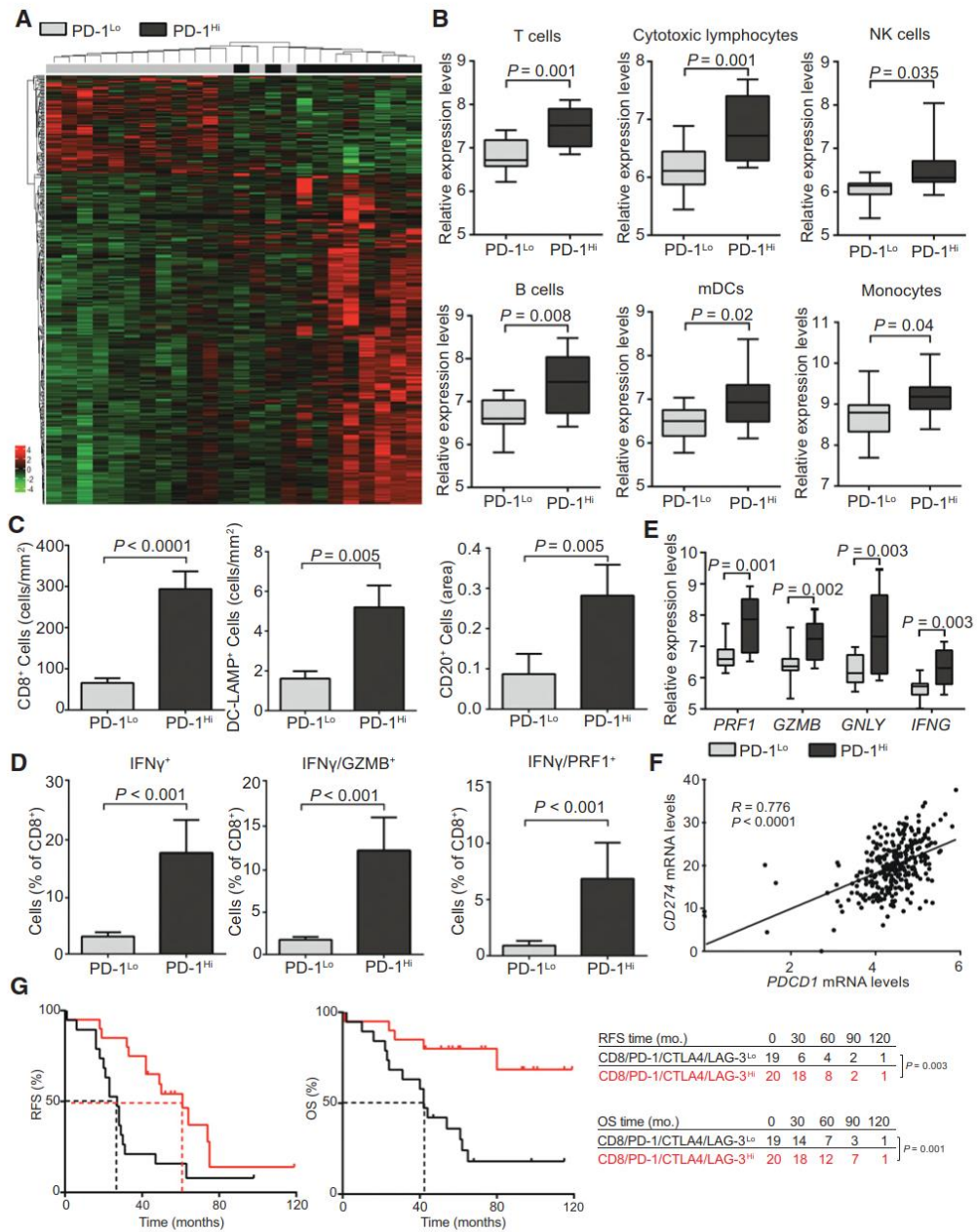


Figure 2. PD-L1 levels positively correlate with antitumor immunity in HGSC. **A**, Hierarchical clustering of 1,114 genes that were significantly changed in 154 PD-L1⁺ patients as compared with their 154 PD-L1⁻ counterparts from the TCGA public database. **B**, Relative expression levels of gene sets associated with T cells and CD8⁺ T cells across PD-L1⁺ and PD-L1⁻ HGSCs, as determined by MCP-counter on RNA-seq data from the TCGA public database. Box plots: lower quartile, median, upper quartile; whiskers, minimum, maximum. **C**, Density of CD8⁺ T cells, DC-LAMP⁺ DCs, and CD20⁺ B cells in the tumor nests in PD-L1⁻ and PD-L1⁺ HGSCs ($n = 80$; study group 1). Box plots: lower quartile, median, upper quartile; whiskers, minimum, maximum. **D**, Percentage of IFN γ ⁺, IFN γ ⁻/GZMB⁺, and IFN γ ⁻/CD107⁺ cells among CD3⁺CD8⁺ cells from the HGSCs of PD-L1⁻ and PD-L1⁺ patients after nonspecific stimulation (study group 2). Box plots: lower quartile, median, upper quartile; whiskers, minimum, maximum. **E**, Correlation between the *IFNG* mRNA expression levels and *CD274* mRNA expression in 308 HGSC patients from the TCGA public database. R, Pearson correlation coefficient. **F**, RFS and OS of HGSC patients who did not receive neoadjuvant chemotherapy, upon stratification based on median density of CD8⁺ T cells and PD-L1 levels (study group 1). Survival curves were estimated by the Kaplan-Meier method, and differences between groups were evaluated using log-rank test. The number of patients at risk is reported.



Fucikova et al.

$P < 0.0001$) in HGSC patients from the TCGA public database (Fig. 2E). Conversely, rIFN γ failed to alter the percentage of PD-L1 $^+$, PD-1 $^+$, and CTLA4 $^+$ CD8 $^+$ T cells, irrespective of whether the latter were exposed to rIFN γ alone or in the presence of malignant cells that could or could not engage in physical contacts (study group 2; Supplementary Fig. S6). These findings suggest that IFN γ has limited short-term effect on CD8 $^+$ T cells isolated from the tumor microenvironment, but favors PD-L1 expression on malignant cells, in line with previous reports (10).

Because both CD8 $^+$ T cells and PD-L1 influence disease outcome in patients with HGSC not receiving neoadjuvant chemotherapy, we assessed RFS and OS upon stratifying patients from study group 1 into four subsets (CD8 $^{\text{HI}}$ /PD-L1 $^+$, CD8 $^{\text{HI}}$ /PD-L1 $^-$, CD8 $^{\text{LO}}$ /PD-L1 $^+$, and CD8 $^{\text{LO}}$ /PD-L1 $^-$). We found that CD8 $^{\text{HI}}$ /PD-L1 $^+$ patients had improved RFS and OS as compared with their CD8 $^{\text{HI}}$ /PD-L1 $^-$ counterparts ($P = 0.01$ and $P = 0.0064$, respectively; Fig. 2F). Importantly, the same did not hold true in the CD8 $^{\text{LO}}$ patient subset (Fig. 2F). Taken together, these findings indicate that high PD-L1 levels in the TME of HGSC infiltrated by CD8 $^+$ CTLs are indicative of an active IFN γ -dependent immune response that positively influences disease outcome.

Tumor infiltration by PD-1 $^+$ cells correlates with improved antitumor immunity in HGSC patients

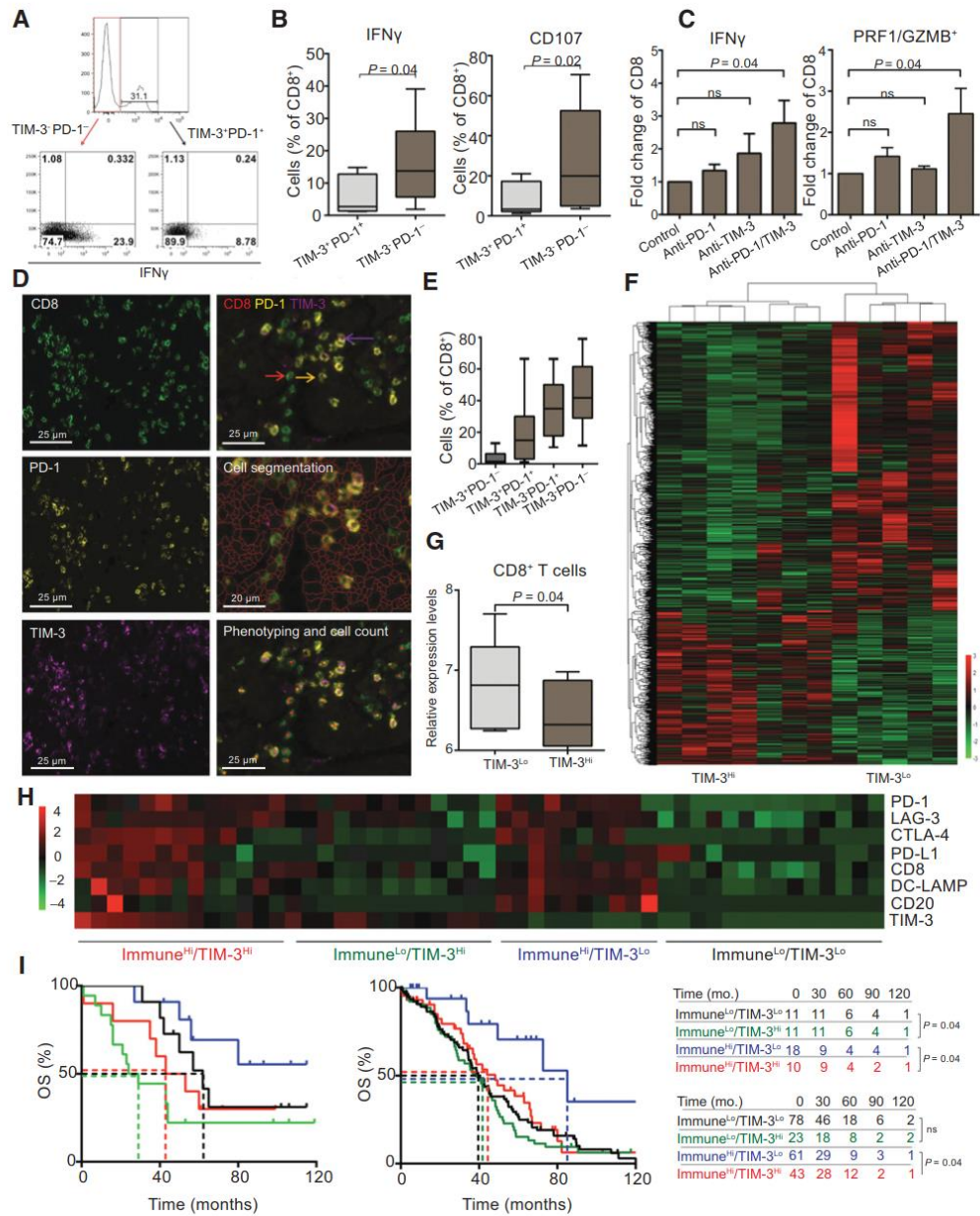
We performed RNA-sequencing to compare gene-expression profiles from 24 HGSCs from study group 1 for which PD-1 status had been evaluated by IHC. We identified a set of 425 transcripts that are significantly overrepresented in samples from PD-1 $^{\text{HI}}$ lesions as compared with their PD-1 $^{\text{LO}}$ counterparts (Fig. 3A; Supplementary Table S6). Pathway studies revealed a strong association of such DEGs and immune system activation and inflammation. Alongside, we used the MCP-counter R package to estimate the relative expression levels of gene sets linked to specific immune cell populations in the TME of PD-1 $^{\text{HI}}$ versus PD-1 $^{\text{LO}}$ patients. Compared with their PD-1 $^{\text{LO}}$ counterparts, PD-1 $^{\text{HI}}$ HGSCs exhibited overrepresentation of gene sets specific for T cells ($P = 0.001$), cytotoxic lymphocytes ($P = 0.001$), NK cells ($P = 0.035$), B cells ($P = 0.008$), DCs ($P = 0.02$), and monocytes ($P = 0.04$; Fig. 3B). Next, we performed IHC to obtain further insights into the links between PD-1 $^+$ cell infiltration and the abundance of CD8 $^+$ CTLs, DC-LAMP $^+$ DCs, and CD20 $^+$ B cells in HGSC samples (study group 1). We observed higher densities of CD8 $^+$ T cells ($P < 0.0001$), DC-LAMP $^+$ DCs ($P = 0.005$), and CD20 $^+$ B cells ($P = 0.005$) in the TME of PD-1 $^{\text{HI}}$ patients as compared with their PD-1 $^{\text{LO}}$ counterparts (Fig. 3C; Supplementary Fig. S7), corroborating the notion that PD-1 $^{\text{LO}}$ lesions have a scarce immune infiltrate. To investigate the func-

tional profile of CD8 $^+$ CTLs from PD-1 $^{\text{HI}}$ versus PD-1 $^{\text{LO}}$ HGSCs, we harnessed study group 2 (Supplementary Table S1) to perform flow cytometry on freshly resected samples that were also previously scored for PD-1 $^+$ cell infiltration by IHC. PD-1 $^{\text{HI}}$ lesions contained a significantly higher percentage of CD8 $^+$ CTLs staining positively for IFN γ ($P < 0.001$), IFN γ and GZMB ($P < 0.001$), and IFN γ and perforin 1 (PRF1, another T-cell effector molecule; $P < 0.001$) upon nonspecific activation *ex vivo*, as compared with their PD-1 $^{\text{LO}}$ counterparts (Fig. 3D). Consistently, the mRNAs coding for multiple CD8 $^+$ T-cell effector molecules including *IFNG*, *PRF1*, *GZMB*, and *GZLY* were overrepresented in PD-1 $^{\text{HI}}$ versus PD-1 $^{\text{LO}}$ HGSCs, as determined by RNA-sequencing in study group 1 (Fig. 3E). Moreover, we found a strong correlation between the transcripts coding for PD-1 (*PDCD1*) and PD-L1 (*CD274*) ($R = 0.776$; $P < 0.0001$) in HGSC patients from the TCGA database (Fig. 3F). However, stratifying patients from Study group 1 into four subsets based on the frequency of tumor-infiltrating CD8 $^+$ T cells and PD-1 $^+$ cells (CD8 $^{\text{HI}}$ /PD-1 $^{\text{HI}}$, CD8 $^{\text{HI}}$ /PD-1 $^{\text{LO}}$, CD8 $^{\text{LO}}$ /PD-1 $^{\text{HI}}$, and CD8 $^{\text{LO}}$ /PD-1 $^{\text{LO}}$) failed to ameliorate the prognostic assessment provided by tumor-infiltrating CD8 $^+$ T cells only (Supplementary Fig. S8A). This is in line with (i) the fact that the density of tumor-infiltrating PD-1 $^+$ cells had no prognostic value in multivariate analyses (Table 3); (ii) and the robust correlation between the density of tumor-infiltrating PD-1 $^+$ and CD8 $^+$ cells (Fig. 1D), which is also evident when the sizes of CD8 $^{\text{HI}}$ /PD-1 $^{\text{HI}}$, CD8 $^{\text{HI}}$ /PD-1 $^{\text{LO}}$, CD8 $^{\text{LO}}$ /PD-1 $^{\text{HI}}$, and CD8 $^{\text{LO}}$ /PD-1 $^{\text{LO}}$ groups are compared (Supplementary Fig. S8A). The same applies to costratification based on CD8 and LAG-3 (study group 1; Supplementary Fig. S8B). Conversely, the density of tumor-infiltrating CTLA4 $^+$ cells behaves as PD-L1 levels in that CD8 $^{\text{HI}}$ /CTLA4 $^{\text{HI}}$ patients had improved RFS and OS compared with their CD8 $^{\text{HI}}$ /CTLA4 $^{\text{LO}}$ counterparts ($P = 0.06$ and $P = 0.002$, respectively; study group 1; Supplementary Fig. S8C). Notably, PD-L1 levels and infiltration by CTLA4 $^+$ cells were the two parameters investigated in this study with lowest degree of correlation with the intratumoral abundance of CD8 $^+$ T cells (Fig. 1D), indicating that low CTLA4 expression can be harnessed to identify CD8 $^{\text{HI}}$ HGSC patients with relatively poor disease outcome.

Finally, we evaluated the combined prognostic value of tumor infiltration by CD8 $^+$, PD-1 $^+$, CTLA4 $^+$, and LAG-3 $^+$ cells by stratifying study group 1 in two groups of patients based on high or low density of all parameters. Not surprisingly, patients with high levels of HGSC-infiltrating CD8 $^+$, PD-1 $^+$, CTLA4 $^+$, and LAG-3 $^+$ cells had superior RFS and OS as compared with their low counterparts ($P = 0.003$ and $P = 0.001$, respectively; Fig. 3G).

Figure 3.

Tumor infiltration by PD-1 $^+$ cells correlates with improved antitumor immunity in HGSC patients. **A**, Hierarchical clustering of 425 transcripts that were significantly changed in 12 PD-1 $^{\text{HI}}$ patients as compared with their 12 PD-1 $^{\text{LO}}$ counterparts, as determined by RNA-sequencing (study group 1). **B**, Relative expression levels of gene sets associated with T cells, CD8 $^+$ T cells, NK cells, B cells, mDCs, and monocytes across PD-1 $^{\text{HI}}$ and PD-1 $^{\text{LO}}$ HGSCs, as determined by MCP-counter on RNA-seq data from study group 1. Box plots: lower quartile, median, upper quartile; whiskers, minimum, maximum. **C**, Density of CD8 $^+$ T cells, DC-LAMP $^+$ DCs, and CD20 $^+$ B cells in the tumor nests in PD-1 $^{\text{LO}}$ and PD-1 $^{\text{HI}}$ HGSCs from study group 1 ($n = 80$). Box plots: lower quartile, median, upper quartile; whiskers, minimum, maximum. **D**, Percentage of IFN γ $^+$, IFN γ $^+$ /GZMB $^+$, and IFN γ $^+$ /PRF1 $^+$ cells among CD3 $^+$ CD8 $^+$ cells from the 20 HGSCs of PD-1 $^{\text{LO}}$ and PD-1 $^{\text{HI}}$ patients after nonspecific stimulation (study group 2). Box plots: lower quartile, median, upper quartile; whiskers, minimum, maximum. **E**, Relative expression levels of *PRF1*, *GZMB*, *GZLY*, and *IFNG* in 154 PD-1 $^{\text{LO}}$ and 154 PD-1 $^{\text{HI}}$ HGSCs from the TCGA public database, as determined by RNA-seq. Box plots: lower quartile, median, upper quartile; whiskers, minimum, maximum. **F**, Correlation between the *PDCD1* mRNA expression levels and *CD274* mRNA expression in 308 HGSC patients from the TCGA public database. R, Pearson correlation coefficient. **G**, RFS and OS of 80 HGSC patients from study group 1 who did not receive neoadjuvant chemotherapy, upon stratification based on median density of CD8 $^+$, PD-1 $^+$, CTLA4 $^+$, and LAG-3 $^+$ cells in tumor nests. Survival curves were estimated by the Kaplan-Meier method, and differences between groups were evaluated using the log-rank test. The number of patients at risk are reported.



Fucikova et al.

TIM-3 dictates clinically relevant immunosuppression in the TME of HGSCs

We were surprised by the fact that neither the PD-1/PD-L1 axis, neither CTLA4, nor LAG-3 appears to mediate clinically relevant immunosuppressive effects in the TME of chemotherapy-naïve HGSC patients (Figs. 1–3). We therefore investigated whether immunosuppression in this context would rather be under the control of another coinhibitory receptor, namely, TIM-3. To this aim, we first investigated the impact of TIM-3 expression on the functional properties of CD8⁺ TILs from 20 freshly resected HGSCs (study group 2; Supplementary Table S1) using flow cytometry (Fig. 4A). Remarkably, about one third of tumor-infiltrating CD8⁺ T cells expressed TIM-3 (mean 31.3%; SEM 32.6%), near to invariably in conjunction with PD-1. Nonspecific stimulation induced IFN γ production and CD107a exposure preferentially in TIM-3⁺PD-1⁺ cells as compared with their TIM-3⁺PD-1⁺ counterparts ($P = 0.04$ and $P = 0.02$, respectively; Fig. 4B). Moreover, incubation with anti-TIM3 and anti-PD-1 antibodies (but not with either antibody alone) increased the ability of bulk tumor-infiltrating CD8⁺ T cells to respond to nonspecific stimulation *in vitro* by synthesizing IFN γ and cytolytic molecules (i.e., GZMB, PRF1; study group 2; Fig. 4C). Thus, TIM-3⁺PD-1⁺ cells from the HGSC TME stand out as a functionally impaired CD8⁺ T-cell subpopulation with limited effector functions.

We have previously shown that the intratumoral levels of PD-1⁺ cells correlate with improved (rather than poor) disease outcome in chemotherapy-naïve HGSC patients (Fig. 1B and C), largely as they reflect CD8⁺ CTL infiltration in this setting (Fig. 1D; Supplementary Fig. S8A). Thus, we interrogated the impact of tumor infiltration by TIM-3⁺ cells on the immunologic profile of HGSCs and disease outcome. To this aim, we harnessed multispectral immunofluorescence staining combined with automated image analysis on a subset of 50 samples from study group 1 (Fig. 4D). In line with flow cytometry data (Fig. 4A), around 31.3% of the CD8⁺ T cells infiltrating HGSC expressed TIM-3, most often in combination with PD-1 (Fig. 4E). We then selected 6 TIM-3^{Lo} patients and compared their transcriptional profile with that of 6 TIM-3^{Hi} individuals (study group 1). We identified 1,460 genes that were significantly overrepresented in samples from TIM-3^{Lo} patients relative to their TIM-3^{Hi} counterparts (Fig. 4F; Supplementary Table S7), and functional studies revealed a strong association between such DEGs and immune system activation and inflammation. Moreover, compared with their TIM-3^{Hi} counterparts, TIM-3^{Lo} tumors exhibited overrepresentation (rather than underrepresentation, as expected if

TIM-3 behaved as a mere biomarker for T cells) of gene sets specific for CD8⁺ T cells ($P = 0.04$), as determined by MCP-counter R package (Fig. 4G).

As we observed a negative correlation between infiltration by TIM-3⁺ cells and the levels of several transcripts associated with T cells and immune system activation, we next evaluated the immunologic profile of the TME in TIM-3^{Lo} versus TIM-3^{Hi} tumors (as previously determined by multispectral immunofluorescence staining) by IHC (study group 1; Fig. 4H). This approach identified 4 different clusters of patients, which were characterized by either high levels of PD-L1 and extensive infiltration by CD8⁺, PD-1⁺, CTLA4⁺, LAG-3⁺, CD20⁺, and DC-LAMP⁺ cells (Immune^{Hi}) or the opposite situation (Immune^{Lo}), combined with abundant or limited infiltration by TIM-3 cells (Immune^{Hi}/TIM-3^{Hi}, Immune^{Hi}/TIM-3^{Lo}, Immune^{Lo}/TIM-3^{Hi}, and Immune^{Lo}/TIM-3^{Lo}; Fig. 4H).

Importantly, Immune^{Hi}/TIM-3^{Lo} patients had improved OS as compared with their Immune^{Hi}/TIM-3^{Hi} counterparts ($P = 0.04$), and so did Immune^{Lo}/TIM-3^{Lo} patients as compared with their Immune^{Lo}/TIM-3^{Hi} counterparts ($P = 0.04$; Fig. 4I). Such an effect could not be attributed to statistical differences in any parameter other than infiltration by TIM-3⁺ cells within the Immune^{Hi} and Immune^{Lo} patient subgroups (Supplementary Table S8). Similarly, Immune^{Lo}/TIM-3^{Lo} patients had improved OS as compared with their Immune^{Lo}/TIM-3^{Hi} counterparts ($P = 0.04$; Fig. 4I). Univariate Cox regression confirmed the negative prognostic impact of tumor infiltration by TIM-3⁺ cells (HR = 1.03; 95% confidence interval = 1.00–1.06; $P = 0.04$; Table 2), and the significance of this association was validated by multivariate analysis (HR = 1.41; 95% confidence interval = 1.1–1.9; $P = 0.03$) (Table 3). To corroborate our findings in an independent patient cohort, we retrieved normalized HAVCR2 levels (TIM-3) for 308 patients with HGSC from the TCGA database and stratified these them into 4 groups based on TIM-3 expression and the expression of genes linked to CD8⁺ T cells (CD8A), DCs (LAMP3, which codes for DC-LAMP) and B cells (MS4A1). Also in this setting, Immune^{Hi}/TIM-3^{Lo} had improved OS as compared with their Immune^{Hi}/TIM-3^{Hi} counterparts ($P = 0.04$; Fig. 4I). Altogether, these findings document a critical role for TIM-3 in the establishment of clinically relevant immunosuppression in TME of patients with HGSC.

Discussion

Coinhibitory receptors expressed on T cells play a major role in the establishment of clinically relevant immunosuppression

Figure 4.

TIM-3 dictates clinically relevant immunosuppression in the TME of HGSC. **A**, Gating strategy for TIM-3⁺PD-1⁺ TIM-3⁺PD-1⁺ cells (study group 2). The percentage of cells in each gate is reported. **B**, Percentage of IFN γ ⁺ and CD107⁺ CD8⁺ T cells among TIM-3⁺PD-1⁺ and TIM-3⁺PD-1⁺ CD8⁺ T cells. **C**, Fold change of IFN γ ⁺ and PRF1/GZMB⁺ CD8⁺ T cells after incubation with anti-PD-1, anti-TIM-3, and combination of anti-PD-1/anti-TIM-3 antibodies (study group 2). **D**, Representative images of CD8, PD-1, and TIM-3 multispectral immunofluorescence (left). Cells expressing CD8 (red arrow), cells coexpressing CD8 and PD-1 (yellow arrow), and cells coexpressing CD8, PD-1, and TIM-3 (violet arrow). For automated counting, inForm software allows cell segmentation based on DAPI staining of the nucleus and morphometric characteristics (right). **E**, Percentage of TIM-3⁺PD-1⁺, TIM-3⁺PD-1⁺, TIM-3⁺PD-1⁺, and TIM-3⁺PD-1⁺ CD8⁺ T cells as determined by *in situ* immunofluorescence in study group 1. **F**, Hierarchical clustering of 1,460 transcripts that were significantly changed in 6 TIM-3^{Lo} patients as compared with their 6 TIM-3^{Hi} counterparts from study group 1, as determined by RNA-sequencing. **G**, Relative expression levels of gene sets associated with CD8⁺ T cells across TIM-3^{Hi} and TIM-3^{Lo} HGSCs, as determined by MCP-counter on RNA-seq data from study group 1. Box plots: lower quartile, median, upper quartile; whiskers, minimum, maximum. **H**, Clustering of 50 HGSC patients from study group 1 based on densities of PD-1⁺, LAG-3⁺, CTLA-4⁺, PD-L1⁺, CD8⁺, DC-LAMP⁺, CD20⁺, and TIM-3⁺ cells as determined by IHC and multispectral immunofluorescence. **I**, OS of 50 and 308 HGSC patients from study group 1 and the TCGA public database who did not receive neoadjuvant chemotherapy, upon stratification based on the median density of TIM-3⁺ cells and immune infiltrate as indicated by clustering heat map. Survival curves were estimated by the Kaplan-Meier method, and differences between groups were evaluated using the log-rank test. The number of patients at risk is reported.

in the microenvironment of most (if not all) human malignancies (28–30). Consistent with this notion, immune-checkpoint blockers that prevent the binding of coinhibitory receptors with their cognate ligands mediate robust clinical efficacy in subsets of patients affected by melanoma, NSCLC, and urothelial carcinoma (31). This is especially true when coinhibitory ligands such as PD-L1 are highly expressed in the TME (3, 4, 28). Recent data indicate that PD-L1⁺ ovarian cancer patients may also obtain clinical benefits from PD-1-targeting immune-checkpoint blockers (32), reinstating the value of PD-L1 as a predictive biomarker for preselecting patients who are likely to respond to immunotherapies targeting the PD-1/PD-L1 axis.

The predictive value of PD-L1 has largely been attributed to its ability to identify tumors with active PD-1 signaling (33). Here, we demonstrate that high levels of PD-L1 are associated with improved disease outcome among chemotherapy-naïve (and immunotherapy-naïve) HGSC patients (Fig. 1), implying that the prognostic value of PD-L1 in our cohort of patients cannot be attributed to its ability to identify a therapeutic target for PD-1 blockers. Rather, our data suggest that high PD-L1 levels constitute a biomarker for spontaneous IFN γ -mediated antitumor immunity (Fig. 2). Consistent with this interpretation, HGSC patients with robust tumor infiltration by CD8⁺ T cells, but low levels of PD-L1 exhibited remarkably poor disease outcome as compared with patients with high levels of tumor-infiltrating T cells but high PD-L1 expression in the TME (Fig. 2). Moreover, tumor infiltration by T cells expressing coinhibitory receptors such as PD-1, CTLA4, and LAG-3 was associated with superior (rather than inferior) RFS and OS (Fig. 1), and neither of these parameters was able to improve patient stratification based on the intratumoral levels of CD8⁺ T cells only, with the possible exception of CTLA4 (Supplementary Fig. S8A–S8C). Thus, in the TME of chemotherapy-naïve HGSC patients, PD-1 and LAG-3 largely behave as biomarkers of infiltration by CD8⁺ T cells (Fig. 1D; Supplementary Fig. S8A–S8C), while PD-L1 expression identifies a clinically relevant, spontaneous anticancer immune response. To our surprise, a low density of CTLA4⁺ cells appears to identify a subgroup of CD8^{hi} HGSC patients with relatively poor (rather than good) disease outcome as compared with their CD8^{hi}CTLA^{hi} counterparts. Potentially, such an unexpected finding may either reflect the expression of CTLA4 by myeloid cells supporting antitumor immunity (34) or originate from the relatively low number of patients in the CD8^{hi}CTLA4^{lo} group.

We were surprised to find that neither of the major coinhibitory receptors we analyzed at first was associated with an independent negative prognostic value in our patient cohort, which led us to refocus our attention on the comparatively less known molecule TIM-3. We found that one third of CD8⁺ T cells that infiltrate chemotherapy-naïve HGSCs express TIM-3, generally in association with PD-1 (Fig. 4A and E). Not only such TIM-3⁺PD-1⁺ cells exhibit signs of functional exhaustion, both at baseline and upon nonspecific stimulation (Fig. 4B and C), but their abundance conveys a negative independent prognostic value that can be harnessed to obtain improved patient stratification (Fig. 4I). Moreover, only CD8⁺ T cells from TIM-3^{hi} (but not TIM-3^{lo}) patients are sensitive to TIM-3 blockade (in combination with PD-1, but not CTLA4, blockade; Supplementary Fig. S8D). These findings are in line

with data from other groups identifying the negative impact of TIM-3 expression on tumor-infiltrating CD8⁺ T cells in multiple oncological settings (27, 35–38). Moreover, they suggest that targeting TIM-3 with immune-checkpoint blockers may be a particularly promising approach for the treatment of HGSC. To the best of our knowledge, although multiple clinical trials are currently assessing the therapeutic profile of TIM-3-targeting agents in open-label settings, no study specifically testing TIM-3 inhibitors in ovarian cancer patients is currently recruiting participants (source: www.clinicaltrials.gov).

In conclusion, our findings demonstrate that PD-L1 and TIM-3 are biomarkers of active and suppressed, respectively, spontaneous immunity against HGSC. Besides identifying in TIM-3 a potentially actionable target for the treatment of HGSC patients, these data suggest that the ability of PD-L1 expression levels to identify patients who are likely to respond to PD-1- or PD-L1-targeting agents may reflect (at least to some extent or in some setting) the preexistence of a natural immune response against the tumor.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

L. Galluzzi is a consultant/advisory board member for Astra Zeneca, OmniSEQ, and The Luke Heller Foundation, and reports receiving commercial research grants from Lytix and Phosphatin. No potential conflicts of interest were disclosed by the other authors.

Authors' Contributions

Conception and design: J. Fucikova, J. Laco, L. Galluzzi, R. Spisek
Development of methodology: J. Fucikova, M. Hensler, L. Kasikova, L. Belicova, J. Pineau, A. Gey, E. Tartour
Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): J. Fucikova, J. Rakova, M. Hensler, L. Kasikova, L. Belicova, K. Hladikova, P. Skapa, J. Laco, I. Praznovec, M.J. Halaska, T. Brtnicky, R. Kodet, J. Pineau, A. Gey, E. Tartour, A. Ryska
Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): J. Fucikova, J. Rakova, M. Hensler, L. Kasikova, L. Belicova, K. Hladikova, L. Pecen, A. Fialova, J. Pineau, A. Gey, E. Tartour, L. Galluzzi
Writing, review, and/or revision of the manuscript: J. Fucikova, L. Kasikova, I. Truxova, P. Skapa, M.J. Halaska, J. Pineau, A. Gey, E. Tartour, A. Ryska, L. Galluzzi, R. Spisek
Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): J. Fucikova, J. Rakova, L. Kasikova
Study supervision: J. Fucikova, L. Galluzzi, R. Spisek

Acknowledgments

This study was exclusively sponsored by Sotio, Prague, Czech Republic. This study was supported by program PROGRES Q40/11, by the project BBMRI-CZ LM2015089, and by the European Regional Development Fund-Project BBMRI-CZ: Biobank network—a versatile platform for research on the etiopathogenesis of diseases, No. EF16 013/0001674. L. Galluzzi is supported by a Breakthrough Level 2 grant from the US Department of Defense (DoD), Breast Cancer Research Program (BRCP; #BC180476P1), by a startup grant from the Department of Radiation Oncology at Weill Cornell Medicine (New York), by industrial collaborations with Lytix (Oslo, Norway) and Phosphatin (New York), and by donations from Phosphatin (New York), the Luke Heller TECPR2 Foundation (Boston) and Sotio a.s. (Prague, Czech Republic).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received December 20, 2018; revised March 19, 2019; accepted May 9, 2019; published first May 10, 2019.

Fucikova et al.

References

- Fridman WH, Zitvogel L, Sautes-Fridman C, Kroemer G. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nat Rev Clin Oncol* 2017;14:717–34.
- Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006;313:1960–4.
- Skov BG, Kiss K, Ramsted J, Linnemann D. A technique to improve diagnostic information from fine-needle aspirations: immunohistochemistry on cytoscape. *Cancer* 2009;117:120–7.
- Passiglia F, Bronte G, Bazan V, Natoli C, Rizzo S, Galvano A, et al. PD-L1 expression as predictive biomarker in patients with NSCLC: a pooled analysis. *Oncotarget* 2016;7:19738–47.
- Truxova I, Kasikova L, Hensler M, Skapa P, Laco J, Pecan L, et al. Mature dendritic cells correlate with favorable immune infiltrate and improved prognosis in ovarian carcinoma patients. *J Immunother Cancer* 2018;6:139.
- Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature* 2017;541:321–30.
- Savas P, Salgado R, Denkert C, Sotiriou C, Darcy PK, Smyth MJ, et al. Clinical relevance of host immunity in breast cancer: from TILs to the clinic. *Nat Rev Clin Oncol* 2016;13:228–41.
- Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, Okazaki T, Tanaka Y, Yamaguchi K, et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:3360–5.
- Webb JR, Milne K, Kroeger DR, Nelson BH. PD-L1 expression is associated with tumor-infiltrating T cells and favorable prognosis in high-grade serous ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2016;141:293–302.
- Taube JM, Anders RA, Young GD, Xu H, Sharma R, McMiller TL, 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.
- Schalper KA, Velcheti V, Carvajal D, Wimberly H, Brown J, Pusztai L, et al. In situ tumor PD-L1 mRNA expression is associated with increased TILs and better outcome in breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2014;20:2773–82.
- Lipson EJ, Vincent JG, Loyo M, Kagohara LT, Lubner BS, Wang H, et al. PD-L1 expression in the Merkel cell carcinoma microenvironment: association with inflammation, Merkel cell polyomavirus and overall survival. *Cancer Immunol Res* 2013;1:54–63.
- D'Angelo SP, Shoushtari AN, Agaram NP, Kuk D, Qin LX, Carvajal RD, et al. Prevalence of tumor-infiltrating lymphocytes and PD-L1 expression in the soft tissue sarcoma microenvironment. *Hum Pathol* 2015;46:357–65.
- Muenst S, Soysal SD, Gao F, Obermann EC, Oertli D, Gillanders WE. The presence of programmed death 1 (PD-1)-positive tumor-infiltrating lymphocytes is associated with poor prognosis in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2013;139:667–76.
- Thompson RH, Dong H, Lohse CM, Leibovich BC, Blute ML, Cheville JC, et al. PD-1 is expressed by tumor-infiltrating immune cells and is associated with poor outcome for patients with renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007;13:1757–61.
- Giraldo NA, Becht E, Pages F, Skliris G, Verkarre V, Vano Y, et al. Orchestration and prognostic significance of immune checkpoints in the microenvironment of primary and metastatic renal cell cancer. *Clin Cancer Res* 2015;21:3031–40.
- Badoual C, Hans S, Merillon N, Van Ryswick C, Ravel P, Benhamouda N, et al. PD-1-expressing tumor-infiltrating T cells are a favorable prognostic biomarker in HPV-associated head and neck cancer. *Cancer Res* 2013;73:128–38.
- Takahashi H, Tomita N, Sakata S, Tsuyama N, Hashimoto C, Ohshima R, et al. Prognostic significance of programmed cell death-1-positive cells in follicular lymphoma patients may alter in the rituximab era. *Eur J Haematol* 2013;90:286–90.
- Webb JR, Milne K, Nelson BH. PD-1 and CD103 are widely coexpressed on prognostically favorable intraepithelial CD8 T cells in human ovarian cancer. *Cancer Immunol Res* 2015;3:926–35.
- O'Sullivan B, Brierley J, Byrd D, Bosman F, Kehoe S, Kossary C, et al. The TNM classification of malignant tumours-towards common understanding and reasonable expectations. *Lancet Oncol* 2017;18:849–51.
- Meinhold-Heerlein I, Fotopoulou C, Harter P, Kurzeder C, Mustea A, Wimberger P, et al. The new WHO classification of ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer and its clinical implications. *Arch Gynecol Obstet* 2016;293:695–700.
- Solomon B, Young RJ, Bressel M, Urban D, Hendry S, Thai A, et al. Prognostic significance of PD-L1(+) and CD8(+) immune cells in HPV(+) oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer Immunol Res* 2018. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-17-0299. [Epub ahead of print].
- Becht E, Giraldo NA, Lacroix L, Buttard B, Elarouci N, Petitprez F, et al. Estimating the population abundance of tissue-infiltrating immune and stromal cell populations using gene expression. *Genome Biol* 2016;17:218.
- Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* 2015;43:e47.
- Gu Z, Eils R, Schlesner M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics* 2016;32:2847–9.
- Bindea G, Mlecnik B, Hackl H, Charoentong P, Tosolini M, Kirilovsky A, et al. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics* 2009;25:1091–3.
- Granier C, Dariane C, Combe P, Verkarre V, Urien S, Badoual C, et al. Tim-3 expression on tumor-infiltrating PD-1(+)CD8(+) T cells correlates with poor clinical outcome in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2017;77:1075–82.
- Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell* 2015;27:450–61.
- Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2012;12:252–64.
- Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJ, Robert L, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* 2014;515:568–71.
- Vanpouille-Box C, Lhuillier C, Bezu L, Aranda F, Yamazaki T, Kepp O, et al. Trial watch: Immune checkpoint blockers for cancer therapy. *Oncoimmunology* 2017;6:e1373237.
- Varga A, Piha-Paul S, Ott PA, Mehnert JM, Berton-Rigaud D, Morosky A, et al. Pembrolizumab in patients with programmed death ligand 1-positive advanced ovarian cancer: analysis of KEYNOTE-028. *Gynecol Oncol* 2018;152:243–50.
- Sharpe AH, Pauken KE. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nat Rev Immunol* 2018;18:153–67.
- Halpernt MM, Konduri V, Liang D, Chen Y, Wing JB, Paust S, et al. Dendritic cell-secreted cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4 regulates the T-cell response by downmodulating bystander surface B7. *Stem Cells Dev* 2016;25:774–87.
- Hladikova K, Partlova S, Koucky V, Boucek J, Fonteneau JF, Zabrodsky M, et al. Dysfunction of HPV16-specific CD8+ T cells derived from oropharyngeal tumors is related to the expression of Tim-3 but not PD-1. *Oral Oncol* 2018;82:75–82.
- Zhou Q, Munger ME, Veenstra RG, Weigel BJ, Hirashima M, Munn DH, et al. Coexpression of Tim-3 and PD-1 identifies a CD8+ T-cell exhaustion phenotype in mice with disseminated acute myelogenous leukemia. *Blood* 2011;117:4501–10.
- Shayan G, Srivastava R, Li J, Schmitt N, Kane LP, Ferris RL. Adaptive resistance to anti-PD1 therapy by Tim-3 upregulation is mediated by the PI3K-Akt pathway in head and neck cancer. *Oncoimmunology* 2017;6:e1261779.
- Sakuishi K, Apetoh L, Sullivan JM, Blazar BR, Kuchroo VK, Anderson AC. Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J Exp Med* 2010;207:2187–94.

Clinical Cancer Research

TIM-3 Dictates Functional Orientation of the Immune Infiltrate in Ovarian Cancer

Jitka Fucikova, Jana Rakova, Michal Hensler, et al.

Clin Cancer Res Published OnlineFirst May 10, 2019.

Updated version	Access the most recent version of this article at: doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-4175
Supplementary Material	Access the most recent supplemental material at: http://clincancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2019/05/10/1078-0432.CCR-18-4175.DC1

E-mail alerts	Sign up to receive free email-alerts related to this article or journal.
Reprints and Subscriptions	To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at pubs@aacr.org .
Permissions	To request permission to re-use all or part of this article, use this link http://clincancerres.aacrjournals.org/content/early/2019/06/18/1078-0432.CCR-18-4175 . Click on "Request Permissions" which will take you to the Copyright Clearance Center's (CCC) Rightslink site.

8.4 *Prognostická role M2 makrofágů v nádorovém mikroprostředí metastatického karcinomu ovaria*

TME představuje velice komplexní a heterogenní strukturu, která se skládá nejen z buněk nádorových, ale také nenádorových, jako jsou buňky stromální, endoteliální, epiteliální a komponenty imunitního systému. TME hraje zcela zásadní roli v regulaci buněčného růstu a ovlivňuje metastatický potenciál maligních buněk. Z výsledků preklinického testování vyplývá, že složení a funkční orientace imunitního systému v TME v primárním tumoru pacientek s karcinomem ovaria má významný vliv na výslednou prognózu tohoto onemocnění. Nicméně složení a funkční orientace TME metastatické tkáně a jeho případný vliv na prognózu pacientek s HGSC není dosud jednoznačně objasněn.

V této studii jsme pomocí celogenomového sekvenování porovnali 24 párových vzorků primární (P-TME, z angl. primary tumor microenvironment) a metastatické (M-TME, z angl. metastatic tumor microenvironment) tkáně pacientek s HGSC a identifikovali jsme 1468 rozdílně exprimovaných genů. Zvýšená exprese genů v metastatické tkáni byla asociovaná zejména s remodelací extracelulární matrix a imunitním systémem. Toto pozorování je v souladu s výsledky retrospektivní imunohistochemické analýzy, která dokumentuje vyšší infiltraci CD8⁺ T buněk, CD20⁺ B buněk, DC-LAMP⁺ DC a NKp46⁺ buněk v M-TME oproti P-TME pacientek s HGSC. Z výsledků cytometrické analýzy vyplývá funkční inhibice T lymfocytů nacházejících se v M-TME, která není důsledkem zvýšené exprese inhibičních molekul, ale imunosupresivního cytokinového prostředí způsobeného zvýšenou infiltrací tumor asociovaných M2 makrofágů v M-TME pacientek s HGSC.

Autorka v této práci přispěla:

- Optimalizace imunohistochemických protokolů využitých v rámci této studie
- Retrospektivní imunohistochemická analýza zastoupení CD8⁺ T lymfocytů v nádorové tkáni
- Prospektivní analýza nádorové tkáně – zpracování čerstvé nádorové tkáně a multiparametrická cytometrická analýza vzorků
- Účast na revizi manuskriptu

M2 Macrophages Dictate Clinically Relevant Immunosuppression in Metastatic Ovarian Cancer

**Michal Hensler¹, Lenka Kasikova^{1,2}, Karel Fiser³, Jana Rakova¹, Petr Skapa⁴, Jan Laco⁵,
Tereza Lanickova^{1,2}, Ladislav Pecen¹, Iva Truxova¹, Sarka Vosahlikova¹, Irena Moserova¹,
Ivan Praznovec⁶, Vit Drochytsek⁷, Martina Rehackova⁷, Tomas Brtnicky⁸, Lukas Rob⁷, Jelena
Pistolc⁹, Vladimir Benes⁹, Ludek Sojka¹, Ales Ryska⁵, Catherine Sautes-Fridman^{10,11,12}, Wolf
Herve Fridman^{10,11,12}, Lorenzo Galluzzi^{12,13,14,15,16}, Radek Spisek^{1,2}, Jitka Fucikova^{1,2}**

¹Sotio, Prague, Czech Republic; ²Department of Immunology, Charles University, 2nd Faculty of Medicine and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic; ³CLIP-Childhood Leukemia Investigation Prague, Department of Pediatric Hematology and Oncology, 2nd Faculty of Medicine, Charles University Prague and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic; ⁴Department of Pathology and Molecular Medicine, Charles University, 2nd Faculty of Medicine and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic; ⁵The Fingerland Department of Pathology, Charles University, Faculty of Medicine and University Hospital Hradec Kralove, Czech Republic; ⁶Department of Gynecology and Obstetrics, Charles University, Faculty of Medicine and University Hospital Hradec Kralove, Czech Republic; ⁷Department of Gynecology and Obstetrics, Charles University, 3rd Faculty of Medicine and University Hospital Kralovske Vinohrady, Prague, Czech Republic; ⁸Department of Gynecology and Obstetrics, Charles University, 2nd Faculty of Medicine and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic; ⁹Genomics Core Facility, EMBL Heidelberg, Germany; ¹⁰INSERM, U1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France; ¹¹Sorbonne Université, Paris, France; ¹²Department of Radiation Oncology, Weill Cornell Medical College, New York, NY, USA; ¹³Sandra and Edward Meyer Cancer Center, New York, NY, USA; ¹⁴Caryl and Israel Englander Institute for Precision Medicine, New York, NY, USA; ¹⁵Department of Dermatology, Yale University School of Medicine, New Haven, CT, USA; ¹⁶Université de Paris, Paris, France.

Running title: Immunological configuration of the metastatic environment in ovarian carcinoma

Keywords: CCL22, dendritic cells; GATA3, IL6, IL10, PD-L1.

Abstract

Accumulating evidence indicates that the composition and functional configuration of the microenvironment of primary high-grade serous carcinomas (HGSCs) has a major impact on disease outcome. Conversely, little is known on the microenvironment of metastatic HGSCs and its potential influence on disease progression and patient survival. Here, we compared the transcriptional profiles of paired primary and metastatic samples from patients with HGSC to identify signatures of extracellular matrix remodeling and immune infiltration. However, metastasis infiltration by T cells, B cells, and natural killer (NK) cells had little impact on survival. Functional tests revealed that the T cell infiltrate of metastatic lesions is functionally impaired, but not as a consequence of checkpoint activation downstream of programmed cell death 1 (PDCD1, best known as PD-1), lymphocyte activating gene 3 (LAG-3), or hepatitis A virus cellular receptor 2 (HAVCR2, best known as TIM-3). Conversely, abundant cytokine signaling in support of tumor infiltration by M2 tumor-associated macrophages (TAMs) stands out as a potential mechanism for inhibited immunity at metastatic sites associated with poor disease outcome, indicating that M2 TAMs have a prominent role in limiting immune responses against HGSCs.

Introduction

Tumorigenesis is a complex and dynamic process, involving different steps: malignant transformation, local progression and metastatic dissemination (1). It is now clear that all these stages are influenced by a multitude of interactions between neoplastic cells and their environment (including epithelial, endothelial, stromal and immune cells, as well as the extracellular matrix), overall determining whether a newly formed lesion will be eradicated by the immune system, progress uncontrollably or be preserved temporarily under control as a dormant micrometastasis (2, 3). Of note, the composition, localization and functional orientation of the tumor microenvironment (TME) exhibit considerable degrees of heterogeneity, not only across patients, cancer types and disease stages, but also across distinct lesions of the same tumor (4-7). High-grade serous carcinoma (HGSC) represents one of the most lethal peritoneal cancers (8). The poor prognosis of patients with HGSC is mainly linked to early dissemination into the peritoneal cavity and establishment of therapy-resistant metastases (9). HGSCs display indeed a characteristic intraperitoneal metastatic spread, with a clear preference for the omentum (9). The omental microenvironment, which is surrounded by a single layer of mesothelial cells, is primarily composed of adipocytes embedded in a collagen matrix, with interspersed fibroblasts, endothelial cells, and resident immune cells (10, 11). During the metastatic process, these stromal cells are recruited and reprogrammed by their malignant counterparts to support cancer cell survival and proliferation (9). Accumulating data indicate that both the cellular and non-cellular components of the primary TME (P-TME) are dynamic, evolve with disease progression, and convey robust prognostic and predictive value (12, 13). However, the HGSC TME at metastatic sites (M-TME) is poorly defined. Similarly, it is unclear whether the immunological characteristics of the M-TME have prognostic or predictive value in patients with HGSC.

Here, we compared the transcriptional profile of 24 paired P- and M-TMEs of patients with HGSC, with the aim to identify molecular signatures that can predict TME composition and impact on

HENSLER *et al*

clinical outcome. Functional analyses of differentially expressed genes (DEGs) revealed a strong association with extracellular matrix organization and immune responses. By combining biomolecular, cytofluorometric and immunohistochemical studies, we demonstrate that the M-TME contain a higher density of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) as compared to the P-TME. However, TIL density in the M-TME is not associated with improved clinical outcome, largely due to the functional impairment imposed by robust immunosuppression at metastatic sites by M2 tumor-associated macrophages (TAMs).

Materials and methods

Patients. Study Group 1. A retrospective series of paired 80 primary tumors and 80 peritoneal metastatic formalin-fixed paraffin-embedded (PPFE) samples were obtained from patients with HGSC who underwent primary surgery in the absence of neoadjuvant chemotherapy between 2008 and 2014 at the University Hospital Hradec Kralove (Czech Republic) (*Study Group 1*). Baseline characteristics of these patients are summarized in **Table 1**. Pathology staging was performed according to the 8th TNM classification (2017), and histologic types were determined according to the current WHO classification (14, 15). Data on long-term clinical outcome were obtained retrospectively by interrogation of municipality registers or families. The protocol was approved by the local ethical committee (201607 S14P). An additional series of paired 15 primary tumor samples and 15 peritoneal metastases from patients with HGSC was prospectively collected at the University Hospital Motol (Prague, Czech Republic) and the University Hospital Kralovske Vinohrady (Prague, Czech Republic) (*Study Group 2*). Written informed consent was obtained from patients before inclusion in the study. The protocol was approved by the local ethical committee. The experimental design of study is summarized in **Supplemental Fig. 1**.

Immunohistochemistry. Immunostaining with antibodies specific for programmed cell death 1 (PDCD1, best known as PD-1), CD274 (best known as PD-L1), lymphocyte activating gene 3 (LAG-3), lysosomal-associated membrane protein 3 (LAMP3; best known as DC-LAMP), CD8, CD20 and NKp46 was performed according to conventional protocols as published previously (**Supplemental Table 1**) (12, 16, 17). Briefly, tumor specimens from Study Group 1 were fixed in neutral buffered 10% formalin solution and embedded in paraffin as per standard procedures. Tissue sections were deparaffinized, followed by antigen retrieval with Target Retrieval Solution (Leica) in TRIS EDTA at pH 6.0 (for PD-L1), pH 8.0 (for CD8, CD20, DC-LAMP and NKp46), or pH 9.0 (for LAG-3 and PD-1) in a heated water bath (98°C, 30 min). Endogenous peroxidase and alkaline phosphatase were blocked with 3% H₂O₂ and levamisole, respectively for 15 min. Thereafter,

HENSLER *et al*

sections were treated with protein block (DAKO) for 15 min and incubated with primary antibodies, followed by the revelation of enzymatic activity. Sections were counterstained with hematoxylin (DAKO) for 30 sec. Images of whole tumor sections were acquired using a Leica Aperio AT2 scanner (Leica).

Immunofluorescence. Slides were incubated for 20 minutes in NH_4Cl (50 mmol/L) to reduce autofluorescence and blocked in PBS supplemented with 2.5% bovine serum albumin (BSA) and 2.5% goat serum for 40 minutes at room temperature (RT). Subsequently, primary antibodies specific for CD68 and CD163 were applied for 1 hour at RT (**Supplemental Table 1**). Thereafter, slides were incubated with appropriate HRP Polymer secondary antibodies for 1 hour at RT, followed by Tyramide Signal Amplification (Thermo Fisher Scientific). Finally, sections were mounted with ProLong Gold antifade reagent containing DAPI (Thermo Fisher Scientific). The specificity of the staining was determined using appropriate isotype controls. Images of whole tumor sections were acquired using a Leica Aperio AT2 scanner (Leica).

Cell quantification. Infiltration of tumor nests by CD8^+ T cells, DC-LAMP^+ DCs, CD20^+ B cells, PD-1^+ , LAG-3^+ , NKp46^+ cells and $\text{CD68}^+\text{CD163}^+$ cells was quantified in whole tumor sections with Calopix software (Tribvn) as published previously (12, 16). Data are reported as absolute number of positive cells/ mm^2 (for PD-1^+ , LAG-3^+ , DC-LAMP^+ , CD8^+ , NKp46^+ , $\text{CD68}^+\text{CD163}^+$ cells) or cell surface/tumor section surface (for CD20^+ cells), as previously described (16, 17). PD-L1 expression was scored in the intratumoral and stromal compartments as a percentage of tumor area and categorized as 1 (0%), 2 (1-4%), 3 (5-9%) and 4 (>10%), as previously described (18). Quantitative assessments by Calopix software were performed by three independent investigators (JF, JR, LK) and reviewed by an expert pathologist (JL, PS).

Flow cytometry. Total live mononuclear cells were isolated from fresh tumor specimens, as previously described (16). Mononuclear cells were stained with multiple panels of fluorescent

primary antibodies (**Supplemental Table 2**) or appropriate isotype controls for 20 min at 4°C in the dark, following by washing and acquisition on a Fortessa flow cytometer (BD Bioscience). Flow cytometry data were analyzed with the FlowJo software (TreeStar).

Degranulation and IFN- γ production. Mononuclear cells isolated from fresh tumor specimens (Study Group 2) were incubated with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti-PD-1 and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti-TIM-3 antibodies for 24 hours at 37°C and 5% CO₂. Thereafter, mononuclear cells were stimulated with 50 ng/mL phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) + 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ionomycin for 1 h followed by 3 h incubation with brefeldin A (BioLegend). Unstimulated cells were used as control. Cells were washed in PBS, stained with anti-CD3 Alexa Fluor 700 (EXBIO), anti-CD4 ECD (Beckman Coulter) and anti-CD8 HV500 (BD Biosciences) monoclonal antibodies, fixed in fixation/permeabilization buffer (eBioscience), further permeabilized with permeabilization buffer (eBioscience) and intracellularly stained with an anti-IFN γ PE-Cy7 (eBioscience) and anti-GZMB BV421 (BD Bioscience) monoclonal antibody. Flow cytometry was performed on the LSRFortessa analyzer, and data were analyzed with the FlowJo software package (Tree Star, Inc.) (**Supplemental Fig. 2**).

NGS data analysis. Raw FASTQ sequencing files were aligned to human reference genome (build h19) with bowtie2 (version 2.3.2) and tophat2 (version 2.1). Expression levels as raw “counts” were calculated from aligned reads with mapping quality ≥ 10 using htseq-count (version 0.6.0). Differential gene expression analyses were performed using DESeq2 (version 1.24.0) in R. Heatmaps with hierarchical clustering analysis were assembled for DEGs using the ComplexHeatmap package in R (19) based on the Pearson distance and average clustering method. Functional and enrichment analysis of DEGs was performed using the ClusterProfiler (20) and the web-based tool REACTOME and METASCAPE. To estimate the relative abundance of immune cell populations we used “metagene” markers (21).

HENSLER *et al*

Statistical analysis. Survival analysis was performed using the Survival and Surminer R packages, using both Log-rank tests and Cox proportional hazard regressions. For Log-rank tests, the prognostic value of continuous variables was assessed using median cutoffs. For Cox-proportional hazard regressions, cell densities were log-transformed. In multivariate Cox regressions, variables that were not significantly associated with prognosis in univariate analysis, as well as variables intrinsically correlated to each other, were not included. Cox proportional hazard regression analysis, Log-rank analysis, Fisher's exact tests, Student's *t* tests, the Wilcoxon and Mann-Whitney tests were used to assess statistical significance, *p* values are reported (considered not significant when >0.05).

Results

Transcriptional characterization of primary versus metastatic HGSC microenvironments. We first set to harness RNA-seq to compare the gene expression profile of 24 paired primary (P-TME) and metastatic (M-TME) tumor samples from HGSC patients who did not receive neoadjuvant chemotherapy (Study Group 1) (**Table 1**). We identified a set of 1468 DEGs (**Supplemental Table 3**), associated with 3 main functional clusters (**Fig. 1A**). Enrichment analysis of Gene Ontology (GO) terms from Cluster 1, which was overrepresented in the P-TME, mainly identified DEGs linked to the female reproductive system (**Fig. 1B**). On the contrary, Clusters 2 and 3, which were overrepresented in the M-TME were enriched for genes linked to extracellular matrix organization, immune response, lymphocyte trafficking and immune system regulation (**Fig. 1B**). These data indicate that while the P-TME is dominated by ovary-associated genes, the M-TME contains an abundant immune infiltrate.

As published previously by us and others (12, 16, 22, 23), the composition, localization and functional orientation of the immunological P-TME of patients with HGSC convey robust prognostic and predictive information. However, little is known on the potential impact of the immunological M-TME on the clinical outcome of these patients. Driven by these premises, we employed “metagene” markers to estimate the relative abundance of different immune cell populations in the P-TME *versus* M-TME of Study Group 1. In line with whole-transcriptome findings (**Fig. 1B**), metastatic samples were enriched for gene sets associated with T cells ($p < 0.0001$), B cells ($p = 0.0002$), CD8⁺ T cells ($p = 0.0003$), dendritic cells (DCs, $p = 0.0005$), natural killer (NK) cells ($p = 0.0005$), T_{H1} cells ($p < 0.0001$), T_{H2} cells ($p = 0.009$), monocytes ($p = 0.0002$), as well as regulatory T (T_{REG}) cells ($p = 0.0002$) and myeloid-derived suppressor cells (MDSCs, $p < 0.0001$) (**Fig. 1C**). These findings indicate that both immunostimulatory and immunosuppressive cell subsets are increased in the M-TME of HGSCs as compared to their P-TME.

To validate these data with another technological approach and in a larger cohort of patients with HGSC, we next analyzed the composition of the immune infiltrate in paired 80 P-TME and 80 M-TME samples (from Study Group 1) by immunohistochemistry (**Fig. 2A**). Confirming transcriptomic observations, we detected a higher density of DC-LAMP⁺ mature DCs ($p < 0.0001$), CD20⁺ B cells ($p < 0.0001$), CD8⁺ T cells ($p = 0.001$) and NKp46⁺ NK cells ($p = 0.001$) in the M-TME as compared to the P-TME (**Fig. 2B**). To evaluate the prognostic impact of the P-TME and M-TME immune infiltrate, we investigated overall survival (OS) upon stratifying the entire patient cohort based on median values of DC-LAMP⁺ DCs, CD20⁺ B cells, CD8⁺ T cells and NKp46⁺ NK cells (**Fig. 2C, D**). As shown previously by us, robust tumor infiltration by DC-LAMP⁺ DCs, CD20⁺ B cells and CD8⁺ T cells in P-TME was associated with favorable OS in Study Group 1 (**Fig. 2C**). Moreover, patients with an abundant DC-LAMP⁺ DC infiltrate in the M-TME tissue exhibited significantly longer OS as compared to their DC-LAMP^{L0} counterparts ($p = 0.0084$). However, the density of CD20⁺ B cells, CD8⁺ T cells and NKp46⁺ NK cells in the M-TME failed to influence OS in this patient cohort (**Fig. 2D**). Univariate Cox analyses confirmed the prognostic impact of mature DC infiltration in the M-TME (HR=0.74, 0.60-0.92; $p = 0.006$) (**Table 2**).

Functional impairment of CD8⁺ T cells from the M-TME of HGSC patients. Surprised by the fact that M-TME-infiltrating CD8⁺ T cells had no impact on clinical outcome, at odds with their P-TME-infiltrating counterparts (12, 16), we set to compare the functional capacity of these two CD8⁺ T cell populations. To this aim, we focused on freshly resected tumors from a prospective cohort of 15 patients with HGSCs (Study Group 2). In this setting, non-specific stimulation of tumor-infiltrating mononuclear cells with PMA and ionomycin caused a more pronounced increase in CD8⁺ cells staining positively for the cytotoxic effector granzyme B (GZMB) when mononuclear cells were isolated from the P-TME *versus* the M-TME ($p = 0.04$) (**Fig. 3A, B**). Consistently, the mRNAs coding for multiple CD8⁺ T cell effector molecules including interferon gamma (*IFNG*; $p = 0.01$), perforin 1 (*PRF1*; $p = 0.04$), granulysin (*GNLY*; $p = 0.006$) and *GZMB* ($p = 0.005$) were

overrepresented in P-TME *versus* M-TME samples, as determined by RNA-sequencing in samples from Study Group 1 (**Fig. 3C**). These findings suggest that CD8⁺ T cells from the M-TME are functionally impaired and exhibit limited effector functions.

Since the expression of co-inhibitory receptors is a major driver of functional T cell exhaustion in multiple malignancies including ovarian cancer (24), we next profiled immune checkpoint status in the P-TME *versus* M-TME of patients with HGSC. To this aim, paired 80 P-TME and 80 M-TME samples from Study Group 1 were analyzed by immunohistochemistry for (1) expression of the co-inhibitory ligand PD-L1 in the tumor nest, and (2) infiltration by immune cells expressing the co-inhibitory receptors PD-1 (the receptor for PD-L1) and LAG-3 (**Supplemental Fig. 3**). Both PD-L1 expression and PD-1⁺ cell density in the M-TME positively associated with infiltration by DC-LAMP⁺ DCs ($p=0.03$ and $p=0.002$, respectively). Similar results were obtained for CD8⁺ T cells ($p=0.002$ and $p=0.01$, respectively) (**Fig. 3D**). However, PD-L1 levels as well as infiltration by PD-1⁺ and LAG-3⁺ cells were heterogeneous across samples and did not differ based on site of assessment (**Fig. 3E**), suggesting that the PD-1/PD-L1 axis and LAG-3 systems are not the major determinants of functional exhaustion in this setting.

These findings recapitulate previous results from our group on the P-TME, where functional exhaustion appears to mainly depend on the co-inhibitory receptor hepatitis A virus cellular receptor 2 (HAVCR2, best known as TIM-3) (12, 16). We therefore harnessed flow cytometry on samples from Study Group 2 to investigate whether TIM-3 is also operational in the M-TME (**Fig. 3F**). We found that simultaneously blocking PD-1 and TIM-3 improves the ability of CD8⁺ T cells from the P-TME, but not the M-TME, to respond to non-specific stimulation by synthesizing effector molecules including IFNG and GZMB (**Fig. 3G**). Moreover, the P-TME contains increased amount of PD-1⁺TIM-3⁺ cells as compared to the M-TME (**Supplemental Fig. 3B**), despite the fact that the overall T cell density is decreased (**Fig. 2B**). Thus, TIM-3 does not stand out as a major target for immunostimulation in the M-TME of HGSC patients.

We therefore hypothesized that immunosuppression in the M-TME would mostly originate from cytokine signaling. We investigated this possibility in our transcriptomic dataset from Study Group 1, identifying 33 DEGs linked to cytokine/chemokine signaling that were overrepresented in the M-TME over the P-TME (**Fig. 3H**). These DEGs encompass major players in cancer-associated immunosuppression by TAMs, including (but not limited to): C-C motif chemokine ligand 22 (CCL22), interleukin 6 (*IL6*), interleukin 10 (*IL10*), interleukin 10 receptor subunit alpha (*IL10RA*), GATA binding protein 3 (*GATA3*), and interferon regulatory factor 4 (IRF4) (**Fig. 3H**), supporting the possibility that the immunosuppressive circuitries at play in the M-TME stem from cytokine signaling (25).

M2 TAMs dictate clinically relevant immunosuppression in the M-TME of HGSC. Driven by the potential implication of TAM-dependent cytokine signaling in immunosuppression at metastatic sites, we harnessed immunofluorescence microscopy to study tumor infiltration by CD68⁺CD163⁺ M2 TAMs in paired 50 P-TME and 50 M-TME samples from Study Group 1 (**Fig. 4A**). We detected a higher density of M2 TAMs in the M-TME as compared to the P-TME ($p=0.008$) (**Fig. 4B**), but the abundance of M2 TAMs did not correlate with the frequency of various immune components of the M-TME including NKp46⁺, DC-LAMP⁺, CD20⁺ and CD8⁺ cells (**Fig. 4C**). To evaluate the prognostic impact of M2 TAMs in this patient cohort, we stratified patients from Study Group 1 based on median density of M2 TAMs in the P-TME and M-TME, followed by retrospective OS analysis. Although, the density of M2 TAMs in the P-TME failed to influence OS in this patient cohort, patients with a high density of M2 TAMs in the M-TME had poor OS as compared with their M2^{L^o} counterparts ($p=0.00033$) (**Fig. 4D**). Univariate Cox regression confirmed the negative prognostic impact of M-TME infiltration by M2 TAMs (HR=6.74, 1.58-28.68; $p=0.009$; **Table 2**) and the significance of this association was further corroborated by multivariate Cox regression (HR=10.85, 2.28-51.44; $p=0.002$; **Table 3**). We next compared the transcriptional profile of 12 patients with M2^{Hi} versus 12 M2^{L^o} M-TMEs (Study Group 1). We

identified 1016 genes that were significantly overrepresented in samples from M2^{Lo} patients as compared to their M2^{Hi} TAMs counterparts (**Fig. 4E**, **Supplemental Table 4**), and functional studies revealed a strong association between such DEGs and immune system activation and T cells proliferation (**Supplemental Fig. 4**). Moreover, we observed a negative correlation between M2 TAM infiltration of the M-TME and cytolytic activity (CYT) based on the levels of transcripts encoding the cytolytic effectors granzyme A (GZMA) and perforin (PRF1) (**Fig. 4F**) (26). These findings confirm the negative impact of M2 TAMs on the immune effector functions of the M-TME in HGSC patients. Upon stratifying patients from Study Group 1 into four subsets based on M2 TAM infiltration and CYT in the M-TME (M2^{Hi}/CYT^{Hi}, M2^{Hi}/CYT^{Lo}, M2^{Lo}/CYT^{Hi}, M2^{Lo}/CYT^{Lo}), we found that M2^{Lo}/CYT^{Hi} individuals had improved OS as compared to their M2^{Hi}/CYT^{Hi} counterparts (p=0.02) (**Fig. 4G**). Altogether, these findings document a critical role for M2 TAMs in the establishment of clinically relevant immunosuppression in the M-TME of patients with HGSC.

Discussion

Despite recent therapeutic advances, ovarian cancer still represents the most lethal of gynecological malignancies, mainly reflecting presentation at advanced disease stage with large tumor burden and extensive peritoneal involvement (11, 27). Both immunological and non-immunological components of the TME have been attributed prognostic and predictive value in patients with HGSC (12, 16, 22, 23, 28-32). In most cases, however, attention has been focused on the P-TME, largely reflecting sample availability from diagnostic or surgical procedures (33, 34). However, prognosis is largely determined by the establishment of metastatic sites with a complex TME (9). Thus, there is a strong need to improve our understanding of the different components of the M-TME and how they impact the tumor progression and disease outcome.

Here, we compared the transcriptomic profile of 24 paired primary and metastatic tumor samples from patients with HGSC who did not receive neoadjuvant chemotherapy. Enrichment analysis identified 2 gene clusters associated with extracellular matrix organization and immune responses that were overrepresented in M-TME *versus* P-TME samples (**Fig. 1**). Using functional and immunohistochemical analyses we confirmed that the M-TME contains a higher amount of immune cells than the P-TME (**Fig. 1 and Fig. 2**), but the density of CD8⁺ T cells, CD20⁺ B cells and NKp46⁺ NK cells in the M-TME largely failed to affect OS, with the only exception of DC-LAMP⁺ DCs on OS (**Fig. 2**). This is at odds with the well-established prognostic role of these cell populations in the P-TME (16, 23, 31, 35).

We therefore postulated that immune effectors are functionally impaired in the M-TME, but we could not attribute such an impairment to PD-1, LAG-3 or TIM-3 signaling (**Fig. 3**), despite our previous findings on the key role of the latter in the P-TME (12). These findings are in line with the poor clinical activity of immune checkpoint blockers in patients with late-stage HGSC (36). Conversely, we identified several genes involved in cytokine/chemokine signaling by M2 TAMs as

potential drivers of T-cell exhaustion in the M-TME, including IL10, CCL22 and components of the IL4 and IL13 signaling pathways (29, 30). Consistent with this, we found that the M-TME contains a higher amount of M2 TAMs than the P-TME (**Fig. 4**). Moreover, HGSC patients with robust M-TME infiltration by M2 TAMs exhibited inhibited immune responses at metastatic sites, correlating with poor disease outcome (**Fig. 4**). These findings are in line with previous data from other groups showing in different mice models that M2 TAMs facilitate the metastatic dissemination of ovarian cancer cells (37, 38).

In summary, our findings demonstrate that the microenvironment of primary and metastatic HGSC lesions from the same patient differ from each other with respect to immunological competence and prognostic impact, as they delineate for the first time the negative impact of M2 TAMs on the establishment of clinically relevant anticancer immune responses at the M-TME of patients with HGSCs.

HENSLER *et al*

Acknowledgements: This study was sponsored by Sotio, Prague. JL and AR were supported by program PROGRES Q40/11, by the project BBMRI-CZ LM2015089 and by the European Regional Development Fund-Project BBMRI-CZ.: Biobank network – a versatile platform for research on the etiopathogenesis of diseases, No: EF16 013/0001674. LG is supported by a Breakthrough Level 2 grant from the US Department of Defense (DoD), Breast Cancer Research Program (BRCP) (#BC180476P1), by the 2019 Laura Ziskin Prize in Translational Research (#ZP-6177, PI: Formenti) from the Stand Up to Cancer (SU2C), by a Mantle Cell Lymphoma Research Initiative (MCL-RI, PI: Chen-Kiang) grant from the Leukemia and Lymphoma Society (LLS), by a startup grant from the Dept. of Radiation Oncology at Weill Cornell Medicine (New York, US), by a Rapid Response Grant from the Functional Genomics Initiative (New York, US), by industrial collaborations with Lytix (Oslo, Norway) and Phosplatin (New York, US), and by donations from Phosplatin (New York, US), the Luke Heller TECPR2 Foundation (Boston, US) and Sotio a.s. (Prague, Czech Republic). KF was supported by Ministry of Health of the Czech Republic, grant no. NV18-08-00385.

Contributions: Concept and design: MH, PS, JL, LG, RS, JF; development of methodology: MH, LK, KF, IT, JF; acquisition of data: MH, LK, JR, PS, JL, TL, LP, IT, SV, IM, IP, VD, MV, TB, JP, VB, LS, JF; analysis and interpretation of data: MH, LK, KF, JR, LP, IT, JF; writing, review, and/or revision of the manuscript: MH, LK, WHF, CSF, LG, RS, JF; study supervision: MH, LG, RS, JF.

Conflict-of-interest disclosure: LG has received consulting fees from Astra Zeneca, Boehringer Ingelheim, Inzen and the Luke Heller TECPR2 Foundation, and he is member of Scientific Advisory Committees for Boehringer Ingelheim and OmniSEQ. The other authors declare no conflicts of interest.

Correspondence: Jitka Fucikova, Department of Immunology, Charles University, 2nd Medical school, V Uvalu 84, Prague 5, 150 00, Czech Republic; email: fucikova@sotio.com

Legends to Main Display Items

Figure 1. Transcriptional characterization of primary versus metastatic HGSCs.

(A) Hierarchical clustering of 1468 transcripts (fold change >2, adjusted *p*-value <0.05) that were significantly changed in paired 24 metastatic (M-TME) versus 24 primary (P-TME) samples from Study Group 1, as determined by RNA-sequencing.

(B) Gene Ontology (Biological processes) enrichment analysis of differentially expressed in M-TME versus P-TME. See also **Supplemental Table 3**.

(C) Relative expression levels of gene sets associated with T cells, B cells, CD8⁺ T cells, dendritic cells (DCs), natural killer (NK) cells, T_H1 cells, T_H2 cells, monocytes, regulatory T (T_{REG}) cells, and myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) across paired 24 P-TME and 24 M-TME samples, as determined by metagenes on RNA-seq data from Study group 1. Box plots: lower quartile, median, upper quartile; whiskers, minimum, maximum.

Figure 2. Prognostic impact of immune infiltrate in tumor microenvironment of primary and metastatic tissue of HGSC.

(A) Representative images of DC-LAMP, CD20, CD8 and NKp46 immunostaining in primary (P-TME) and metastatic (M-TME) samples from Study Group 1. Scale bar = 50 μm.

(B) Density of DC-LAMP⁺, CD20⁺, CD8⁺ cells and NKp46⁺ cells in paired 80 P-TME versus 80 M-TME samples from Study Group 1, as determined by immunostaining. Box plots: lower quartile, median, upper quartile; whiskers, minimum, maximum.

(C, D) Overall survival of 80 patients from Study Group 1 upon stratification based on median density of DC-LAMP⁺ cells, CD20⁺ cells, CD8⁺ cells, and NKp46⁺ cells in the P-TME (C) and M-

TME (D). Survival curves were estimated by the Kaplan-Meier method, and differences between groups were evaluated using log-rank test. Number of patients at risk and *p* values are reported.

Figure 3. Functional T-cell exhaustion in the M-TME of patients with HGSC.

(A, B) Percentage of IFN γ ⁺ and GZMB⁺ cells in the CD3⁺CD8⁺ population of the paired 15 primary (P-TME) and 15 metastatic (M-TME) microenvironment of patients from Study Group 2 upon non-specific stimulation with PMA and ionomycin, as determined by flow cytometry. Gating strategy **(A)** and quantitative results **(B)** are reported. Box plots: lower quartile, median, upper quartile; whiskers, minimum, maximum.

(C) Expression levels of *IFNG*, *PRF1*, *GZMB* and *GZMB* relative to *CD3E* in 24 P-TME versus 24 M-TME samples from Study group 1, as determined by RNA-sequencing. *p* values are reported.

(D) Density of CD8⁺ T cells and DC-LAMP⁺ DCs in the M-TME of PD-L1⁻ versus PD-L1⁺ and PD-1^{Lo} versus PD-1^{Hi} patients from Study Group 1 (n=80), as determined by immunostaining. Box plots: lower quartile, median, upper quartile; whiskers, minimum, maximum.

(E) Distribution of PD-L1 levels and density of PD-1⁺ and LAG-3⁺ cells in paired 80 P-TME and 80 M-TME samples from Study group 1, as determined by immunostaining. Box plots: lower quartile, median, upper quartile; whiskers, minimum, maximum.

(F) Gating strategy of IFN γ ⁺ CD3⁺CD8⁺ T cells in paired 15 P-TME and 15 M-TME samples (Study group 2). The percentage of cells in each gate is reported.

(G) Fold change of IFN γ ⁺ and GZMB⁺ CD8⁺ T cells isolated from paired 15 P-TME and 15 M-TME samples (Study Group 2) after non-specific stimulation with PMA and ionomycin in the context of PD-1 and TIM-3 blockage (Atbs) as determined by flow cytometry. *p* values are indicated.

HENSLER *et al*

(H) Hierarchical clustering of 33 genes linked to cytokine/chemokine signaling that were differentially expressed in paired 24 M-TME *versus* 24 P-TME samples from Study Group 1. *p* values are reported.

Figure 4. M2 TAMs dictates clinically relevant immunosuppression in the M-TME of HGSC.

(A) Representative images of CD68 and CD163 immunofluorescence. Cells expressing CD68 (green arrow), cell expressing CD163 (red arrow), cells co-expressing CD68 and CD163 (red/green arrow). For automated counting, Calopix software allows cell segmentation based on DAPI staining of the nucleus and morphometric characteristics.

(B) Density of M2 TAMs determined as CD68⁺CD163⁺ cells in the 50 P-TME and 50 M-TME of HGSCs from study group 1.

(C) The correlation matrix for M2 TAMs, NKp46⁺, DC-LAMP⁺, CD20⁺ and CD8⁺ cells in the tumor nest of HGSC patients (Study Group 1). The correlation coefficient is displayed.

(D) OS of 50 HGSC patients from study group 1 upon stratification based on the median density of M2 TAMs in P-TME and M-TME. Survival curves were estimated by the Kaplan-Meier method, and differences between groups were evaluated using log-rank test. Number of patients at risk and *p* values are reported.

(E) Hierarchical clustering of 1016 transcripts that were significantly changed in 12 M2^{Hi} M-TME patients as compared with their 12 M2^{Lo} M-TME counterparts from study group 1, as determined by RNA-sequencing.

(F) Relative expression levels of immune cytolytic activity index (CYT) based on transcript levels of granzyme A (GZMA) and perforin (PRF1) in 24 M2^{Lo} and 24 M2^{Hi} P-TME and M-TME samples of HGSC from study group 1, as determined by RNA-sequencing.

HENSLER *et al*

(G) OS of 50 HGSC patients from study group 1 upon stratification based on the median density of M2 TAMs and immune cytolytic activity index (CYT). Survival curves were estimated by Kaplan-Meier method, and difference between groups were evaluated using the log-rank test. Number of patients at risk and p values are reported.

Table 1. Main clinical and biological characteristic of Study Group 1.

Variable	Overall cohort (n=80)
Age (years)	
Median \pm SD	62 \pm 10
Range	49-83
pTNM stage	
Stage III	70 (87.5%)
Stage IV	10 (12.5%)
Debulking	
R0	28 (35%)
R1	8 (10%)
R2	44 (55%)
Vital status of patients	
Alive	27 (33.7%)
Dead	53 (66.3%)

Table 2. Univariate COX proportional hazard analysis.

Overall survival				
Variable	HR (95% CI)			p-value
Age	1.01 (0.98-1.04)			0.51
Stage 4	1.53 (0.65-3.58)			0.33
CA-125	1.00 (1.00-1.00)			0.036
Debulking				
R1	1.00 (0.33-2.98)			0.99
R2	2.06 (1.12-3.78)			0.019
	P-TME		M-TME	
DC-LAMP	0.74 (0.58-0.95)	0.018	0.74 (0.60-0.92)	0.006
CD8	0.87 (0.75-0.99)	0.039	0.90 (0.78-1.03)	0.11
CD20	0.35 (0.09-1.33)	0.12	0.85 (0.64-1.13)	0.26
NKp46	0.83 (0.54-1.27)	0.39	0.95 (0.72-1.25)	0.70
M2 macrophage	0.15 (0.01-3.20)	0.22	6.74 (1.58-28.68)	0.009

Table 3. Multivariate COX proportional hazard analysis.

Overall survival		
Variable	HR (95% CI)	p-value
M2 macrophage (M-TME)	10.85 (2.28-51.44)	0.002
DC-LAMP (P-TME)	0.32 (0.14-0.73)	0.006

References

1. Fridman WH, Zitvogel L, Sautes-Fridman C, Kroemer G. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nature reviews Clinical oncology*. 2017;14:717-34.
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144:646-74.
3. Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature*. 2017;541:321-30.
4. Maley CC, Aktipis A, Graham TA, Sottoriva A, Boddy AM, Janiszewska M, et al. Classifying the evolutionary and ecological features of neoplasms. *Nature reviews Cancer*. 2017;17:605-19.
5. Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*. 2011;147:275-92.
6. Giraldo NA, Becht E, Pages F, Skliris G, Verkarre V, Vano Y, et al. Orchestration and Prognostic Significance of Immune Checkpoints in the Microenvironment of Primary and Metastatic Renal Cell Cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2015;21:3031-40.
7. Remark R, Alifano M, Cremer I, Lupo A, Dieu-Nosjean MC, Riquet M, et al. Characteristics and clinical impacts of the immune environments in colorectal and renal cell carcinoma lung metastases: influence of tumor origin. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2013;19:4079-91.
8. Torre LA, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2016;25:16-27.
9. Lengyel E. Ovarian cancer development and metastasis. *The American journal of pathology*. 2010;177:1053-64.

10. Nieman KM, Kenny HA, Penicka CV, Ladanyi A, Buell-Gutbrod R, Zillhardt MR, et al. Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nature medicine*. 2011;17:1498-503.
11. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature medicine*. 2013;19:1423-37.
12. Fucikova J, Rakova J, Hensler M, Kasikova L, Belicova L, Hladikova K, et al. TIM-3 dictates functional orientation of the immune infiltrate in ovarian cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2019.
13. Kasikova L, Hensler M, Truxova I, Skapa P, Laco J, Belicova L, et al. Calreticulin exposure correlates with robust adaptive antitumor immunity and favorable prognosis in ovarian carcinoma patients. *Journal for immunotherapy of cancer*. 2019;7:312.
14. Meinhold-Heerlein I, Fotopoulou C, Harter P, Kurzeder C, Mustea A, Wimberger P, et al. The new WHO classification of ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer and its clinical implications. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2016;293:695-700.
15. O'Sullivan B, Brierley J, Byrd D, Bosman F, Kehoe S, Kossary C, et al. The TNM classification of malignant tumours-towards common understanding and reasonable expectations. *The Lancet Oncology*. 2017;18:849-51.
16. Truxova I, Kasikova L, Hensler M, Skapa P, Laco J, Pecen L, et al. Mature dendritic cells correlate with favorable immune infiltrate and improved prognosis in ovarian carcinoma patients. *Journal for immunotherapy of cancer*. 2018;6:139.
17. Goc J, Germain C, Vo-Bourgais TK, Lupo A, Klein C, Knockaert S, et al. Dendritic cells in tumor-associated tertiary lymphoid structures signal a Th1 cytotoxic immune contexture and license the positive prognostic value of infiltrating CD8+ T cells. *Cancer research*. 2014;74:705-15.
18. Solomon B, Young RJ, Bressel M, Urban D, Hendry S, Thai A, et al. Prognostic Significance of PD-L1(+) and CD8(+) Immune Cells in HPV(+) Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Cancer immunology research*. 2018.
19. Gu Z, Eils R, Schlesner M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics*. 2016;32:2847-9.

20. Yu G, Wang LG, Han Y, He QY. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *Omics : a journal of integrative biology*. 2012;16:284-7.
21. Angelova M, Charoentong P, Hackl H, Fischer ML, Snajder R, Krogsdam AM, et al. Characterization of the immunophenotypes and antigenomes of colorectal cancers reveals distinct tumor escape mechanisms and novel targets for immunotherapy. *Genome biology*. 2015;16:64.
22. Milne K, Kobel M, Kalloger SE, Barnes RO, Gao D, Gilks CB, et al. Systematic analysis of immune infiltrates in high-grade serous ovarian cancer reveals CD20, FoxP3 and TIA-1 as positive prognostic factors. *PloS one*. 2009;4:e6412.
23. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *The New England journal of medicine*. 2003;348:203-13.
24. Galluzzi L, Chan TA, Kroemer G, Wolchok JD, Lopez-Soto A. The hallmarks of successful anticancer immunotherapy. *Science translational medicine*. 2018;10.
25. Vitale I, Manic G, Coussens LM, Kroemer G, Galluzzi L. Macrophages and Metabolism in the Tumor Microenvironment. *Cell metabolism*. 2019;30:36-50.
26. Rooney MS, Shukla SA, Wu CJ, Getz G, Hacohen N. Molecular and genetic properties of tumors associated with local immune cytolytic activity. *Cell*. 2015;160:48-61.
27. Torre LA, Trabert B, DeSantis CE, Miller KD, Samimi G, Runowicz CD, et al. Ovarian cancer statistics, 2018. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2018;68:284-96.
28. Senovilla L, Vacchelli E, Galon J, Adjemian S, Eggermont A, Fridman WH, et al. Trial watch: Prognostic and predictive value of the immune infiltrate in cancer. *Oncoimmunology*. 2012;1:1323-43.
29. Barnett JC, Bean SM, Whitaker RS, Kondoh E, Baba T, Fujii S, et al. Ovarian cancer tumor infiltrating T-regulatory (T(reg)) cells are associated with a metastatic phenotype. *Gynecologic oncology*. 2010;116:556-62.
30. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature medicine*. 2004;10:942-9.

31. Hwang WT, Adams SF, Tahirovic E, Hagemann IS, Coukos G. Prognostic significance of tumor-infiltrating T cells in ovarian cancer: a meta-analysis. *Gynecologic oncology*. 2012;124:192-8.
32. Nielsen JS, Sahota RA, Milne K, Kost SE, Nesslinger NJ, Watson PH, et al. CD20+ tumor-infiltrating lymphocytes have an atypical CD27- memory phenotype and together with CD8+ T cells promote favorable prognosis in ovarian cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012;18:3281-92.
33. Bonome T, Levine DA, Shih J, Randonovich M, Pise-Masison CA, Bogomolny F, et al. A gene signature predicting for survival in suboptimally debulked patients with ovarian cancer. *Cancer research*. 2008;68:5478-86.
34. Yoshihara K, Tajima A, Yahata T, Kodama S, Fujiwara H, Suzuki M, et al. Gene expression profile for predicting survival in advanced-stage serous ovarian cancer across two independent datasets. *PloS one*. 2010;5:e9615.
35. Nelson BH. CD20+ B cells: the other tumor-infiltrating lymphocytes. *Journal of immunology*. 2010;185:4977-82.
36. Hamanishi J, Mandai M, Konishi I. Immune checkpoint inhibition in ovarian cancer. *International immunology*. 2016;28:339-48.
37. Robinson-Smith TM, Isaacsohn I, Mercer CA, Zhou M, Van Rooijen N, Hussein N, et al. Macrophages mediate inflammation-enhanced metastasis of ovarian tumors in mice. *Cancer research*. 2007;67:5708-16.
38. Yin M, Li X, Tan S, Zhou HJ, Ji W, Bellone S, et al. Tumor-associated macrophages drive spheroid formation during early transcoelomic metastasis of ovarian cancer. *The Journal of clinical investigation*. 2016;126:4157-73.

Figure 1

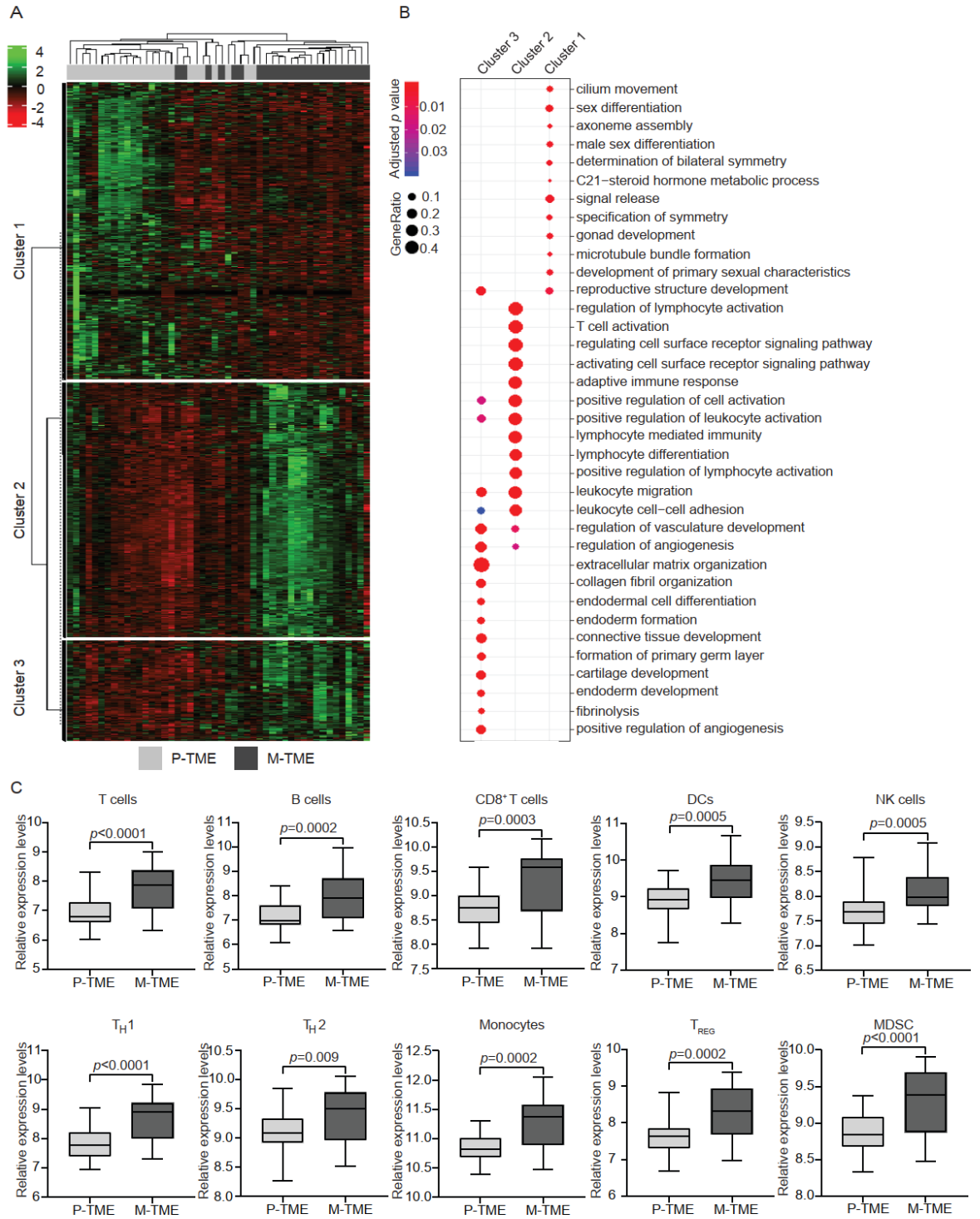


Figure 2

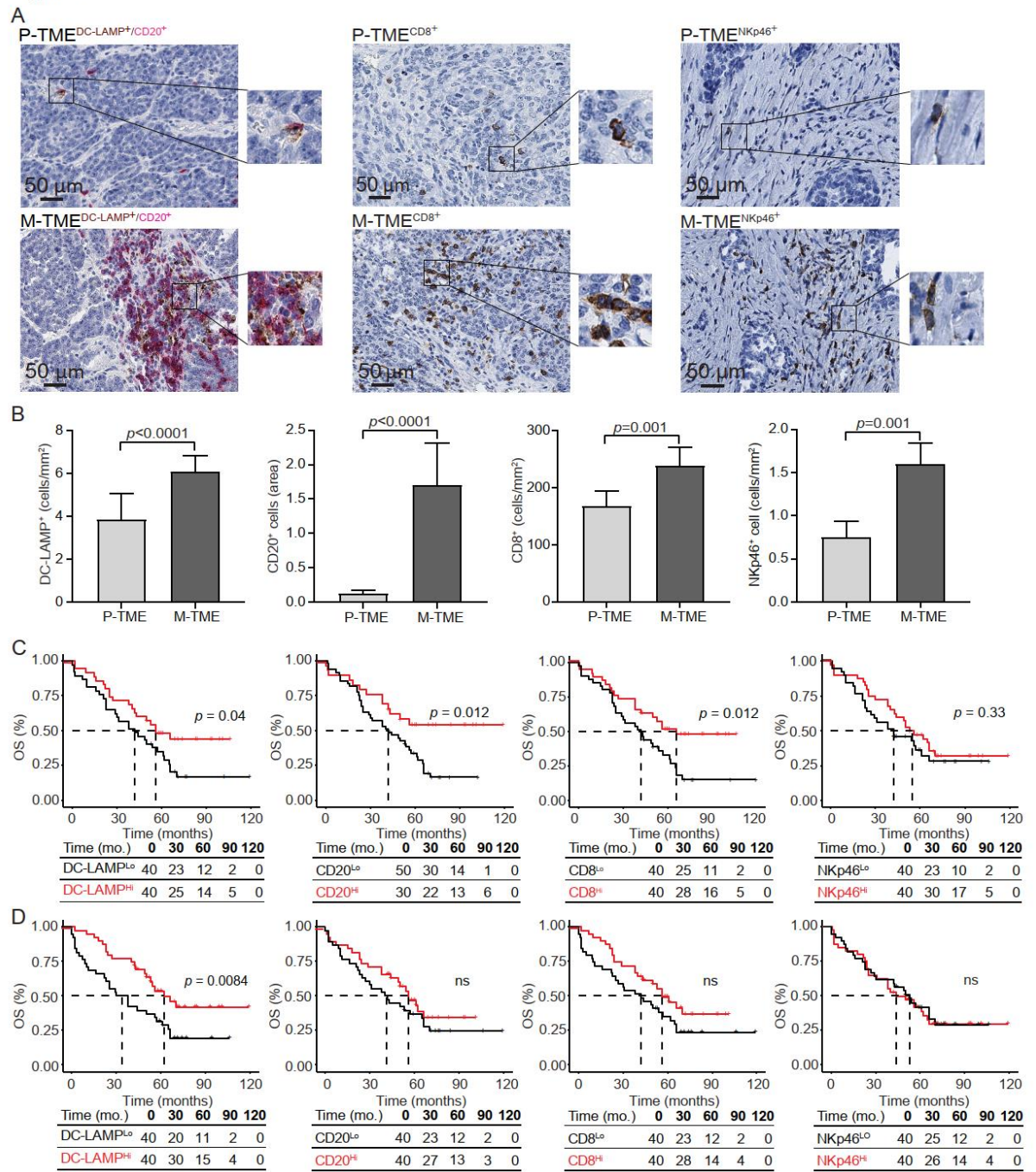


Figure 3

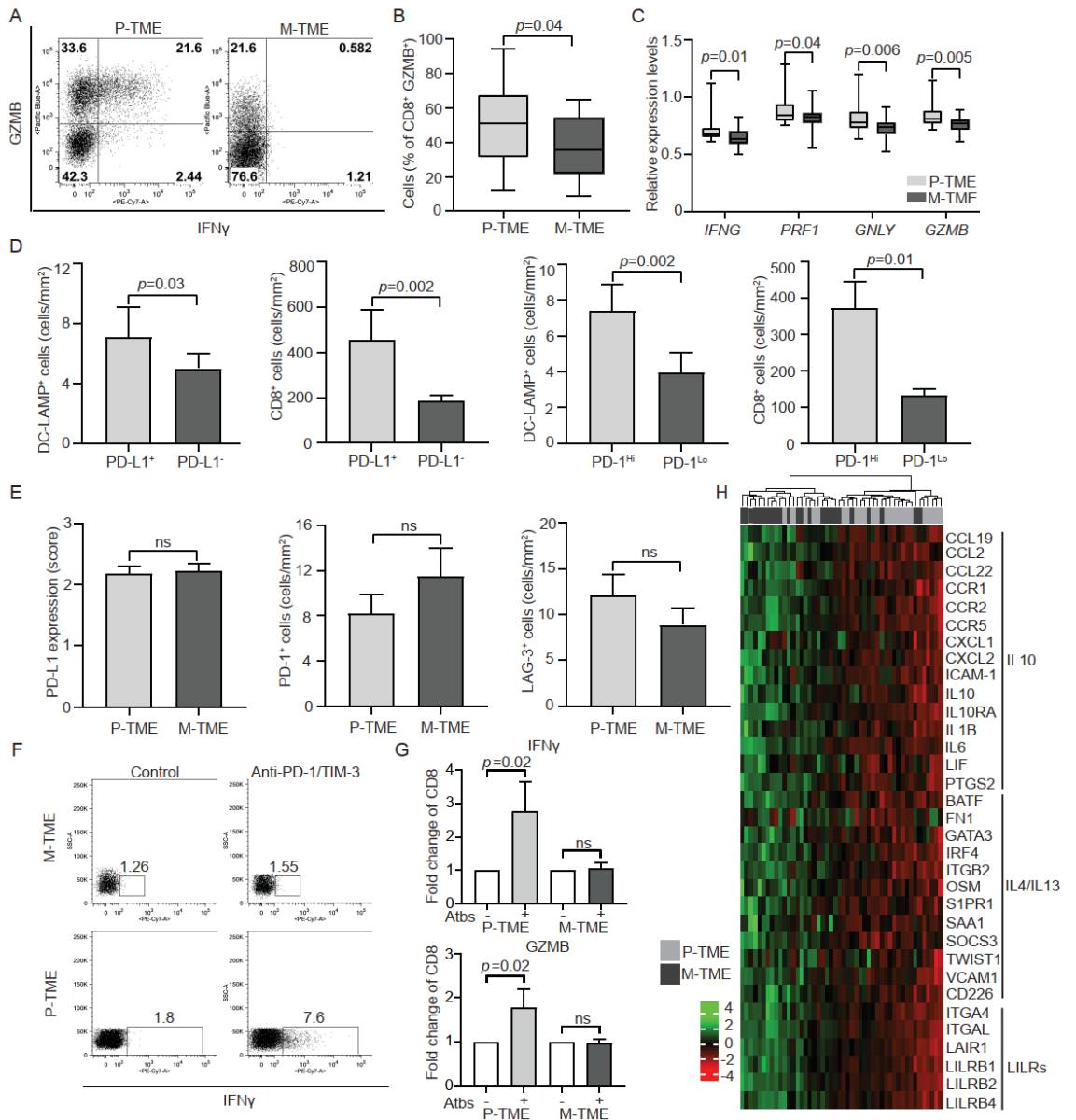
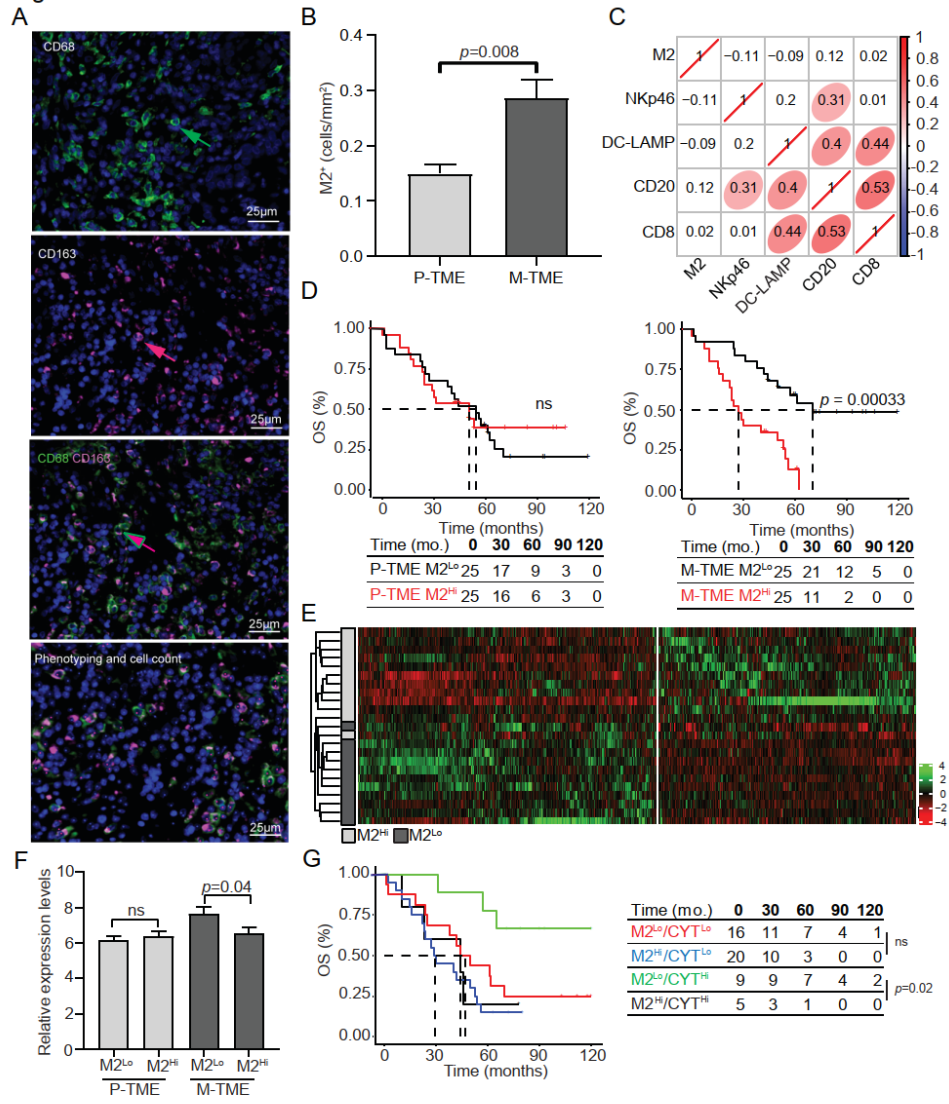


Figure 4



8.5 *Porovnání cytometrické a imunohistochemické analýzy ve sledování zastoupení kalretikulinu, klíčového parametru imunogenní buněčné smrti, v nádorovém mikroprostředí pacientů s různými druhy nádorů*

ICD představuje konkrétní formu apoptózy, během které dochází k uvolňování DAMP molekul do TME. Společnou vlastností těchto molekul je aktivace imunitního systému, zejména populace APC, která následně indukuje nádorově specifickou T lymfocytární odpověď. CRT představuje jednu z klíčových molekul probíhající ICD. Z výsledků preklinického hodnocení vyplývá, že přítomnost CRT v TME koreluje ve většině případů s aktivací protinádorové imunitní odpovědi a lepší prognózou onemocnění. Sledování zastoupení CRT v nádorové tkáni tedy představuje nový potenciální ukazatel prognózy pacientů, a je tedy nesmírně důležité tento parametr v praxi správným způsobem hodnotit.

Detekce CRT v TME pacientů může být provedena pomocí různých metod, jakou jsou western blot, imunohistochemie, fluorescenční mikroskopie či průtoková cytometrie. V této práci jsme popsali detailní protokol pro detekci CRT pomocí imunohistochemické a cytometrické analýzy. Výhodou sledování CRT pomocí imunohistochemické analýzy spočívá v analýze rozsáhlých retrospektivních souborů pacientů s dostupností klinických dat. Nevýhoda této metodiky spočívá v nemožnosti rozlišit mezi povrchovou a intracelulární expresí CRT. Naopak cytometrická analýza umožňuje kvantifikovat zastoupení povrchově exponovaného CRT na populaci časně apoptotických buněk díky kombinovanému barvení pro současnou detekci apoptotických a nekrotických buněk.

Autorka v této práci přispěla:

- Příprava manuskriptu pod vedením školitele



Side-by-side comparison of flow cytometry and immunohistochemistry for detection of calreticulin exposure in the course of immunogenic cell death

Lenka Kasikova^{a,b}, Iva Truxova^{a,b}, Isabelle Cremer^{c,d},
Catherine Sautes-Fridman^{c,d}, Oliver Kepp^{e,f,g}, Guido Kroemer^{e,f,g,h,i},
Radek Spisek^{a,b}, Jitka Fucikova^{a,b,*}

^aDepartment of Immunology, Charles University, 2nd Faculty of Medicine and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

^bSotio, Prague, Czech Republic

^cTeam Inflammation, Complement and Cancer, INSERM, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France

^dSorbonne Université, Paris, France

^eCentre de Recherche des Cordeliers, Equipe labellisée par la Ligue contre le cancer, Université de Paris Descartes, Université Sorbonne Paris Cité, Université Paris Diderot, Sorbonne Université, INSERM, Paris, France

^fMetabolomics and Cell Biology Platforms, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

^gPôle de Biologie, Hôpital Européen Georges Pompidou, AP-HP, Paris, France

^hSuzhou Institute for Systems Biology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou, China

ⁱDepartment of Women's and Children's Health, Karolinska Institute, Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden

*Corresponding author: e-mail address: fucikova@sotio.com

Contents

1. Introduction	16
2. Methods to monitor CALR exposure: Principles	17
3. Methods to monitor CALR exposure: Protocols	17
3.1 IHC detection and analysis	17
3.2 Flow cytometric detection and analysis	19
4. Concluding remarks	23
5. Notes	23
Acknowledgments	24
References	24

Abstract

Immunogenic cell death (ICD), a functionally peculiar type of apoptosis, represents a unique way to deliver danger-associated molecular patterns (DAMPs) to the tumor microenvironment. Once emitted by dying cancer cells, DAMPs orchestrate antigen-specific immune responses by acting on both innate and adaptive components of the immune system. Accumulating preclinical and clinical evidence indicates that one of these DAMPs, calreticulin (CALR) represents a novel powerful prognostic biomarker, reflecting the activation of a clinically relevant anticancer immune response in different cancer malignancies. Therefore, the assessment of CALR emission can provide a therapeutic tool for the stratification of cancer patients and the identification of individuals that are intrinsically capable to respond to a particular treatment. Here we describe methods for the quantification of CALR exposure in the tumor microenvironment of cancer patients by flow cytometry and immunohistochemistry.



1. Introduction

Malignant cells responding to distinct types of treatment, including some chemotherapeutics and physical modalities, undergo an immunogenic form of cell death that is associated with exposure (on their surface) and release (in the tumor microenvironment) of danger signals in the form of danger-associated molecular patterns (DAMPs) (Galluzzi, Buque, Kepp, Zitvogel, & Kroemer, 2017; Kroemer, Galluzzi, Kepp, & Zitvogel, 2013). Immunogenic cell death (ICD)-relevant DAMPs encompass endoplasmic reticulum (ER) chaperones including calreticulin (CALR), heat-shock proteins (HSP70 and HSP90), the non-histone chromatin-binding nuclear protein high mobility group box 1 (HMGB1), nucleic acids, small metabolites such as ATP, as well as type I interferons (Garg et al., 2010; Krysko et al., 2012; Scaffidi, Misteli, & Bianchi, 2002; Sistigu et al., 2014). In physiological conditions, CALR functions as a Ca^{2+} binding chaperone with multiple functions inside and outside the ER, which goes largely beyond the scope of this paper and can be found in Bedard, Szabo, Michalak, and Opas, (2005) and Kroemer et al. (2013). Once translocated to the cell surface of dying tumor cells that undergo ICD, CALR can be recognized by dendritic cells of the immune system via pattern recognition receptors and contribute to the activation of a therapeutically relevant immune response (Obeid et al., 2007). Corroborating the clinical relevance of ICD, CALR exposure has been attributed prognostic and predictive values in distinct

solid cancers and hematologic malignancies (Fucikova, Becht, et al., 2016; Fucikova, Truxova, et al., 2016; Fucikova et al., 2015; Wemeau et al., 2010). Here, we provide a detailed description of methods for the quantification of CALR exposure in the tumor microenvironment of cancer patients by flow cytometry and immunohistochemistry (IHC).

2. Methods to monitor CALR exposure: Principles

CALR has been shown to play a critical role in activation of both innate and adaptive immune response (Gold et al., 2010; Kroemer et al., 2013). Therefore, monitoring CALR exposure can provide a therapeutic tool for the clinical management of cancer patients. Different methods have been used to monitor CALR exposure and they were comprehensively summarized by Kepp et al. (2014). (1) IHC is widely used to analyze the presence of CALR in the tumor microenvironment. The main advantage of this technique is its applicability for the retrospective monitoring of CALR expression profiles in large cohorts of patients. However, using IHC analyses, it is not possible to efficiently distinguish between intracellular and surface-exposed CALR (Fucikova, Becht, et al., 2016; Hsu et al., 2005; Muth et al., 2016; Peng et al., 2010). (2) Flow cytometric detection of CALR exposure by the staining of non-permeabilized cells with an anti-CALR specific antibody represents the gold standard (Fucikova, Truxova et al., 2016; Obeid et al., 2007; Wemeau et al., 2010). The use of exclusion dyes such as DAPI or PI helps to subtract the population of permeabilized cells from the analysis, to avoid the staining of intracellularly located CALR. Flow cytometry can be widely used to analyze the exposure of CALR on primary tumor cells isolated from freshly resected tumor tissue.

3. Methods to monitor CALR exposure: Protocols

3.1 IHC detection and analysis

3.1.1 Deparaffinization and Rehydration

- (1) Formalin-fixed paraffin embedded tissue blocks are sectioned into thin slices (3–5 μm) by microtome.
- (2) To remove paraffin wax, immerse sections three times with xylene for 5 min each time.
- (3) To start rehydration, immerse sections once in 100% ethanol for 5 min.
- (4) Immerse sections once in 96% ethanol for 5 min.

- (5) Immerse sections in 70% ethanol for 5 min.
- (6) Immerse sections in 50% ethanol for 5 min.
- (7) Immerse sections in dH₂O for 5 min (see Note 1).

3.1.2 Target retrieval

- (8) To restore epitopes which were crosslinked during the process of fixation, immerse section in citrate buffer pH 6 (Epitope Retrieval Solution, Novocastra; Leica Biosystems, RE7113) at 97 °C for 30 min.
- (9) Cool section on bench top for 30 min.
- (10) Rinse section with dH₂O once for 5 min.

3.1.3 Blocking endogenous peroxidase

- (11) Use a hydrophobic pen (DAKO, S2002) to circumscribe the tissue (see Note 2).
- (12) To block endogenous peroxidase activity, incubate the section with 200 µL of 3% hydrogen peroxide for 15 min at room temperature in a slide staining tray.
- (13) Wash section with 1 × TBS buffer once for 5 min.
- (14) To prevent non-specific binding of the antibody to the tissues, block each section with 1–3 drops of serum blocking reagent (DAKO, X0909) for 15 min in a slide staining trays (see Note 3).

3.1.4 Primary antibody incubation

- (15) Dilute mouse anti-CALR primary antibody (Table 1) with Antibody Dilution Buffer (DAKO, S2022).
- (16) Add 200 µL of diluted primary antibody to each section and incubate at room temperature for 2 h in a slide staining tray.
- (17) Rinse the excess antibody from the section with one gentle movement and wash section with 1 × TBS buffer with 0.04% Tween 20 once for 5 min.

Table 1 Primary and secondary antibodies used for the immunohistochemistry detection of CALR expression.

Antibody	Cat. no.	Source	Producer	Clone	Dilution
Anti-CALR	ab22683	mouse	Abcam	FMC 75	1:200
Anti-mouse	715-066-150	donkey	Jackson ImmunoResearch	–	1:500

3.1.5 Secondary antibody and streptavidin-HRP

- (18) Dilute biotin-labeled secondary anti-mouse antibody (Table 1) with $1 \times$ TBS.
- (19) Add 200 μ L of diluted biotin-labeled secondary anti-mouse antibody to each section and incubate at room temperature for 30 min in a slide staining tray.
- (20) Rinse the excess antibody from the section with one gentle movement and wash section with $1 \times$ TBS buffer 0.5% Tween 20 once for 5 min.
- (21) Dilute streptavidin-HRP solution (DAKO, P0397) with $1 \times$ TBS (1:300).
- (22) Add 200 μ L of diluted streptavidin-HRP to each section and incubate at room temperature for 30 min in a slide staining tray.
- (23) Rinse the excess streptavidin-HRP from the section with one gentle movement and wash section with $1 \times$ TBS buffer with 0.5% Tween 20 once for 5 min.

3.1.6 DAB staining

- (24) Add 200 μ L of DAB Reagent (DAKO, K3468) to each section and react for 2 min to stain.
- (25) Rinse sections with $1 \times$ TBS buffer to stop reaction.
- (26) Rinse in dH₂O and drain the section.

3.1.7 Hematoxylin staining and mounting on coverslips

- (27) Counterstain sections in hematoxylin reagent (DAKO, S3309).
- (28) Mount coverslips with Glycergel mounting medium (DAKO, C0563).

3.1.8 Image analysis

The expression level of CALR for each section was determined as the score of positive tumor cells as published previously (Fucikova, Becht, et al., 2016). The score index was calculated for 10 independent fields at $20 \times$ magnification under a light microscope (DM2000LED; Leica) and classified into five categories (score 1: <10% positive cells, score 2: 10–25% positive cells, score 3: 26–50% positive cells, score 4: 51–75% positive cells, score 5: >75% positive cells) (Fig. 1).

3.2 Flow cytometric detection and analysis

- (1) Resect the fresh tumor tissue and cut it into small pieces.
- (2) Transfer the tissue into the gentleMACS C Tube containing 10 mL of PBS buffer.

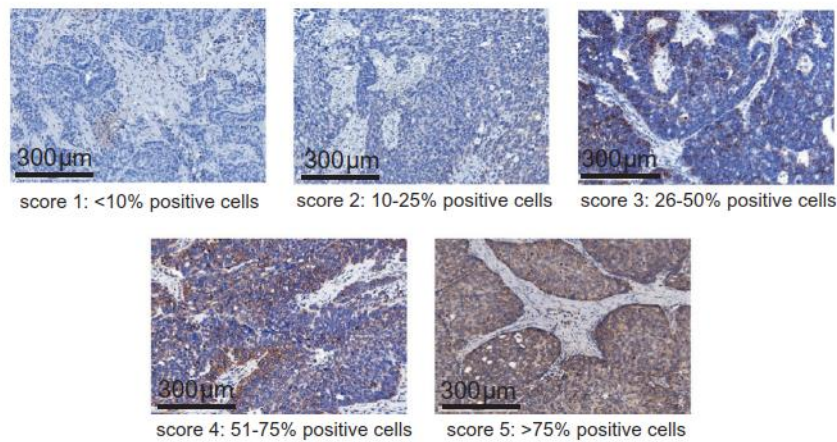


Fig. 1 Representative images of CALR immunostaining. Scale bar = 300 μ m.

- (3) Insert the tube into gentleMACS™ Dissociator and run the gentleMACS Program Tumor_01.
- (4) Add 1 mg/mL of Collagenase II and 100 μ g/mL of DNase I (see Note 4).
- (5) Incubate the tube on a rotating platform (18 rpm) in an incubator (37 °C, 5% CO₂) for 30 min.
- (6) Transfer gentleMACS C Tube into gentleMASC™ dissociator and run program gentleMACS Program Tumor_01).
- (7) Strain the cell suspension with a 70 μ m cell strainer into a new 50 mL conical tube and wash cells with PBS.
- (8) Centrifuge collected cell suspension at 270 \times g at room temperature for 10 min, discard supernatant.
- (9) Wash 50 mL of PBS through the 70 μ m strainer into the new tube.
- (10) Transfer cell suspension into the 96-well V-bottom plate.
- (11) Dilute mouse anti-CALR primary antibody with PBS (Table 2)
- (12) Add diluted mouse anti-CALR primary antibody and incubate at 4 °C for 20 min.
- (13) Wash the cells twice with PBS. Centrifuge at 423 \times g for 5 min at room temperature. Discard supernatant.
- (14) Dilute APC-labeled secondary antibody with PBS (Table 2)
- (15) Add secondary antibody to the cell suspension and incubate at 4 °C for 20 min
- (16) Wash the cells twice with PBS. Centrifuge at 423 \times g for 5 min at room temperature. Discard supernatant.

Table 2 Antibodies used for the flow cytometry detection of CALR expression.

Antibody	Cat. no.	Source	Producer	Clone	Fluorochrome	Dilution
Calreticulin	ADI-SPA-601-F	Mouse	Enzo Life Sciences, Inc.	FMC 75	–	2.4:100
Allophycocyanin-conjugated anti-mouse	115-136-068	Goat	Jackson ImmunoResearch	–	APC	3:100
Anti-Pan cytokeratin	53-9003-82	Murine	eBioscience	AE1/AE3	A488	2:100
Epithelial antigen	F0860	Mouse	DAKO	Ber-EP4	FITC	2:100
Epcam	324204	Mouse	BioLegend	9C4	FITC	2:100
CD227	559774	Mouse	BD Biosciences	HMPV	FITC	2:100
CD45	ED7029	Mouse	EXBIO	MEM-28	PerCP	4:100

- (17) Add the mixture of primary antibodies: anti-EpCAM, anti-CD227, anti-Epithelial antigen, anti-Pan cytokeratin, anti-CD45 and incubate at 4°C for 20 min (Table 2) (see Note 5).
- (18) Wash the cells twice with PBS. Centrifuge at 423 ×g for 5 min at room temperature. Discard supernatant
- (19) Use Annexin V/DAPI staining kit according to the manufacturer instructions (eBioscience, Thermo Fisher) to determine the population of apoptotic/necrotic cells (see Note 6).
- (20) Analyze the cell suspension by flow cytometry (see Note 7) (Fig. 2)

3.2.1 Analysis

Expression of ecto-CALR was analyzed on both living and early apoptotic (DAPI⁻) tumor cells identified as a population of CD45⁻, EpCAM⁺,

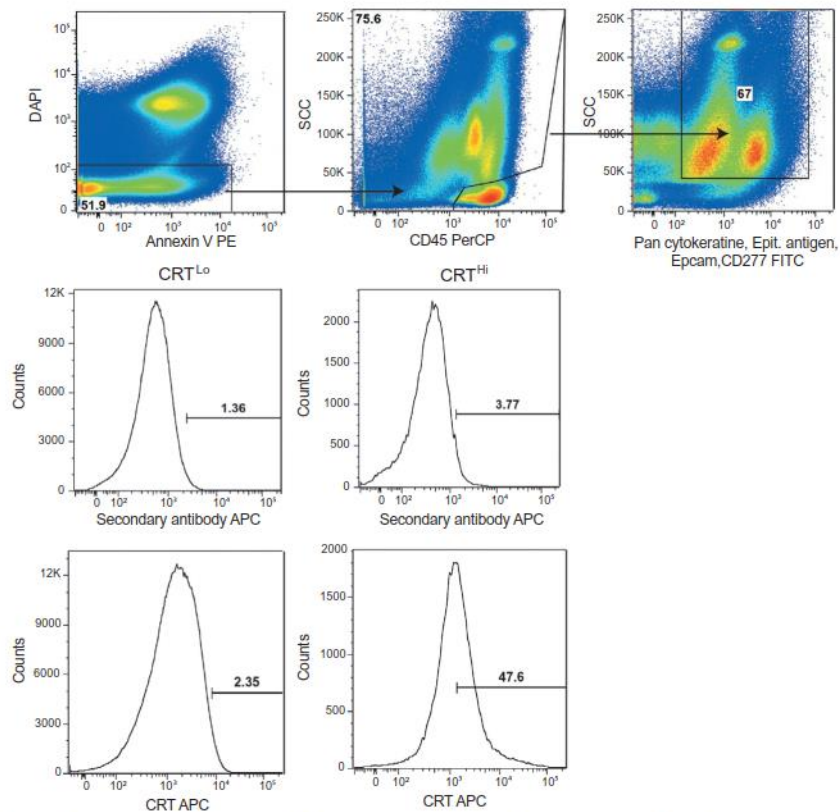


Fig. 2 Flow cytometry-assisted quantification of surface exposed CALR.

CD227⁺, epithelial antigen⁺ and pan-cytokeratin⁺ as indicated in the Table 2. A representative gating strategy of ecto-CALR for CALR^{Lo} and CALR^{Hi} patients is indicated in the Fig. 2.



4. Concluding remarks

CALR represents a multi-functional chaperon protein, which is involved in a wide spectrum of cellular processes, including calcium homeostasis, folding of ER proteins, cell adhesion and migration (Bedard et al., 2005; Gold et al., 2010). CALR is best characterized for its function as an eat-signal, leading to the maturation of dendritic cells and activation of adaptive immune response against tumors (Obeid, Tesniere, et al., 2007). The accumulating preclinical and clinical evidences indicate that CALR represents a novel powerful prognostic biomarker for cancer patients (Fucikova et al., 2015). Therefore, monitoring CALR exposure may provide powerful clinical tool for stratifying cancer patients into different risk groups and identifying the fraction of patients suitable for the particular therapeutic regimen. Here we provide a detailed protocol of two major assays (flow cytometry and immunohistochemistry) for the detection of CALR exposure in the tumor microenvironment.



5. Notes

- (1) Do not allow sections to dry at any time until ready to perform antigen retrieval. Drying will cause non-specific antibody binding and therefore high background staining.
- (2) Avoid touching the tissue during the staining procedure, which creates a hydrophobic boundary on the sample.
- (3) Drain the slides and wipe away any excess blocking reagent before proceeding to the next step.
- (4) Collagenase and DNase enzyme are used for chemical or enzymatic digestion of tissue.
- (5) Composition of antibodies for the identification of tumor population is dependent on cancer type.
- (6) Annexin V is commonly used to stain phosphatidylserine residues exposed during apoptosis. DAPI is a cell-impermeant dye that stains double-strand nucleic acids and allows for the identification of necrotic cell population.

- (7) Cells should be analyzed within 2 h after the initial incubation period. For prolonged periods, store at 4 °C and protect from light until analysis.

Acknowledgments

This study was exclusively sponsored by Sotio, Prague, Czech Republic.

References

- Bedard, K., Szabo, E., Michalak, M., & Opas, M. (2005). Cellular functions of endoplasmic reticulum chaperones calreticulin, calnexin, and ERp57. *International Review of Cytology*, *245*, 91–121.
- Fucikova, J., Becht, E., Iribarren, K., Goc, J., Remark, R., Damotte, D., et al. (2016). Calreticulin expression in human non-small cell lung cancers correlates with increased accumulation of antitumor immune cells and favorable prognosis. *Cancer Research*, *76*, 1746–1756.
- Fucikova, J., Moserova, I., Urbanova, L., Bezu, L., Kepp, O., Cremer, I., et al. (2015). Prognostic and predictive value of DAMPs and DAMP-associated processes in cancer. *Frontiers in Immunology*, *6*, 402.
- Fucikova, J., Truxova, I., Hensler, M., Becht, E., Kasikova, L., Moserova, I., et al. (2016). Calreticulin exposure by malignant blasts correlates with robust anticancer immunity and improved clinical outcome in AML patients. *Blood*, *128*, 3113–3124.
- Galluzzi, L., Buque, A., Kepp, O., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2017). Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. *Nature Reviews Immunology*, *17*, 97–111.
- Garg, A. D., Nowis, D., Golab, J., Vandenabeele, P., Krysko, D. V., & Agostinis, P. (2010). Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: An emerging amalgamation. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1805*, 53–71.
- Gold, L. I., Eggleton, P., Sweetwyne, M. T., Van Duyn, L. B., Greives, M. R., Naylor, S. M., et al. (2010). Calreticulin: Non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease. *The FASEB Journal*, *24*, 665–683.
- Hsu, W. M., Hsieh, F. J., Jeng, Y. M., Kuo, M. L., Chen, C. N., Lai, D. M., et al. (2005). Calreticulin expression in neuroblastoma—A novel independent prognostic factor. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, *16*, 314–321.
- Kepp, O., Senovilla, L., Vitale, I., Vacchelli, E., Adjemian, S., Agostinis, P., et al. (2014). Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death. *Oncoimmunology*, *3*, e955691.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Kepp, O., & Zitvogel, L. (2013). Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annual Review of Immunology*, *31*, 51–72.
- Krysko, D. V., Garg, A. D., Kaczmarek, A., Krysko, O., Agostinis, P., & Vandenabeele, P. (2012). Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, *12*, 860–875.
- Muth, C., Rubner, Y., Semrau, S., Ruhle, P. F., Frey, B., Strnad, A., et al. (2016). Primary glioblastoma multiforme tumors and recurrence: Comparative analysis of the danger signals HMGB1, HSP70, and calreticulin. *Strahlentherapie und Onkologie: Organ der Deutschen Röntgengesellschaft [et al]*, *192*, 146–155.
- Obeid, M., Panaretakis, T., Joza, N., Tufi, R., Tesniere, A., van Endert, P., et al. (2007). Calreticulin exposure is required for the immunogenicity of gamma-irradiation and UVC light-induced apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, *14*, 1848–1850.

- Obeid, M., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Fimia, G. M., Apetoh, L., Perfettini, J. L., et al. (2007). Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nature Medicine*, *13*, 54–61.
- Peng, R. Q., Chen, Y. B., Ding, Y., Zhang, R., Zhang, X., Yu, X. J., et al. (2010). Expression of calreticulin is associated with infiltration of T-cells in stage IIIB colon cancer. *World Journal of Gastroenterology*, *16*, 2428–2434.
- Scaffidi, P., Misteli, T., & Bianchi, M. E. (2002). Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*, *418*, 191–195.
- Sistigu, A., Yamazaki, T., Vacchelli, E., Chaba, K., Enot, D. P., Adam, J., et al. (2014). Cancer cell-autonomous contribution of type I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy. *Nature Medicine*, *20*, 1301–1309.
- Wemeau, M., Kepp, O., Tesniere, A., Panaretakis, T., Flament, C., De Botton, S., et al. (2010). Calreticulin exposure on malignant blasts predicts a cellular anticancer immune response in patients with acute myeloid leukemia. *Cell Death & Disease*, *1*, e104.

8.6 *Sumarizace literárních poznatků o významu kalretikulinu pro klinický průběh nádorových onemocnění*

Výsledná imunogenicita maligních buněk, tedy schopnost vyvolat humorální a/nebo buněčnou imunitní odpověď, je dána přítomností nádorových antigenů a schopností uvolnit DAMP molekuly do TME. DAMP molekuly jsou rozpoznány receptory na povrchu APC, které ve výsledku aktivují nádorově specifickou imunitní odpověď. Ze současných *in vitro* i *in vivo* studií vyplývá, že CRT je jednou z nejdůležitějších DAMP molekul určující imunogenní potenciál maligních buněk a jeho přítomnost v TME je asociovaná s aktivací vrozené i adaptivní imunity a lepší prognózou pacientů s různými druhy nádorů. Cílem této přehledné publikace bylo popsat, jakou prognostickou roli plní CRT u jednotlivých nádorových onemocnění a ukázat, že CRT může sloužit jako stratifikační nástroj, který umožní rozdělit pacienty do skupin a vybrat pro ně vhodný typ léčebné strategie.

Autorka v této práci přispěla:

- Příprava obrázků a tabulek do manuskriptu, účast na revizi manuskriptu

Vzhledem k tomu, že se jedná o přehled literárních poznatků, není tato publikace v dizertační práci přiložena.

9 Závěr

Imunoterapie představuje nový směr v léčbě některých nádorových onemocnění. Probíhající klinické studie postupně odpovídají na otázky, které se týkají načasování imunoterapie v léčebné strategii pacienta a identifikace vhodných terapeutických kombinací. V rámci konceptu personalizované medicíny je nezbytné hlubší poznání role imunitního systému v boji proti maligním buňkám konkrétního pacienta. Tyto znalosti a identifikace tzv. prognostických a prediktivních ukazatelů nám pomohou v budoucnu lépe stratifikovat pacienty do rizikových skupin a identifikovat skupinu pacientů, která bude z imunoterapeutické léčby nejlépe profitovat. Identifikace vhodných prognostických a prediktivních ukazatelů se tak stává klinicky i vědecky velice aktuálním tématem.

Karcinom ovaria patří mezi gynekologické malignity s nejhorší prognózou. I přes nesporný pokrok v léčbě dochází u pacientek k časnému relapsu onemocnění a následnému úmrtí vyplývajícím z omezených terapeutických možností. V rámci pokročilého klinického testování imunoterapie karcinomu ovaria je hodnocena účinnost zejména blokačních protilátek proti inhibičním molekulám imunitní odpovědi a autologní buněčná terapie založená na DC. Nedílnou součástí těchto studií je také identifikace vhodných prognostických a prediktivních ukazatelů.

Tato dizertační práce významně rozšiřuje znalost o složení a funkční orientaci TME s HGSC s výsledným vlivem na prognózu pacientek. Z výsledků shrnutých v této dizertační práci vyplývá, že infiltrace TME populací aktivovaných DC polarizuje imunitní odpověď ve směru Th1, aktivuje cytotoxickou CD8⁺ T lymfocytární odpověď a pozitivně ovlivňuje prognózu onemocnění pacientek s HGSC. Navzdory předpokladům naše výsledky ukazují, že vyšší exprese PD-1 a PD-L1 v TME pacientek s HGSC pozitivně koreluje s aktivací protinádorové imunitní odpovědi. Klíčovou imunosupresivní roli v TME má naopak molekula TIM-3, která představuje znak funkčního vyčerpání efektorových CD8⁺ T lymfocytů a její přítomnost koreluje s horší prognózou onemocnění. Obdobně významnou imunosupresivní roli v metastatické tkáni karcinomu ovaria plní M2 makrofágy, jak ukazují výsledky na rozsáhlém souboru dat z celogenomového sekvenování a imunofluorescenční analýzy maligních tkání. V neposlední řadě tato dizertační práce dokazuje, že výsledná imunogenicita maligních buněk je ovlivněna nejen profilem nádorových antigenů, které umožní rozpoznání buňky imunitním systémem, ale také přítomností molekul asociovaných s ICD. Konkrétně z našich výsledků vyplývá, že přítomnost CRT v TME koreluje s vyšší aktivací protinádorové imunitní odpovědi a současně s lepší prognózou pacientek s karcinomem ovaria. Výsledky publikovaných studií

jsou v současné době testovány retrospektivně jako součást klinické studie fáze II. V ní je pacientkám s karcinomem ovaria aplikována autologní buněčná imunoterapie DCVAC/OvCa. Cílem analýzy vzorků tkáně a periferní krve je identifikovat vhodné prognostické a prediktivní ukazatele klinické odpovědi na léčbu. Vybrané ukazatele budou následně ověřeny v plánované III. fázi klinické studie.

10 Seznam literatury

- Aghajanian, C., B. Goff, L.R. Nycum, Y.V. Wang, A. Husain, and S.V. Blank. 2015. Final overall survival and safety analysis of OCEANS, a phase 3 trial of chemotherapy with or without bevacizumab in patients with platinum-sensitive recurrent ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 139:10-16.
- Apetoh, L., G. Mignot, T. Panaretakis, G. Kroemer, and L. Zitvogel. 2008. Immunogenicity of anthracyclines: moving towards more personalized medicine. *Trends Mol Med* 14:141-151.
- Ashworth, A., and C.J. Lord. 2018. Synthetic lethal therapies for cancer: what's next after PARP inhibitors? *Nature reviews Clinical oncology* 15:564.
- Balkwill, F.R., M. Capasso, and T. Hagemann. 2012. The tumor microenvironment at a glance. In *The Company of Biologists Ltd*.
- Bamias, A., E. Gibbs, C. Khoon Lee, L. Davies, M. Dimopoulos, F. Zagouri, A.S. Veillard, J. Kosse, A. Santaballa, M.R. Mirza, G. Tabaro, I. Vergote, H. Bloemendal, M. Lykka, A. Floquet, V. Gebiski, and E. Pujade-Lauraine. 2017. Bevacizumab with or after chemotherapy for platinum-resistant recurrent ovarian cancer: exploratory analyses of the AURELIA trial. *Ann Oncol* 28:1842-1848.
- Banerjee, S., and S.B. Kaye. 2013. New strategies in the treatment of ovarian cancer: current clinical perspectives and future potential. *Clin Cancer Res* 19:961-968.
- Barnett, J.C., S.M. Bean, R.S. Whitaker, E. Kondoh, T. Baba, S. Fujii, J.R. Marks, H.K. Dressman, S.K. Murphy, and A. Berchuck. 2010. Ovarian cancer tumor infiltrating T-regulatory (T(reg)) cells are associated with a metastatic phenotype. *Gynecol Oncol* 116:556-562.
- Bartunkova, J., Podrazil, M., and R. Spisek. 2015. Imunoterapie v léčbě nádorových onemocnění [online]. *Remedia*. 1: 34-38. Dostupné z: <http://www.remmedia.cz/Clanky/Prehledy-nazory-diskuse/Imunoterapie-v-lecbe-nadorovych-onemocneni/6-F-100.magarticle.aspx>
- Bauer, J., Bajciova, V., Krajsova, I., Ryska, A., Rihova, B., Stastny, M., and J. Uhlir. 2018. *Imunologie a imunoterapie nádorů: současné poznatky snadno a rychle*. Praha: *Mladá fronta*. Edice postgraduální medicíny. ISBN 978-80-204-4944-3.
- Berke, G. 1994. The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: molecular and cellular aspects. *Annu Rev Immunol* 12:735-773.
- Bortlikova, L., P. Müller, B. Vojtesek, V. Rak, and M. Svoboda. 2019. Syntetická letalita–její současné využití a potenciál v onkologické léčbě. *Klinická onkologie* 32:
- Brtnicky, T., M. Podrazil, J. Bartunkova, R. Spíšek, and L. Rob. 2012. Active cellular immunotherapy of ovarian cancer using dendritic cells. *Ceska gynekologie* 77:215-220.
- Bryant, H.E., N. Schultz, H.D. Thomas, K.M. Parker, D. Flower, E. Lopez, S. Kyle, M. Meuth, N.J. Curtin, and T. Helleday. 2005. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* 434:913-917.
- Buchbinder, E.I., and A. Desai. 2016. CTLA-4 and PD-1 Pathways: similarities, differences, and implications of their inhibition. *Am J Clin Oncol* 39:98-106.
- Clarke, B., A.V. Tinker, C.H. Lee, S. Subramanian, M. van de Rijn, D. Turbin, S. Kalloger, G. Han, K. Ceballos, M.G. Cadungog, D.G. Huntsman, G. Coukos, and C.B. Gilks.

2009. Intraepithelial T cells and prognosis in ovarian carcinoma: novel associations with stage, tumor type, and *BRC1* loss. *Mod Pathol* 22:393-402.
- Cooper, M.A., T.A. Fehniger, and M.A. Caligiuri. 2001. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 22:633-640.
- Cortez, A.J., P. Tudrej, K.A. Kujawa, and K.M. Lisowska. 2018. Advances in ovarian cancer therapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 81:17-38.
- Curiel, T.J., G. Coukos, L. Zou, X. Alvarez, P. Cheng, P. Mottram, M. Evdemon-Hogan, J.R. Conejo-Garcia, L. Zhang, M. Burow, Y. Zhu, S. Wei, I. Kryczek, B. Daniel, A. Gordon, L. Myers, A. Lackner, M.L. Disis, K.L. Knutson, L. Chen, and W. Zou. 2004. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 10:942-949.
- Darb-Esfahani, S., C.A. Kunze, H. Kulbe, J. Sehouli, S. Wienert, J. Lindner, J. Budczies, M. Bockmayr, M. Dietel, C. Denkert, I. Braicu, and K. Johrens. 2016. Prognostic impact of programmed cell death-1 (PD-1) and PD-ligand 1 (PD-L1) expression in cancer cells and tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian high grade serous carcinoma. *Oncotarget* 7:1486-1499.
- Das, M., C. Zhu, and V.K. Kuchroo. 2017. Tim-3 and its role in regulating anti-tumor immunity. *Immunol Rev* 276:97-111.
- Davis, Z.B., D.A. Vallera, J.S. Miller, and M. Felices. 2017. Natural killer cells unleashed: Checkpoint receptor blockade and BiKE/TriKE utilization in NK-mediated anti-tumor immunotherapy. *Semin Immunol* 31:64-75.
- de Charette, M., and R. Houot. 2018. Hide or defend, the two strategies of lymphoma immune evasion: potential implications for immunotherapy. *Haematologica* 103:1256-1268.
- Demlova R. 2005. Základní typy parametrů hodnocených v klinických studiích v onkologii. *Klinická onkologie* 18: 242–244.)
- Disis, M.L., M.R. Patel, S. Pant, J.R. Infante, A.C. Lockhart, K. Kelly, J.T. Beck, M.S. Gordon, G.J. Weiss, and S. Ejadi. 2015. Avelumab (MSB0010718C), an anti-PD-L1 antibody, in patients with previously treated, recurrent or refractory ovarian cancer: A phase Ib, open-label expansion trial. In American Society of Clinical Oncology.
- Dockery, L.E., C.C. Gunderson, and K.N. Moore. 2017. Rucaparib: the past, present, and future of a newly approved PARP inhibitor for ovarian cancer. *Onco Targets Ther* 10:3029-3037.
- Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber. 2004. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 22:329-360.
- Dyck, L., and K.H.G. Mills. 2017. Immune checkpoints and their inhibition in cancer and infectious diseases. *Eur J Immunol* 47:765-779.
- Eggermont, A.M., V. Chiarion-Sileni, J.-J. Grob, R. Dummer, J.D. Wolchok, H. Schmidt, O. Hamid, C. Robert, P.A. Ascierto, and J.M. Richards. 2015. Adjuvant ipilimumab versus placebo after complete resection of high-risk stage III melanoma (EORTC 18071): a randomised, double-blind, phase 3 trial. *The lancet oncology* 16:522-530.
- Eisenhauer, E.A., P. Therasse, J. Bogaerts, L.H. Schwartz, D. Sargent, R. Ford, J. Dancey, S. Arbuck, S. Gwyther, M. Mooney, L. Rubinstein, L. Shankar, L. Dodd, R. Kaplan, D. Lacombe, and J. Verweij. 2009. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 45:228-247.
- Eric, A., Z. Juranic, Z. Milovanovic, I. Markovic, M. Inic, N. Stanojevic-Bakic, and V. Vojinovic-Golubovic. 2009. Effects of humoral immunity and calreticulin overexpression on postoperative course in breast cancer. *Pathol Oncol Res* 15:89-90.
- Eskander, R.N., J. Kauderer, K.S. Tewari, R.S. Mannel, R.E. Bristow, D.M. O'Malley, S.C. Rubin, G.E. Glaser, C.A. Hamilton, K. Fujiwara, W.K. Huh, F. Ueland, J.M. Stephan, and R.A. Burger. 2018. Correlation between Surgeon's assessment and radiographic

- evaluation of residual disease in women with advanced stage ovarian cancer reported to have undergone optimal surgical cytoreduction: An NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 149:525-530.
- Facciabene, A., X. Peng, I.S. Hagemann, K. Balint, A. Barchetti, L.P. Wang, P.A. Gimotty, C.B. Gilks, P. Lal, L. Zhang, and G. Coukos. 2011. Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells. *Nature* 475:226-230.
- Fialova, A., S. Partlova, L. Sojka, H. Hromadkova, T. Brtnicky, J. Fucikova, P. Kocian, L. Rob, J. Bartunkova, and R. Spisek. 2013. Dynamics of T-cell infiltration during the course of ovarian cancer: the gradual shift from a Th17 effector cell response to a predominant infiltration by regulatory T-cells. *Int J Cancer* 132:1070-1079.
- Fridman, W.H., F. Pages, C. Sautes-Fridman, and J. Galon. 2012. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 12:298-306.
- Fridman, W.H., L. Zitvogel, C. Sautes-Fridman, and G. Kroemer. 2017. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nat Rev Clin Oncol* 14:717-734.
- Fucikova, J., E. Becht, K. Iribarren, J. Goc, R. Remark, D. Damotte, M. Alifano, P. Devi, J. Biton, C. Germain, A. Lupo, W.H. Fridman, M.C. Dieu-Nosjean, G. Kroemer, C. Sautes-Fridman, and I. Cremer. 2016a. Calreticulin Expression in Human Non-Small Cell Lung Cancers Correlates with Increased Accumulation of Antitumor Immune Cells and Favorable Prognosis. *Cancer Res* 76:1746-1756.
- Fucikova, J., L. Kasikova, I. Truxova, J. Laco, P. Skapa, A. Ryska, and R. Spisek. 2018. Relevance of the chaperone-like protein calreticulin for the biological behavior and clinical outcome of cancer. *Immunol Lett* 193:25-34.
- Fucikova, J., J.P. Kline, L. Galluzzi, and R. Spisek. 2020. Calreticulin arms NK cells against leukemia. *Oncoimmunology* 9:1671763.
- Fucikova, J., P. Kralikova, A. Fialova, T. Brtnicky, L. Rob, J. Bartunkova, and R. Spisek. 2011. Human tumor cells killed by anthracyclines induce a tumor-specific immune response. *Cancer Res* 71:4821-4833.
- Fucikova, J., I. Moserova, I. Truxova, I. Hermanova, I. Vancurova, S. Partlova, A. Fialova, L. Sojka, P.F. Cartron, M. Houska, L. Rob, J. Bartunkova, and R. Spisek. 2014. High hydrostatic pressure induces immunogenic cell death in human tumor cells. *Int J Cancer* 135:1165-1177.
- Fucikova, J., L. Palová Jelínková, J. Bartunkova, and R. Spisek. 2019. Induction of tolerance and immunity by dendritic cells: mechanisms and clinical applications. *Frontiers in Immunology* 10:2393.
- Fucikova, J., I. Truxova, M. Hensler, E. Becht, L. Kasikova, I. Moserova, S. Vosahlikova, J. Klouckova, S.E. Church, I. Cremer, O. Kepp, G. Kroemer, L. Galluzzi, C. Salek, and R. Spisek. 2016b. Calreticulin exposure by malignant blasts correlates with robust anticancer immunity and improved clinical outcome in AML patients. *Blood* 128:3113-3124.
- Gaillard, S.L., A.A. Secord, and B. Monk. 2016. The role of immune checkpoint inhibition in the treatment of ovarian cancer. *Gynecologic oncology research and practice* 3:11.
- Galluzzi, L., A. Buque, O. Kepp, L. Zitvogel, and G. Kroemer. 2017. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. *Nat Rev Immunol* 17:97-111.
- Gardai, S.J., K.A. McPhillips, S.C. Frasch, W.J. Janssen, A. Starefeldt, J.E. Murphy-Ullrich, D.L. Bratton, P.A. Oldenborg, M. Michalak, and P.M. Henson. 2005. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell* 123:321-334.
- Garg, A.D., D. De Ruyscher, and P. Agostinis. 2016. Immunological metagene signatures derived from immunogenic cancer cell death associate with improved survival of

- patients with lung, breast or ovarian malignancies: A large-scale meta-analysis. *Oncoimmunology* 5:e1069938.
- Garg, A.D., A.M. Dudek-Peric, E. Romano, and P. Agostinis. 2015a. Immunogenic cell death. *Int J Dev Biol* 59:131-140.
- Garg, A.D., S. Elsen, D.V. Krysko, P. Vandenabeele, P. de Witte, and P. Agostinis. 2015b. Resistance to anticancer vaccination effect is controlled by a cancer cell-autonomous phenotype that disrupts immunogenic phagocytic removal. *Oncotarget* 6:26841-26860.
- Garg, A.D., D.V. Krysko, P. Vandenabeele, and P. Agostinis. 2012a. Hypericin-based photodynamic therapy induces surface exposure of damage-associated molecular patterns like HSP70 and calreticulin. *Cancer Immunol Immunother* 61:215-221.
- Garg, A.D., D.V. Krysko, T. Verfaillie, A. Kaczmarek, G.B. Ferreira, T. Marysael, N. Rubio, M. Firczuk, C. Mathieu, A.J. Roebroek, W. Annaert, J. Golab, P. de Witte, P. Vandenabeele, and P. Agostinis. 2012b. A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death. *EMBO J* 31:1062-1079.
- Garg, A.D., D. Nowis, J. Golab, P. Vandenabeele, D.V. Krysko, and P. Agostinis. 2010. Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: an emerging amalgamation. *Biochim Biophys Acta* 1805:53-71.
- Gelmon, K.A., M. Tischkowitz, H. Mackay, K. Swenerton, A. Robidoux, K. Tonkin, H. Hirte, D. Huntsman, M. Clemons, B. Gilks, R. Yerushalmi, E. Macpherson, J. Carmichael, and A. Oza. 2011. Olaparib in patients with recurrent high-grade serous or poorly differentiated ovarian carcinoma or triple-negative breast cancer: a phase 2, multicentre, open-label, non-randomised study. *Lancet Oncol* 12:852-861.
- Giuntoli, R.L., 2nd, T.J. Webb, A. Zoso, O. Rogers, T.P. Diaz-Montes, R.E. Bristow, and M. Oelke. 2009. Ovarian cancer-associated ascites demonstrates altered immune environment: implications for antitumor immunity. *Anticancer Res* 29:2875-2884.
- Goldberg, M.V., and C.G. Drake. 2011. LAG-3 in Cancer Immunotherapy. *Curr Top Microbiol Immunol* 344:269-278.
- Gutcher, I., and B. Becher. 2007. APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. *J Clin Invest* 117:1119-1127.
- Hamanishi, J., M. Mandai, K. Abiko, N. Matsumura, T. Baba, Y. Yoshioka, K. Kosaka, and I. Konishi. 2011. The comprehensive assessment of local immune status of ovarian cancer by the clustering of multiple immune factors. *Clin Immunol* 141:338-347.
- Hamanishi, J., M. Mandai, T. Ikeda, M. Minami, A. Kawaguchi, T. Murayama, M. Kanai, Y. Mori, S. Matsumoto, S. Chikuma, N. Matsumura, K. Abiko, T. Baba, K. Yamaguchi, A. Ueda, Y. Hosoe, S. Morita, M. Yokode, A. Shimizu, T. Honjo, and I. Konishi. 2015. Safety and Antitumor Activity of Anti-PD-1 Antibody, Nivolumab, in Patients With Platinum-Resistant Ovarian Cancer. *J Clin Oncol* 33:4015-4022.
- Hamanishi, J., M. Mandai, M. Iwasaki, T. Okazaki, Y. Tanaka, K. Yamaguchi, T. Higuchi, H. Yagi, K. Takakura, N. Minato, T. Honjo, and S. Fujii. 2007. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8⁺ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:3360-3365.
- Han, L.Y., M.S. Fletcher, D.L. Urbauer, P. Mueller, C.N. Landen, A.A. Kamat, Y.G. Lin, W.M. Merritt, W.A. Spannuth, M.T. Deavers, K. De Geest, D.M. Gershenson, S.K. Lutgendorf, S. Ferrone, and A.K. Sood. 2008. HLA class I antigen processing machinery component expression and intratumoral T-Cell infiltrate as independent prognostic markers in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 14:3372-3379.

- Hargadon, K.M., C.E. Johnson, and C.J. Williams. 2018. Immune checkpoint blockade therapy for cancer: An overview of FDA-approved immune checkpoint inhibitors. *Int Immunopharmacol* 62:29-39.
- Hermans, C., D. Anz, J. Engel, T. Kirchner, S. Endres, and D. Mayr. 2014. Analysis of FoxP3⁺ T-regulatory cells and CD8⁺ T-cells in ovarian carcinoma: location and tumor infiltration patterns are key prognostic markers. *PLoS One* 9:e111757.
- Hirano, F., K. Kaneko, H. Tamura, H. Dong, S. Wang, M. Ichikawa, C. Rietz, D.B. Flies, J.S. Lau, G. Zhu, K. Tamada, and L. Chen. 2005. Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. *Cancer Res* 65:1089-1096.
- Hodi, F.S., S.J. O'Day, D.F. McDermott, R.W. Weber, J.A. Sosman, J.B. Haanen, R. Gonzalez, C. Robert, D. Schadendorf, J.C. Hassel, W. Akerley, A.J. van den Eertwegh, J. Lutzky, P. Lorigan, J.M. Vaubel, G.P. Linette, D. Hogg, C.H. Ottensmeier, C. Lebbe, C. Peschel, I. Quirt, J.I. Clark, J.D. Wolchok, J.S. Weber, J. Tian, M.J. Yellin, G.M. Nichol, A. Hoos, and W.J. Urba. 2010. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 363:711-723.
- Holschneider, C.H., and J.S. Berek. 2000. Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. *Semin Surg Oncol* 19:3-10.
- Horejsi, V., Bartunkova, J., Brdicka, T., and R. Spisek. 2017. Základy imunologie. 6., aktualizované vydání. V Praze: *Stanislav Juhaňák - Triton*. ISBN 978-80-7553-250-3
- Horikawa, N., K. Abiko, N. Matsumura, J. Hamanishi, T. Baba, K. Yamaguchi, Y. Yoshioka, M. Koshiyama, and I. Konishi. 2017. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Ovarian Cancer Inhibits Tumor Immunity through the Accumulation of Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Clin Cancer Res* 23:587-599.
- Hsu, W.M., F.J. Hsieh, Y.M. Jeng, M.L. Kuo, C.N. Chen, D.M. Lai, L.J. Hsieh, B.T. Wang, P.N. Tsao, H. Lee, M.T. Lin, H.S. Lai, and W.J. Chen. 2005. Calreticulin expression in neuroblastoma--a novel independent prognostic factor. *Ann Oncol* 16:314-321.
- Huang, J., W. Hu, and A.K. Sood. 2010. Prognostic biomarkers in ovarian cancer. *Cancer Biomark* 8:231-251.
- Huang, L.J., X.F. Deng, F. Chang, X.L. Wu, Y. Wu, and Q.Z. Diao. 2018. Prognostic significance of programmed cell death ligand 1 expression in patients with ovarian carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 97:e12858.
- Huard, B., P. Prigent, M. Tournier, D. Bruniquel, and F. Triebel. 1995. CD4/major histocompatibility complex class II interaction analyzed with CD4⁺ and lymphocyte activation gene-3 (LAG-3)-Ig fusion proteins. *Eur J Immunol* 25:2718-2721.
- Hwang, W.T., S.F. Adams, E. Tahirovic, I.S. Hagemann, and G. Coukos. 2012. Prognostic significance of tumor-infiltrating T cells in ovarian cancer: a meta-analysis. *Gynecol Oncol* 124:192-198.
- Chao, M.P., S. Jaiswal, R. Weissman-Tsukamoto, A.A. Alizadeh, A.J. Gentles, J. Volkmer, K. Weiskopf, S.B. Willingham, T. Raveh, C.Y. Park, R. Majeti, and I.L. Weissman. 2010. Calreticulin is the dominant pro-phagocytic signal on multiple human cancers and is counterbalanced by CD47. *Sci Transl Med* 2:63ra94.
- Chen, C.N., C.C. Chang, T.E. Su, W.M. Hsu, Y.M. Jeng, M.C. Ho, F.J. Hsieh, P.H. Lee, M.L. Kuo, H. Lee, and K.J. Chang. 2009. Identification of calreticulin as a prognosis marker and angiogenic regulator in human gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 16:524-533.
- Kasikova, L., M. Hensler, I. Truxova, P. Skapa, J. Laco, L. Belicova, I. Praznovec, S. Vosahlikova, M.J. Halaska, T. Brtnicky, L. Rob, J. Presl, J. Kostun, I. Cremer, A. Ryska, G. Kroemer, L. Galluzzi, R. Spisek, and J. Fucikova. 2019. Calreticulin

- exposure correlates with robust adaptive antitumor immunity and favorable prognosis in ovarian carcinoma patients. *J Immunother Cancer* 7:1-12.
- Kasikova, L., I. Truxova, I. Cremer, C. Sautes-Fridman, O. Kepp, G. Kroemer, R. Spisek, and J. Fucikova. 2020. Side-by-side comparison of flow cytometry and immunohistochemistry for detection of calreticulin exposure in the course of immunogenic cell death. *Methods in enzymology* 632: 1-12.
- Kawamura, K., Y. Komohara, K. Takaishi, H. Katabuchi, and M. Takeya. 2009. Detection of M2 macrophages and colony-stimulating factor 1 expression in serous and mucinous ovarian epithelial tumors. *Pathol Int* 59:300-305.
- Kepp, O., L. Senovilla, I. Vitale, E. Vacchelli, S. Adjemian, P. Agostinis, L. Apetoh, F. Aranda, V. Barnaba, N. Bloy, L. Bracci, K. Breckpot, D. Brough, A. Buque, M.G. Castro, M. Cirone, M.I. Colombo, I. Cremer, S. Demaria, L. Dini, A.G. Eliopoulos, A. Faggioni, S.C. Formenti, J. Fucikova, L. Gabriele, U.S. Gaip, J. Galon, A. Garg, F. Ghiringhelli, N.A. Giese, Z.S. Guo, A. Hemminki, M. Herrmann, J.W. Hodge, S. Holdenrieder, J. Honeychurch, H.M. Hu, X. Huang, T.M. Illidge, K. Kono, M. Korbelik, D.V. Krysko, S. Loi, P.R. Lowenstein, E. Lugli, Y. Ma, F. Madeo, A.A. Manfredi, I. Martins, D. Mavilio, L. Menger, N. Merendino, M. Michaud, G. Mignot, K.L. Mossman, G. Multhoff, R. Oehler, F. Palombo, T. Panaretakis, J. Pol, E. Proietti, J.E. Ricci, C. Riganti, P. Rovere-Querini, A. Rubartelli, A. Sistigu, M.J. Smyth, J. Sonnemann, R. Spisek, J. Stagg, A.Q. Sukkurwala, E. Tartour, A. Thorburn, S.H. Thorne, P. Vandenabeele, F. Velotti, S.T. Workenhe, H. Yang, W.X. Zong, L. Zitvogel, G. Kroemer, and L. Galluzzi. 2014. Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death. *Oncoimmunology* 3:e955691.
- Kim, R., M. Emi, and K. Tanabe. 2007. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* 121:1-14.
- Klener, P., Šťastný, M. 2010. Posuzování léčebné odpovědi u zhoubných nádorů a potřeba úpravy kritérií pro hodnocení účinnosti imunoterapie. *Remedia* 20: 332-336.
- Kossai, M., A. Leary, J.Y. Scoazec, and C. Genestie. 2018. Ovarian Cancer: A Heterogeneous Disease. *Pathobiology* 85:41-49.
- Kryczek, I., R. Liu, G. Wang, K. Wu, X. Shu, W. Szeliga, L. Vatan, E. Finlayson, E. Huang, D. Simeone, B. Redman, T.H. Welling, A. Chang, and W. Zou. 2009. FOXP3 defines regulatory T cells in human tumor and autoimmune disease. *Cancer Res* 69:3995-4000.
- Kryczek, I., S. Wei, G. Zhu, L. Myers, P. Mottram, P. Cheng, L. Chen, G. Coukos, and W. Zou. 2007. Relationship between B7-H4, regulatory T cells, and patient outcome in human ovarian carcinoma. *Cancer Res* 67:8900-8905.
- Krysko, D.V., A.D. Garg, A. Kaczmarek, O. Krysko, P. Agostinis, and P. Vandenabeele. 2012. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 12:860-875.
- Lan, C., X. Huang, S. Lin, H. Huang, Q. Cai, T. Wan, J. Lu, and J. Liu. 2013. Expression of M2-polarized macrophages is associated with poor prognosis for advanced epithelial ovarian cancer. *Technol Cancer Res Treat* 12:259-267.
- Lanier, L.L. 2005. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 23:225-274.
- Le Page, C., A. Marineau, P.K. Bonza, K. Rahimi, L. Cyr, I. Labouba, J. Madore, N. Delvoye, A.-M. Mes-Masson, and D.M. Provencher. 2012a. *BTN3A2* expression in epithelial ovarian cancer is associated with higher tumor infiltrating T cells and a better prognosis. *Plos one* 7:e38541.
- Ledermann, J.A., P. Harter, C. Gourley, M. Friedlander, I. Vergote, G. Rustin, C. Scott, W. Meier, R. Shapira-Frommer, and T. Safra. 2016. Overall survival in patients with platinum-sensitive recurrent serous ovarian cancer receiving olaparib maintenance

- monotherapy: an updated analysis from a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 2 trial. *The lancet oncology* 17:1579-1589.
- Lee, J.-m., A.D.S. Zimmer, S. Lipkowitz, C.M. Annunziata, T.W. Ho, V.L. Chiou, L.M. Minasian, N.D. Houston, I. Ekwede, and E.C. Kohn. 2016. Phase I study of the PD-L1 inhibitor, durvalumab (MEDI4736; D) in combination with a PARP inhibitor, olaparib (O) or a VEGFR inhibitor, cediranib (C) in women's cancers (NCT02484404). In American Society of Clinical Oncology.
- Leffers, N., M.J. Gooden, R.A. de Jong, B.N. Hooigeboom, K.A. ten Hoor, H. Hollema, H.M. Boezen, A.G. van der Zee, T. Daemen, and H.W. Nijman. 2009. Prognostic significance of tumor-infiltrating T-lymphocytes in primary and metastatic lesions of advanced stage ovarian cancer. *Cancer Immunol Immunother* 58:449-459.
- Li, M.O., M.R. Sarkisian, W.Z. Mehal, P. Rakic, and R.A. Flavell. 2003. Phosphatidylserine receptor is required for clearance of apoptotic cells. *Science* 302:1560-1563.
- Li, X., C. Shao, Y. Shi, and W. Han. 2018. Lessons learned from the blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *J Hematol Oncol* 11:31.
- Li, Y., F. Li, F. Jiang, X. Lv, R. Zhang, A. Lu, and G. Zhang. 2016. A Mini-Review for Cancer Immunotherapy: Molecular Understanding of PD-1/PD-L1 Pathway & Translational Blockade of Immune Checkpoints. *Int J Mol Sci* 17:
- Liu, R., J. Gong, J. Chen, Q. Li, C. Song, J. Zhang, Y. Li, Z. Liu, Y. Dong, L. Chen, and B. Jin. 2012. Calreticulin as a potential diagnostic biomarker for lung cancer. *Cancer Immunol Immunother* 61:855-864.
- Long, E.O., H.S. Kim, D. Liu, M.E. Peterson, and S. Rajagopalan. 2013. Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition. *Annu Rev Immunol* 31:227-258.
- Lu, Y.C., W.C. Weng, and H. Lee. 2015. Functional roles of calreticulin in cancer biology. *Biomed Res Int* 2015:526524.
- Lwin, Z.M., C. Guo, A. Salim, G.W. Yip, F.T. Chew, J. Nan, A.A. Thike, P.H. Tan, and B.H. Bay. 2010. Clinicopathological significance of calreticulin in breast invasive ductal carcinoma. *Mod Pathol* 23:1559-1566.
- Lynch, D.H., F. Ramsdell, and M.R. Alderson. 1995. Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses. *Immunol Today* 16:569-574.
- Mantia-Smaldone, G.M., B. Corr, and C.S. Chu. 2012. Immunotherapy in ovarian cancer. *Hum Vaccin Immunother* 8:1179-1191.
- Mantovani, A., and A. Sica. 2010. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr Opin Immunol* 22:231-237.
- Martinez, F.O., L. Helming, R. Milde, A. Varin, B.N. Melgert, C. Draijer, B. Thomas, M. Fabbri, A. Crawshaw, L.P. Ho, N.H. Ten Hacken, V. Cobos Jimenez, N.A. Kootstra, J. Hamann, D.R. Greaves, M. Locati, A. Mantovani, and S. Gordon. 2013. Genetic programs expressed in resting and IL-4 alternatively activated mouse and human macrophages: similarities and differences. *Blood* 121:e57-69.
- Matsukuma, S., K. Yoshimura, T. Ueno, A. Oga, M. Inoue, Y. Watanabe, A. Kuramasu, M. Fuse, R. Tsunedomi, and S. Nagaoka. 2016. Calreticulin is highly expressed in pancreatic cancer stem-like cells. *Cancer science* 107:1599-1609.
- Matsuzaki, J., S. Gnjatic, P. Mhawech-Fauceglia, A. Beck, A. Miller, T. Tsuji, C. Eppolito, F. Qian, S. Lele, P. Shrikant, L.J. Old, and K. Odunsi. 2010. Tumor-infiltrating NY-ESO-1-specific CD8+ T cells are negatively regulated by LAG-3 and PD-1 in human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:7875-7880.
- Michaud, M., I. Martins, A.Q. Sukkurwala, S. Adjemian, Y. Ma, P. Pellegatti, S. Shen, O. Kepp, M. Scoazec, G. Mignot, S. Rello-Varona, M. Tailler, L. Menger, E. Vacchelli, L. Galluzzi, F. Ghiringhelli, F. di Virgilio, L. Zitvogel, and G. Kroemer. 2011.

- Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science* 334:1573-1577.
- Mirza, M.R., B.J. Monk, J. Herrstedt, A.M. Oza, S. Mahner, A. Redondo, M. Fabbro, J.A. Ledermann, D. Lorusso, and I. Vergote. 2016. Niraparib maintenance therapy in platinum-sensitive, recurrent ovarian cancer. *New England Journal of Medicine* 375:2154-2164.
- Mittal, D., M.M. Gubin, R.D. Schreiber, and M.J. Smyth. 2014. New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol* 27:16-25.
- Muth, C., Y. Rubner, S. Semrau, P.F. Ruhle, B. Frey, A. Strnad, R. Buslei, R. Fietkau, and U.S. Gaipl. 2016. Primary glioblastoma multiforme tumors and recurrence : Comparative analysis of the danger signals HMGB1, HSP70, and calreticulin. *Strahlenther Onkol* 192:146-155.
- Napoletano, C., F. Bellati, R. Landi, S. Pauselli, C. Marchetti, V. Visconti, P. Sale, M. Liberati, A. Rughetti, L. Frati, P.B. Panici, and M. Nuti. 2010. Ovarian cancer cytoreduction induces changes in T cell population subsets reducing immunosuppression. *J Cell Mol Med* 14:2748-2759.
- Nesbeth, Y.C., D.G. Martinez, S. Toraya, U.K. Scarlett, J.R. Cubillos-Ruiz, M.R. Rutkowski, and J.R. Conejo-Garcia. 2010. CD4+ T cells elicit host immune responses to MHC class II-negative ovarian cancer through CCL5 secretion and CD40-mediated licensing of dendritic cells. *J Immunol* 184:5654-5662.
- Nielsen, J.S., R.A. Sahota, K. Milne, S.E. Kost, N.J. Nessler, P.H. Watson, and B.H. Nelson. 2012. CD20+ tumor-infiltrating lymphocytes have an atypical CD27- memory phenotype and together with CD8+ T cells promote favorable prognosis in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 18:3281-3292.
- Obeid, M., T. Panaretakis, N. Joza, R. Tufi, A. Tesniere, P. van Endert, L. Zitvogel, and G. Kroemer. 2007a. Calreticulin exposure is required for the immunogenicity of gamma-irradiation and UVC light-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 14:1848-1850.
- Obeid, M., A. Tesniere, F. Ghiringhelli, G.M. Fimia, L. Apetoh, J.L. Perfettini, M. Castedo, G. Mignot, T. Panaretakis, N. Casares, D. Metivier, N. Larochette, P. van Endert, F. Ciccocanti, M. Piacentini, L. Zitvogel, and G. Kroemer. 2007b. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* 13:54-61.
- Ogden, C.A., A. deCathelineau, P.R. Hoffmann, D. Bratton, B. Ghebrehiwet, V.A. Fadok, and P.M. Henson. 2001. C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J Exp Med* 194:781-795.
- Orr, A.W., C.A. Elzie, D.F. Kucik, and J.E. Murphy-Ullrich. 2003. Thrombospondin signaling through the calreticulin/LDL receptor-related protein co-complex stimulates random and directed cell migration. *Journal of cell science* 116:2917-2927.
- Oza, A.M., F. Selle, I. Davidenko, J. Korach, C. Mendiola, P. Pautier, E. Chmielowska, A. Bamias, A. DeCensi, Z. Zvirbule, A. Gonzalez-Martin, R. Hegg, F. Joly, C. Zamagni, A. Gadducci, N. Martin, S. Robb, and N. Colombo. 2017. Efficacy and Safety of Bevacizumab-Containing Therapy in Newly Diagnosed Ovarian Cancer: ROSiA Single-Arm Phase 3B Study. *Int J Gynecol Cancer* 27:50-58.
- Panaretakis, T., O. Kepp, U. Brockmeier, A. Tesniere, A.C. Bjorklund, D.C. Chapman, M. Durchschlag, N. Joza, G. Pierron, P. van Endert, J. Yuan, L. Zitvogel, F. Madeo, D.B. Williams, and G. Kroemer. 2009. Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *EMBO J* 28:578-590.
- Pardoll, D.M. 2012. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 12:252-264.

- Pawaria, S., and R.J. Binder. 2011. CD91-dependent programming of T-helper cell responses following heat shock protein immunization. *Nat Commun* 2:521.
- Peng, R.Q., Y.B. Chen, Y. Ding, R. Zhang, X. Zhang, X.J. Yu, Z.W. Zhou, Y.X. Zeng, and X.S. Zhang. 2010. Expression of calreticulin is associated with infiltration of T-cells in stage IIIB colon cancer. *World J Gastroenterol* 16:2428-2434.
- Raghavan, M., S.J. Wijeyesakere, L.R. Peters, and N. Del Cid. 2013. Calreticulin in the immune system: ins and outs. *Trends Immunol* 34:13-21.
- Raspollini, M.R., F. Castiglione, D. Rossi Degl'innocenti, G. Amunni, A. Villanucci, F. Garbini, G. Baroni, and G.L. Taddei. 2005. Tumour-infiltrating gamma/delta T-lymphocytes are correlated with a brief disease-free interval in advanced ovarian serous carcinoma. *Ann Oncol* 16:590-596.
- Robert, C., L. Thomas, I. Bondarenko, S. O'Day, J. Weber, C. Garbe, C. Lebbe, J.F. Baurain, A. Testori, J.J. Grob, N. Davidson, J. Richards, M. Maio, A. Hauschild, W.H. Miller, Jr., P. Gascon, M. Lotem, K. Harmankaya, R. Ibrahim, S. Francis, T.T. Chen, R. Humphrey, A. Hoos, and J.D. Wolchok. 2011. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med* 364:2517-2526.
- Roncolato, F.T., E. Gibbs, C.K. Lee, R. Asher, L.C. Davies, V.J. GebSKI, M. Friedlander, F. Hilpert, L. Wenzel, M.R. Stockler, M. King, and E. Pujade-Lauraine. 2017. Quality of life predicts overall survival in women with platinum-resistant ovarian cancer: an AURELIA substudy. *Ann Oncol* 28:1849-1855.
- Rozali, E.N., S.V. Hato, B.W. Robinson, R.A. Lake, and W.J. Lesterhuis. 2012. Programmed death ligand 2 in cancer-induced immune suppression. *Clin Dev Immunol* 2012:656340.
- Sabado, R.L., S. Balan, and N. Bhardwaj. 2017. Dendritic cell-based immunotherapy. *Cell Res* 27:74-95.
- Sakuishi, K., L. Apetoh, J.M. Sullivan, B.R. Blazar, V.K. Kuchroo, and A.C. Anderson. 2010. Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J Exp Med* 207:2187-2194.
- Sato, E., S.H. Olson, J. Ahn, B. Bundy, H. Nishikawa, F. Qian, A.A. Jungbluth, D. Frosina, S. Gnjjatic, C. Ambrosone, J. Kepner, T. Odunsi, G. Ritter, S. Lele, Y.T. Chen, H. Ohtani, L.J. Old, and K. Odunsi. 2005. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:18538-18543.
- Seymour, L., J. Bogaerts, A. Perrone, R. Ford, L.H. Schwartz, S. Mandrekar, N.U. Lin, S. Litiere, J. Dancey, A. Chen, F.S. Hodi, P. Therasse, O.S. Hoekstra, L.K. Shankar, J.D. Wolchok, M. Ballinger, C. Caramella, E.G.E. de Vries, and R.w. group. 2017. iRECIST: guidelines for response criteria for use in trials testing immunotherapeutics. *Lancet Oncol* 18:e143-e152.
- Sheng, W., C. Chen, M. Dong, J. Zhou, Q. Liu, Q. Dong, and F. Li. 2014. Overexpression of calreticulin contributes to the development and progression of pancreatic cancer. *J Cell Physiol* 229:887-897.
- Schreiber, R.D., L.J. Old, and M.J. Smyth. 2011. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331:1565-1570.
- Sistigu, A., T. Yamazaki, E. Vacchelli, K. Chaba, D.P. Enot, J. Adam, I. Vitale, A. Goubar, E.E. Baracco, C. Remedios, L. Fend, D. Hannani, L. Aymeric, Y. Ma, M. Niso-Santano, O. Kepp, J.L. Schultze, T. Tuting, F. Belardelli, L. Bracci, V. La Sorsa, G. Ziccheddu, P. Sestili, F. Urbani, M. Delorenzi, M. Lacroix-Triki, V. Quidville, R. Conforti, J.P. Spano, L. Pusztai, V. Poirier-Colame, S. Delalogue, F. Penault-Llorca, S. Ladoire, L. Arnould, J. Cyrta, M.C. Dessoliers, A. Eggermont, M.E. Bianchi, M. Pittet, C. Engblom, C. Pfirschke, X. Preville, G. Uze, R.D. Schreiber, M.T. Chow,

- M.J. Smyth, E. Proietti, F. Andre, G. Kroemer, and L. Zitvogel. 2014. Cancer cell-autonomous contribution of type I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy. *Nat Med* 20:1301-1309.
- Soularue, E., P. Lepage, J.F. Colombel, C. Coutzac, D. Faleck, L. Marthey, M. Collins, N. Chaput, C. Robert, and F. Carbonnel. 2018. Enterocolitis due to immune checkpoint inhibitors: a systematic review. *Gut* 67:2056-2067.
- Spisek, R., A. Charalambous, A. Mazumder, D.H. Vesole, S. Jagannath, and M.V. Dhodapkar. 2007. Bortezomib enhances dendritic cell (DC)-mediated induction of immunity to human myeloma via exposure of cell surface heat shock protein 90 on dying tumor cells: therapeutic implications. *Blood* 109:4839-4845.
- Stastny, M., and B. Rihova. 2015. [Escape Strategies of Tumors from Immune Surveillance]. *Klin Onkol* 28 Suppl 4:4S28-37.
- Stoll, G., K. Iribarren, J. Michels, A. Leary, L. Zitvogel, I. Cremer, and G. Kroemer. 2016. Calreticulin expression: Interaction with the immune infiltrate and impact on survival in patients with ovarian and non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology* 5:e1177692.
- Stumpf, M., A. Hasenburg, M.O. Riener, U. Jutting, C. Wang, Y. Shen, M. Orłowska-Volk, P. Fisch, Z. Wang, G. Gitsch, M. Werner, and S. Lassmann. 2009. Intraepithelial CD8-positive T lymphocytes predict survival for patients with serous stage III ovarian carcinomas: relevance of clonal selection of T lymphocytes. *Br J Cancer* 101:1513-1521.
- Sun, Z., J. Fourcade, O. Pagliano, J.M. Chauvin, C. Sander, J.M. Kirkwood, and H.M. Zarour. 2015. IL10 and PD-1 Cooperate to Limit the Activity of Tumor-Specific CD8+ T Cells. *Cancer Res* 75:1635-1644.
- Swisher, E.M., K.K. Lin, A.M. Oza, C.L. Scott, H. Giordano, J. Sun, G.E. Konecny, R.L. Coleman, A.V. Tinker, and D.M. O'Malley. 2017. Rucaparib in relapsed, platinum-sensitive high-grade ovarian carcinoma (ARIEL2 Part 1): an international, multicentre, open-label, phase 2 trial. *The lancet oncology* 18:75-87.
- Taube, J.M., R.A. Anders, G.D. Young, H. Xu, R. Sharma, T.L. McMiller, S. Chen, A.P. Klein, D.M. Pardoll, S.L. Topalian, and L. Chen. 2012. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med* 4:127ra137.
- Tesniere, A., F. Schlemmer, V. Boige, O. Kepp, I. Martins, F. Ghiringhelli, L. Aymeric, M. Michaud, L. Apetoh, L. Barault, J. Mendiboure, J.P. Pignon, V. Jooste, P. van Endert, M. Ducreux, L. Zitvogel, F. Piard, and G. Kroemer. 2010. Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin. *Oncogene* 29:482-491.
- Tomsova, M., B. Melichar, I. Sedlakova, and I. Steiner. 2008. Prognostic significance of CD3+ tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 108:415-420.
- Truxova, I., L. Kasikova, M. Hensler, P. Skapa, J. Laco, L. Pecen, L. Belicova, I. Praznovec, M.J. Halaska, and T. Brtnicky. 2018. Mature dendritic cells correlate with favorable immune infiltrate and improved prognosis in ovarian carcinoma patients. *Journal for immunotherapy of cancer* 6: 1-13.
- Truxova, I., L. Kasikova, C. Salek, M. Hensler, D. Lysak, P. Holicek, P. Bilkova, M. Holubova, X. Chen, R. Mikyskova, M. Reinis, M. Kovar, B. Tomalova, J.P. Kline, L. Galluzzi, R. Spisek, and J. Fucikova. 2019. Calreticulin exposure on malignant blasts correlates with improved natural killer cell-mediated cytotoxicity in acute myeloid leukemia patients. *Haematologica*
- Tsai, H.F., and P.N. Hsu. 2017. Cancer immunotherapy by targeting immune checkpoints: mechanism of T cell dysfunction in cancer immunity and new therapeutic targets. *J Biomed Sci* 24:35.

- Tsiatas, M.L., R. Gyftaki, C. Liacos, E. Politi, A. Rodolakis, M.A. Dimopoulos, and A. Bamias. 2009. Study of T lymphocytes infiltrating peritoneal metastases in advanced ovarian cancer: associations with vascular endothelial growth factor levels and prognosis in patients receiving platinum-based chemotherapy. *Int J Gynecol Cancer* 19:1329-1334.
- Vacchelli, E., Y. Ma, E.E. Baracco, A. Sistigu, D.P. Enot, F. Pietrocola, H. Yang, S. Adjemian, K. Chaba, M. Semeraro, M. Signore, A. De Ninno, V. Lucarini, F. Peschiaroli, L. Businaro, A. Gerardino, G. Manic, T. Ulas, P. Gunther, J.L. Schultze, O. Kepp, G. Stoll, C. Lefebvre, C. Mulot, F. Castoldi, S. Rusakiewicz, S. Ladoire, L. Apetoh, J.M. Bravo-San Pedro, M. Lucattelli, C. Delarasse, V. Boige, M. Ducreux, S. Delaloge, C. Borg, F. Andre, G. Schiavoni, I. Vitale, P. Laurent-Puig, F. Mattei, L. Zitvogel, and G. Kroemer. 2015. Chemotherapy-induced antitumor immunity requires formyl peptide receptor 1. *Science* 350:972-978.
- Varga, A., S.A. Piha-Paul, P.A. Ott, J.M. Mehnert, D. Berton-Rigaud, E.A. Johnson, J.D. Cheng, S. Yuan, E.H. Rubin, and D.E. Matei. 2015. Antitumor activity and safety of pembrolizumab in patients (pts) with PD-L1 positive advanced ovarian cancer: Interim results from a phase Ib study. In American Society of Clinical Oncology.
- Vergote, I., A. du Bois, A. Floquet, J. Rau, J.W. Kim, J.M. Del Campo, M. Friedlander, S. Pignata, K. Fujiwara, N. Colombo, M.R. Mirza, B.J. Monk, I. Tsibulak, P.M. Calvert, T.J. Herzog, L.C. Hanker, J. Meunier, J.Y. Lee, A. Bologna, M.J. Carrasco-Alfonso, and P. Harter. 2019. Overall survival results of AGO-OVAR16: A phase 3 study of maintenance pazopanib versus placebo in women who have not progressed after first-line chemotherapy for advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 155:186-191.
- Vicari, A.P., C. Caux, and G. Trinchieri. 2002. Tumour escape from immune surveillance through dendritic cell inactivation. In *Seminars in cancer biology*. Elsevier, 33-42.
- Vivier, E., D.H. Raulet, A. Moretta, M.A. Caligiuri, L. Zitvogel, L.L. Lanier, W.M. Yokoyama, and S. Ugolini. 2011. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 331:44-49.
- Vlasák, P., J. Bouda, J. Kost'un, D. Berezovskiy, and J. Presl. 2018. Nové trendy v systémové léčbě ovariálního karcinomu. *Actual Gyn.* 10:4-9.
- Vyzula, R., Nemecek, R., and O. Slama. 2018. Klinická onkologie pro mediky, solidní nádory a nádory dětského věku. [online]. *Lékařská fakulta Masarykovy university Brno*. Dostupné z: <https://portal.med.muni.cz/clanek-661-klinicka-onkologie-pro-mediky-solidni-nadory-a-nadory-detskeho-veku.html>.
- Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky. 2016. Novotvary ČR. Praha: 1989-. ISSN 1210-857X.
- Webb, J.R., K. Milne, D.R. Kroeger, and B.H. Nelson. 2016. PD-L1 expression is associated with tumor-infiltrating T cells and favorable prognosis in high-grade serous ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 141:293-302.
- Webb, J.R., K. Milne, and B.H. Nelson. 2015. PD-1 and CD103 Are Widely Coexpressed on Prognostically Favorable Intraepithelial CD8 T Cells in Human Ovarian Cancer. *Cancer Immunol Res* 3:926-935.
- Webb, P.M., and S.J. Jordan. 2017. Epidemiology of epithelial ovarian cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 41:3-14.
- Wemeau, M., O. Kepp, A. Tesniere, T. Panaretakis, C. Flament, S. De Botton, L. Zitvogel, G. Kroemer, and N. Chaput. 2010. Calreticulin exposure on malignant blasts predicts a cellular anticancer immune response in patients with acute myeloid leukemia. *Cell Death Dis* 1:e104.

- Wiersma, V.R., M. Michalak, T.M. Abdullah, E. Bremer, and P. Eggleton. 2015. Mechanisms of Translocation of ER Chaperones to the Cell Surface and Immunomodulatory Roles in Cancer and Autoimmunity. *Front Oncol* 5:7.
- Wolf, D., A.M. Wolf, H. Rumpold, H. Fiegl, A.G. Zeimet, E. Muller-Holzner, M. Deibl, G. Gastl, E. Gunsilius, and C. Marth. 2005. The expression of the regulatory T cell-specific forkhead box transcription factor FoxP3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 11:8326-8331.
- Wolchok, J.D., A. Hoos, S. O'Day, J.S. Weber, O. Hamid, C. Lebbe, M. Maio, M. Binder, O. Bohnsack, G. Nichol, R. Humphrey, and F.S. Hodi. 2009. Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors: immune-related response criteria. *Clin Cancer Res* 15:7412-7420.
- Wu, L., Z. Deng, Y. Peng, L. Han, J. Liu, L. Wang, B. Li, J. Zhao, S. Jiao, and H. Wei. 2017. Ascites-derived IL-6 and IL-10 synergistically expand CD14(+)HLA-DR(-/low) myeloid-derived suppressor cells in ovarian cancer patients. *Oncotarget* 8:76843-76856.
- Yafei, Z., G. Jun, and G. Guolan. 2016. Correlation between macrophage infiltration and prognosis of ovarian cancer-a preliminary study. *Biomed. Res* 27:305.
- Yonemori, K., T. Matsumoto, S. Nagao, N. Katsumata, K. Oda, H. Watari, H. Tokunaga, H. Fujiwara, H. Yokota, and T. Hirasawa. 2019. Avelumab in platinum-resistant/refractory ovarian cancer (PRROC): phase 3 results from JAVELIN Ovarian 200. *Annals of Oncology* 30:vi89.
- Yuan, X., J. Zhang, D. Li, Y. Mao, F. Mo, W. Du, and X. Ma. 2017. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in ovarian cancer: A meta-analysis. *Gynecol Oncol* 147:181-187.
- Zamanian, M., L.A. Qader Hamadneh, A. Veerakumarasivam, S. Abdul Rahman, S. Shohaimi, and R. Rosli. 2016. Calreticulin mediates an invasive breast cancer phenotype through the transcriptional dysregulation of p53 and MAPK pathways. *Cancer Cell Int* 16:56.
- Zhang, L., J.R. Conejo-Garcia, D. Katsaros, P.A. Gimotty, M. Massobrio, G. Regnani, A. Makrigiannakis, H. Gray, K. Schlienger, M.N. Liebman, S.C. Rubin, and G. Coukos. 2003. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 348:203-213.
- Zhang, M., Y. He, X. Sun, Q. Li, W. Wang, A. Zhao, and W. Di. 2014. A high M1/M2 ratio of tumor-associated macrophages is associated with extended survival in ovarian cancer patients. *J Ovarian Res* 7:19.
- Zhang, X.H., Y. Zhang, W.P. Xie, D.S. Sun, Y.K. Zhang, Y.K. Hao, and G.Q. Tan. 2017. Expression and significance of calreticulin in human osteosarcoma. *Cancer Biomark* 18:405-411.
- Zhang, Z., J. Huang, C. Zhang, H. Yang, H. Qiu, J. Li, Y. Liu, L. Qin, L. Wang, S. Hao, F. Zhang, X. Wang, and B. Shan. 2015. Infiltration of dendritic cells and T lymphocytes predicts favorable outcome in epithelial ovarian cancer. *Cancer Gene Ther* 22:198-206.
- Zou, W., and L. Chen. 2008. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* 8:467-477.