

Kirsikka Musta

# MAKROFAGIEN JA MIKROGLIOJEN IM- MUUNISUPPRESSIIVINEN SIGNALOINTI GLIOBLASTOOMASSA

Lääketieteen ja terveysteknologian tiedekunta  
Kandidaatin tutkielma  
Huhtikuu 2020

# TIIVISTELMÄ

Kirsikka Musta: Makrofagien ja mikroglion immuunisuppressiivinen signaali glioblastoomassa  
Kandidaatin tutkielma  
Tampereen yliopisto  
Bioteknologia  
Huhtikuu 2020

---

Glioblastooma (GBM) on pahanlaatuisen keskushermoston graduksen IV kasvain, jossa elinaika diagnoosin jälkeen on noin 15 kuukautta. Glioblastooman immuuniterapiasta ei ole saatu toivotun kaltaisia tuloksia. Siksi tämän työn tavoitteena on tutkia glioblastooman immuunisuppressiota sitä välittävien makrofagien ja mikroglion näkökulmasta.

Immuunisuppressiossa immuunipuolustusjärjestelmän kyky tunnistaa syöpä ja hyökätä sitä vastaan on heikentynyt. Immuunisuppression kehittymistä voidaan edesauttaa esimerkiksi vaikuttamalla T-solujen toimintaan tai edistämällä makrofagien ja mikroglion polarisaatiota kohti immuunisuppressiivista M2-muotoa. Tässä työssä käydään läpi glioblastoomassa tärkeitä solujen väliin ja sisäiseen signaaliin osallistuvia molekyylejä, eli signaaliinmolekyylejä. Näihin lukeutuu sekä ligandit, reseptorit, että signaaliinvälittäjät. Työssä käydään läpi signaaliinmolekyylejä, jotka aiheuttavat M2-polarisaatiota sekä signaaliinmolekyylejä, joiden avulla makrofagit ja mikroglia edistävät immuunisuppressiota.

Glioblastoomassa immuunisuppression kannalta merkittäviä säätelijöitä ovat neurofibromiini 1 (NF1), programmed death ligand 1 (PD-L1), the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), interleukiini 10 (IL-10) ja nuclear factor- $\kappa$ B (NF $\kappa$ B). Lisäksi glioblastoomassa on merkittävässä roolissa isositraattidehydrogenaasin (IDH) mutaatio. NF1 on tuumorisuppressori, joka voidaan menettää glioblastoomasoluissa. Tämä voi johtaa muiden signaaliinmolekyyliden voimistamiseen säätelyyn sekä makrofageissa ja mikrogliaissa. Syöpäsolujen IDH-mutaatio tekee kasvaimista immunologisesti vähemmän aktiivisia, mutta PD-L1, IL-10, NF $\kappa$ B ja STAT3 edesauttavat immuunisuppressiota. Näiden signaaliinmolekyyliden yhteisvaikutuksen parempi ymmärtäminen auttaisi kehittämään parempia terapeuttisia sovelluksia glioblastooman hoitoon.

Avainsanat: Glioblastooma, GBM, glioma associated macrophage/microglia, GAM, makrofagi, mikroglia, immuunisuppressio, immuunisuppressiivinen signaali

Tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -ohjelmalla.

# ALKUSANAT

Tämä työ on tehty Tampereen yliopistossa kevään 2020 aikana.

Tämä työ ei olisi ollut mahdollinen tässä muodossa ilman ohjaajieni Kirsi Granbergin ja Elisa Vuorisen apua ja ohjastusta. Kiitos paljon kärsivällisyydestä ja halukkuudestanne ohjata kandidaatin tutkielmani. Työn aikana olen myös saanut arvokasta vertaispalautetta Mimosa Peltokankaalta ja Sanna Koskimäeltä. Kiitos teille ajastanne ja vaivannäöstänne.

Tampereella, 27.4.2020

Kirsikka Musta

# SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO .....	4
1.1 Glioblastooma .....	4
1.2 Makrofagit .....	4
1.3 Mikroglia .....	5
1.4 Glioblastooman alatyypit .....	5
2. IMMUUNISUPRESSIO YLEISESTI GLIOBLASTOOMISSA .....	6
3. IMMUUNISUPPRESSIIVINEN SIGNALOINTI GLIOBLASTOOMASSA .....	8
3.1.1 NF1 .....	8
3.1.2 IDH-mutaatio .....	9
3.1.3 PD-L1 .....	10
3.1.4 STAT3 .....	10
3.1.5 IL-10 .....	11
3.1.6 NFkB .....	11
4. YHTEENVETO .....	14
5. LÄHTEET .....	15

# 1. JOHDANTO

Immuuniterapia on syövän hoidon uusi suuntaus, joka mahdollistaa sen, ettei kasvainta tarvitse kohdentaa lääkkeillä suoraan (Locarno ym. 2019). Sen sijaan voidaan vahvistaa immuunijärjestelmää, jotta se tuhoaisi kasvainta (Locarno ym. 2019). Näitä hoitomuotoja voidaan hyödyntää vain, jos ymmärretään, miten immuunipuolustusjärjestelmä toimii — tai ei toimi — syövän tapauksessa.

Tämän työn tavoitteena on kuvata glioblastooman vaikutusta immuunipuolustusjärjestelmään. Työssä kuvataan immuunisuppressiolle tärkeitä makrofagien ja mikroglion välittämiä signaalintieiteitä. Tätä tietoa voidaan hyödyntää hoitomuotoja kehiteltäessä, sillä glioblastoomalle ei vielä ole tehokasta immuuniterapiaa. Immuunisuppression signaalintieiteiden ymmärtäminen kehittää myös perustutkimusta ja lisää ymmärrystä solujen toiminnasta.

## 1.1 Glioblastooma

Glioblastooma ovat maailman terveysjärjestön WHO:n mukaan diffuusien gliomien alaluokka. Luokittelu muuttui vuonna 2016, ja samana vuonna julkaistu tiivistelmä (Louis ym. 2016) tiivistää uuden luokittelun keskeisimmät piirteet. Gliomat yleisesti ovat yksi aivokasvaintyyppi. Diffuusit gliomat ovat gliomien alaluokka, joille on nimensä mukaisesti ominaista kasvaimen diffuusi tunkeutuminen terveeseen kudokseen. (Louis ym. 2016)

Glioblastooma (GBM) on graduksen IV syöpänä erittäin pahalaatuinen (Louis ym. 2016). Elinaika diagnoosin jälkeen on glioblastoomissa vain noin 15 kuukautta (Morisse ym. 2018, Roesch ym. 2018). GBM on käytännössä parantumaton (Gray ym. 2014). GBM:lle tyypillisiä mutaatioita ovat esimerkiksi TP53- sekä isositraattidehydrogenaasi 1- ja 2- (IDH 1 ja 2) geenien mutaatiot (Louis ym. 2016). Koska GBM on niin aggressiivinen, on immuunisuppression ymmärtäminen erityisen kiinnostava tutkimuskohde.

## 1.2 Makrofagit

Makrofagit ovat immuunipuolustusjärjestelmän soluja, joiden tehtävänä on fagosytoida muun muassa vanhentuneita, kuolleita ja vaurioituneita soluja sekä mikro-organismeja, kuten bakteereita. Ne muodostuvat luuytimen monosyyteistä ja kulkeutuvat verenkierron mukana kohdekudokseensa (<https://www.oppiportti.fi/op/imm00201/do> 16.4.2020)

Makrofageilla on kaksi muotoa, M1 ja M2, joista M1 on klassisesti aktivoituva ja M2 aktivoituu vaihtoheitoista reittiä (Gabrusiewicz ym. 2018). Klassisessa aktivaatiossa tulehduspaikalla ilmenee

proinflammatorisia sytokiineja, kun taas M2-muodon tehtävä on hillitä immuunireaktiota muun muassa erittämällä anti-inflammatorisia sytokiineja (Roesch ym. 2018) Näin ollen siis M1-muoto edistää tulehdusta ja M2-muoto hillitsee sitä. Tämä malli on kuitenkin huomattu hieman liian jäykäksi, eikä se kaikissa olosuhteissa riitä kuvaamaan todellista tilannetta siksi, että todellisuudessa M1-M2-polarisoituminen on jatkumo (Roesch ym. 2018).

### 1.3 Mikroglia

Mikroglia ovat keskushermoston soluja, jotka muistuttavat tehtäviltään ja toimiltaan paljon makrofageja (Roesch ym. 2018) ja niillekin on määritelty makrofagien tapaan M1- ja M2-fenotyypit (Arcuri ym. 2017). Niiden tehtävänä onkin muun muassa fagosytoida apoptoottisia soluja (Roesch ym. 2018), mutta niillä on myös roolinsa aivojen perustavanlaatuisissa toiminnoissa, kuten synaptisten yhteyksien muodostamisessa ja hävittämisessä (Arcuri ym. 2017).

### 1.4 Glioblastooman alatyypit

GBM on todella heterogeeninen syöpä, koska sillä on paljon geneettistä vaihtelua (Arcuri ym. 2017). Glioblastoomia olisi hyödyllistä kyetä jaottelemaan alatyyppeihin, jotta tiedettäisiin tarkemmin, mitkä signaalintireitit esiintyvät yhdessä. Tämä mahdollistaisi paremman diagnostiikan ja näin ollen paremman kohdennetun lääkehoidon.

Yksi tapa jaotella glioblastoomakasvaimet on jako klassiseen, mesenkymaaliseen ja proneuraaliseen (Gray ym. 2014, Kruse ym. 2014, Arcuri ym. 2017). Luokitteluun on kuulunut myös neuraalinen alatyyppejä, mutta tarkempi tarkastelu on antanut syytä uskoa, että neuraalinen alatyyppejä on vain normaalin hermokudoksen aiheuttamaa kontaminaatiota kasvainnäytteissä, sillä siltä puuttuu tyypilliset geneettiset poikkeavuudet (Wang ym. 2017). Alatyypit on luokiteltu eri geenien ilmentymistasojen ja muiden molekulaaristen markkereiden mukaan. Näistä etenkin mesenkymaalisessa alatyypissä todella edustettuina NFκB:n (englanniksi nuclear factor κB) säätelemät geenit (Oh & Ghosh 2013, Kruse ym. 2014, Cahill ym. 2016, Yamini 2018). Jaottelun ongelmana on kuitenkin se, että kokeelliset tulokset osoittavat, että saman kasvaimen sisällä solut voivat olla ominaisuuksiltaan eri alaluokan kaltaisia (Gray ym. 2014). Näin ollen ei välttämättä ole mahdollista jakaa syöpää kolmeen helposti tunnistettavaan alaluokkaan, joiden perusteella potilasta osattaisiin hoitaa inhiboimalla juuri oikeita signaalintireittejä.

## 2. IMMUUNISUPPRESSIO YLEISESTI GLIOBLASTOONISSA

Immuunisuppressio on tapahtuma, jossa kehon immuunipuolustusjärjestelmän kyky taistella infektioita ja muita sairauksia vastaan on heikentynyt. Immuunisuppressio voidaan saada aikaan lääkkeellisesti esimerkiksi elinsiirtopotilaille tai se voi olla sairauden tuotos (<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/immunosuppression> 28.1.2020). Immuunisuppressiota esiintyy useissa eri syövässä ja syövän immuuniterapian päätavoite onkin estää immuunisuppressiota tapahtumasta, jotta kehon oma immuunipuolustusjärjestelmä kykenisi hyökkäämään syövän kimppuun (Ghirelli & Hagemann 2013). Aiheeseen liittyen vuonna 2018 jaettiin James P. Allisonille ja Tasuku Honjolle lääketieteen ja fysiologian Nobel heidän työstään syövän immuuniterapian mahdollistavista tutkimuksista (<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2018/press-release/> 12.2.2020). Huolimatta immuuniterapian edistymisestä muiden syöpien osalta, immuuniterapian tulokset glioblastoomissa eivät ole olleet optimaalisia (Kruse ym. 2014, Razavi ym. 2016).

Tässä työssä käsitellään immuunisuppressiota glioblastooman näkökulmasta, mistä johtuen kuvailtu immuunisuppressio ei välttämättä ole samanlainen kuin syövässä yleisesti. Yleensä syövässä tapahtuva immuunisuppressio tapahtuu muun muassa makrofagien välityksellä (Ghirelli & Hagemann 2013), mutta glioomissa on kuitenkin omana erityispiirteensä mukana myös aivoille synnynnäiset mikroglia-solut (Kruse ym. 2014, Roesch ym. 2018). Yhdessä näistä soluista käytetään gliooman immuunisuppression yhteydessä termiä glioma-assosioidut makrofagit/mikroglia (GAM) (englanniksi glioma associated macrophage/microglia). Jotta GAM:ien osuutta glioblastooman immuunisuppressiossa voi tarkemmin käsitellä, on ensin ymmärrettävä, miten immuunisuppressio pääpiirteittäin etenee glioblastoomissa.

Glioblastoomissa niin kutsutut lepäävät mikroglia aktivoituvat keskushermostoon kohdistuvasta patologisesta tapahtumasta, kuten esimerkiksi virustulehduksesta (Roesch ym. 2018), mutta patologinen tapahtuma voi mahdollisesti olla myös syöpäsolut itse (Kruse ym. 2014). Tämä aktivaatio johtaa siihen, että mikroglia alkavat ilmentää tulehdukselle relevantteja molekyylejä, kuten major histocompatibility complex (MHC) II -molekyylejä ja voivat näin ollen toimia antigeenejä esittelevinä soluina (Roesch ym. 2018). Tulehduksen alkuvaiheessa tärkeitä tulehdusta edistäviä sytokiineja ovat muun muassa tuumorinekrosifaktori alfa (TNF $\alpha$ ), interleukiini 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) ja interleukiini 6 (IL-6) (Kruse ym. 2014). Muun muassa mikroglion ilmentämä TNF $\alpha$  osaltaan johtaa monosyyteistä erilaistuneiden makrofagien saapumiseen tulehduspaikalle verenkierrosta (Roesch ym. 2018).

Yhdessä makrofagit ja mikroglia tunnistavat immunogeenisiä antigeenejä ja alkavat niiden seurauksena tuottaa lisää proinflammatorisia eli tulehdusta edistäviä sytokiineja sekä muita molekyyliä, jotka ovat tyypillisiä M1-makrofageille ja -mikroglia (Roesch ym. 2018). M1-fenotyyppi on muoto, joka edistää tulehdusreaktiota tuottamalla tulehdusta edistäviä sytokiineja, mutta samalla se on sytotoksinen ja aiheuttaa kudonvauriota (Kruse ym. 2014). Siksi onkin normaalissa tilanteessa tärkeää, että M1-makrofagien ja -mikroglia hoidettua tehtävänsä ne eivät enää tekisi kudokselle lisää vaurioita. Tästä syystä tapahtuu M1-makrofagien ja -mikroglia polarisoituminen M2-fenotyyppiin (Roesch ym. 2018). M2-muoto on vastuussa tulehdusta edistävien sytokiinien, kuten IL-1 ja TNF $\alpha$ , erittämisen vähentämisestä (Kruse ym. 2014). M2-muodon normaaleihin tehtäviin kuuluu kudonvaurioiden korjaamisen osana muun muassa verisuonien uudismuodostus eli angiogeneesi ja kudoksen uudelleenmuodostuminen (Kruse ym. 2014). Immuunisuppressiivinen ympäristö vähentää kuitenkin MHC:n ilmentymistä mikrogliaissa ja näin ollen kyky esitellä antigeenejä vaarantuu (Razavi ym. 2016). Tästä johtuen klassinen antigeenin esittely ei voi toimia yhtä tehokkaasti.

M2-muodon ajatellaan olevan mukana immuunisuppressiivisten T-säätelysolujen (Treg) aktivoimisissa ja värväyksessä (Kruse ym. 2014). Treg-solut ovat CD4:ää ilmentäviin T-auttajiin kuuluva normaali osa immuunipuolustusjärjestelmää ja niiden tehtävän on hillitä tulehdusreaktiota ja ylläpitää immunologista toleranssia omia kudoksia vastaan (<https://www.oppiportti.fi/op/imm00905/do> 17.2.2020). Ne voidaan jakaa kahteen luokkaan: kateenkorvassa kehittyviin ja periferiassa kypsyviin (Oh & Ghosh 2013). Tämän lisäksi lähes kaikki GAM:it kantavat solukalvoillaan Fas-ligandia (FasL), joka indusoi apoptoosin apoptoottisissa Fas-reseptoria kantavissa T-soluissa (Roesch ym. 2018). Näin ollen M2-polarisoituneiden GAM:ien toiminta vaikuttaa haitallisesti T-solujen normaaliin toimintaan glioomakasvaimessa.

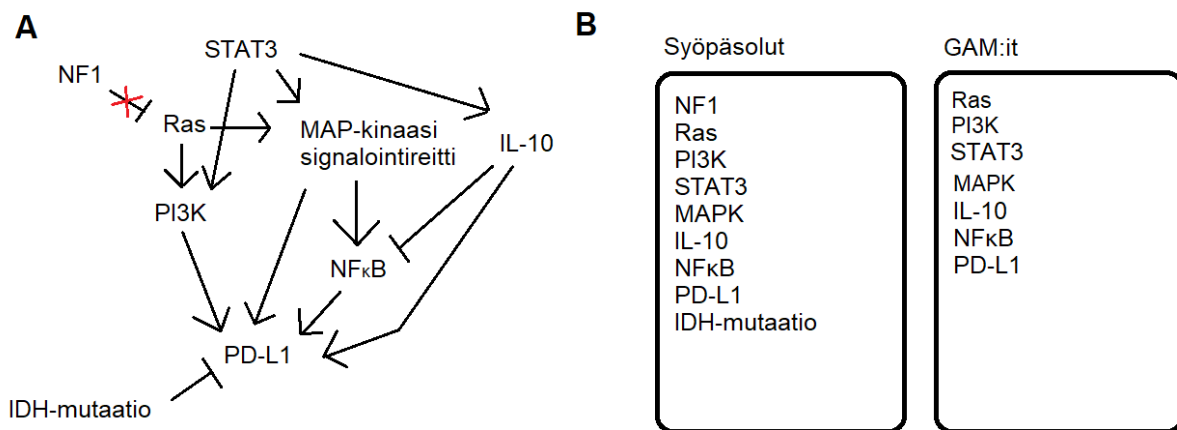
M2-polarisoituminen on kuitenkin dynaaminen prosessi ja onkin osoitettu, että glioblastoomissa esiintyy jatkumo polarisoitumattomista M0-makrofageista M2-makrofageihin (Gabrusiewicz ym. 2018). Yleisesti gliomien läheisyydessä GAM:it polarisoituvat kuitenkin M2-muodon suuntaan (Roesch ym. 2018). Tätä polarisoitumista ajavat paikalliset glioomamikroympäristön erittämät tekijät, kuten esimerkiksi Interleukiini 10 (IL-10) (Kruse ym. 2014). Näiden tekijöiden erittämisessä ovat mukana sekä GAM:it, että glioblastoomasolut (Roesch ym. 2018). On myös hyvä huomata, että esimerkiksi kaikki M2-muotoa makrofageissa indusoivat signaalimolekyylit eivät välttämättä vaikuta samalla tavalla mikrogliaihin (Arcuri ym. 2017). Tämä osoittaa sen, miten monimutkainen prosessi immuunisuppressio on.



### 3. IMMUUNISUPPRESSIIVINEN GLIOBLASTOOMASSA

### SIGNALOINTI

Tässä osiossa käsitellään glioblastooman immuunisuppressiolle merkittäviä signalointimolekyylejä ja miten GAM:it erittävät niitä tai niiden vaikutusta GAM:eihin. Kuvassa 1 on kuvattu, miten signalointireitit vuorovaikuttavat keskenään ja missä soluissa ne ilmenevät. Kuvasta huomataan, että vuorovaikutukset ovat moninaisia.



**Kuva 1.** Tiivistelmä työssä kuvattujen signalointimolekyylien ja reittien vuorovaikutuksesta keskenään.

- A.** Kuvassa on kaikkien tässä tutkielmassa käsiteltujen signalointireittien ja IDH-mutaation vaikutus toisiinsa. IDH-mutaatio aiheuttaa metylaatiota PD-L1:tä koodaavassa geenissä ja siten vähentää PD-L1:n ilmentymistä. IL-10 inhiboi NFκB:n kanonista muotoa p65/p50:tä.
- B.** Kuvassa esitetään signalointimolekyylien ja IDH-mutaation ilmeneminen GBM-soluissa ja GAM:eissa. Kuvassa esitettyjen signalointimolekyylien aktiivisuus syöpäsolujen ja GAM:ien signaloinnissa on korkeampi, lukuun ottamatta NF1:tä, jonka aktiivisuus syöpäsolujen signaloinnissa voi olla matalampi.

#### 3.1.1 NF1

Neurofibromiini 1 (NF1) on tuumorisuppressori, joka inhiboi MAP-kinaasi (MAPK)- (Arcuri ym. 2017) ja PI(3)kinaasi/Akt/mTor (PI3K) -signalointireiteille tärkeää Ras:ia (Cahill ym. 2016). Kuten

myöhemmin tullaan huomaamaan, tämä tekee NF1:stä merkittävän tuumorisuppressorin glioblastoomissa, sillä monet muut glioblastooman immuunisuppressiolle tärkeät reitit ovat joko jomman kumman tai molempien MAPK- ja PI3K-signaaloinnin välittämiä.

NF1:n normaali toiminta voidaan menettää glioblastoomissa ja näin ollen Ras on vapaa aktivoimaan glioblastooman immuunisuppressiolle tärkeitä signalointireittejä, kuten esimerkiksi NFκB:n aktivaatioon johtavaa reittiä (Cahill ym. 2016, Yamini 2018). NF1:n menettämisen on osoitettu olevan yhteydessä suurempaan GAM:ien tunkeutumiseen syöpäkasvaimen luo (Wang ym. 2017, Luoto ym. 2018).

### 3.1.2 IDH-mutaatio

Isositraattidehydrogenaasia eli IDH:ta koodaavan geenin mutaatioita esiintyy noin kymmenessä prosentissa glioblastoomakasvaimia (Louis ym. 2016). Vaikka IDH-mutantit glioblastoomat ovat edelleen graduksen IV syöpiä (Louis ym. 2016), on IDH-mutaatio kasvaimen pahalaatuisuuden kannalta edullinen vaihtoehto useammasta syystä.

Isositraattidehydrogenaasi on entsyymi, joka tuottaa α-ketoglutaraattia (Arcuri ym. 2017). Mutaatio aiheuttaa kuitenkin sen, että reaktiossa suositaankin α-ketoglutaraatin pelkistämistä 2-hydroksi-glutaraatiksi (2-HG) (Arcuri ym. 2017). On mahdollista, että 2-HG aiheuttama neuroaalinen vaurio ylläpitää M1-tulehdusta, johtaen samanaikaiseen M1- ja M2-tulehdukseen (Kruse ym. 2014). Lisäksi 2-HG inhiboi DNA- ja histonidemetylaaseja (Arcuri ym. 2017), mikä muuttaa kasvaimen DNA:n metylaatiota (Yamini 2018). Onkin saatu kokeellisia tuloksia siitä, että 2-HG lisäisi PD-L1:n geenin metylaatiota *in vitro* ja siten vaikuttaisi PD-L1:n ilmentymistasoihin (Mu ym. 2018). Näin ollen voidaan pohtia, kuinka laajalti 2-HG vaikuttaa syövän kannalta edullisten geenien ilmentymiseen negatiivisesti.

IDH-villityypin kasvain on puolestaan yhdistetty korkeampaan immuunisuppressiivisten immuunisolujen, kuten makrofagien ja säätelijä-T-solujen eli Treg:ien, invaasioon sekä yleisesti korkeampaan immuunisuppression tasoon (Mu ym. 2018). IDH-mutaatiolla on merkittävä vaikutus mikroglia-solujen ja makrofagien toimintaan (Mu ym. 2018), mikä saattaa johtaa siihen, että IDH-mutanteissa kasvaimissa on havaittavissa vähemmän immuunisoluja ja matalammat MHC I -tasot (Luoto ym. 2018). Tästä voidaan päätellä, että IDH-mutaatio haittaisi immuunisolujen värväämisessä tärkeitä säätelijöitä (Mu ym. 2018) minkä johdosta IDH-mutantit kasvaimet ovat immunologisesti vähemmän aktiivisia kuin IDH-villityypin kasvaimet (Luoto ym. 2018). Erääksi selitykseksi värväämisen ongelmille onkin ehdotettu IDH-mutanteissa syöpäsoluissa madaltuneen NFκB-aktiivisuuden roolia (Yamini 2018).

IDH-mutaatio vaikuttaa siis immuunisuppressioon 2-HG:n avulla kahdella tavalla. 2-HG itse saa aikaan vauriota, joka ajaa mikroympäristöä proinflammatoriseen, kasvaimen kasvua rajoittavaan suuntaan. Lisäksi 2-HG:n välittämä metylaatiota vähentävien entsyymien inhibointi ajaa immuunisuppressiolle merkittävien geenien DNA-metylaatiota ja ilmentämisen rajoittamista. Nämä kaksi keinoa ennaltaehkäistä ja estää immuunisuppressiota vaikuttavat kovin erilaisilta, ja onkin yllättävää, että niitä aiheuttaa yksi ja sama molekyyli.

### 3.1.3 PD-L1

PD-L1 (englanniksi programmed death ligand 1) toimii normaalisti tulehduksessa ja infektiossa ja sitoutuu PD-1 (englanniksi programmed death 1)-reseptoreihin (Kythreotou ym. 2018). PD-L1:n tehtävänä on estää T-solujen liiallinen aktivaatio (Kythreotou ym. 2018), ja se vaimentaa T-solujen toimintaa ja proliferaatiota (Razavi ym. 2016). Lisäksi PD-L1 aktivoi immuunisuppressiivisesti toimivia Treg-soluja (Razavi ym. 2016). Tasuku Honjo saikin jaetun Nobelin vuonna 2018 juuri PD-L1:n löydön vuoksi (<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2018/press-release/> 12.2.2020).

PD-L1:tä ilmentävät solukalvoillaan sekä glioblastoomasolut, että GAM:it (Razavi ym. 2016). PD-L1:n ilmentymistä voidaan säädellä voimistavasti muun muassa aktivoimalla MAPK- ja PI3K-signaalintireittejä (Kythreotou ym. 2018). Näin ollen PD-L1 on yksi niistä signaalintimolekyyleistä, jonka säätelyä ei kyetä vaimentamaan oikein, kun NF1 menetetään.

Glioblastooman kantasolut erittävät eksosomeja, jotka kantavat muun muassa PD-L1:n ilmentymistä indusoivia proteiineja (Gabrusiewicz ym. 2018). Syöpäsolut vaikuttavat siis varmistavan PD-L1:lle tärkeiden signaalintimolekyyliden tarjonnan. PD-L1 ei kuitenkaan ole välttämättä niin keskeisessä roolissa glioblastoomassa, kuin mitä se on muissa syövissä. T-solujen määrä glioblastoomassa on vähäinen ja näin ollen PD-L1:n mahdollisuus estää T-solujen toimintaa on heikentynyt (Han ym. 2016).

### 3.1.4 STAT3

The signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) on anti-inflammatorinen transkriptiofaktori (Locarno ym. 2019), joka toimii muun muassa JAK/STAT-reitillä (Chang ym. 2017). STAT3 on yliaktivoitunut jopa 70% ihmisten kasvaimista, mutta tämän aktivaation ei uskota johtuvan muutoksista STAT3:n geenissä (Luwor ym. 2013). STAT3:n aktivaatiotasojen uskotaankin johtuvan ylävirran proteiinien, kuten esimerkiksi epidermaalisen kasvutekijän reseptorin (EGFR) ja muiden STAT3:a säätelevien geenien mutaatioista (Chang ym. 2017).

Yhdessä PI3K- ja MAPK-signaalintireittien kanssa STAT3 nostaa PD-L1 ilmentymistasoja makrofageissa (Gabrusiewicz ym. 2018). Lisäksi STAT3 osallistuu GBM-soluissa ja GAM:eissa esimerkiksi interleukiini 10:n (IL-10) tuottamiseen (Chang ym. 2017). Glioblastoomassa GAM:eilla on korkeammat fosforyloituneen STAT3:n tasot, ja ne onkin liitetty kasvaimen korkeampaan gradukseen (Roesch ym. 2018). Glioblastoomista peräisin olevilla mikrogliailla on havaittu korkeampaa STAT3-aktiivisuutta *in vitro* verrattuna mikroglioihin, jotka eivät ole peräisin glioblastoomista (Roesch ym. 2018). Tästä voidaan päätellä, että STAT3-aktiivisuutta säätelevät glioblastooman erittämät tekijät (Roesch ym. 2018).

Sen lisäksi, että STAT3 vaikuttaa PD-L1:n kautta T-soluihin, on sillä myös rooli GAM:ien M2-muodon edistämässä (Locarno ym. 2019). Tämä johtuu siitä, että STAT3 on anti-inflammatorinen transkriptiofaktori (Locarno ym. 2019). STAT3:n rooli immuunisuppressiossa on siis kaksinainen. Toisaalta se on välillisesti PD-L1 kautta mukana vaikuttamassa T-soluihin, mutta toisaalta se ajaa yleisesti anti-inflammatorista ympäristöä edistämällä GAM:ien M2-polarisaatiota. Tämä tekee STAT3:sta mielenkiintoisen kohteen terapeuttisille sovellukselle (Li ym. 2019).

### 3.1.5 IL-10

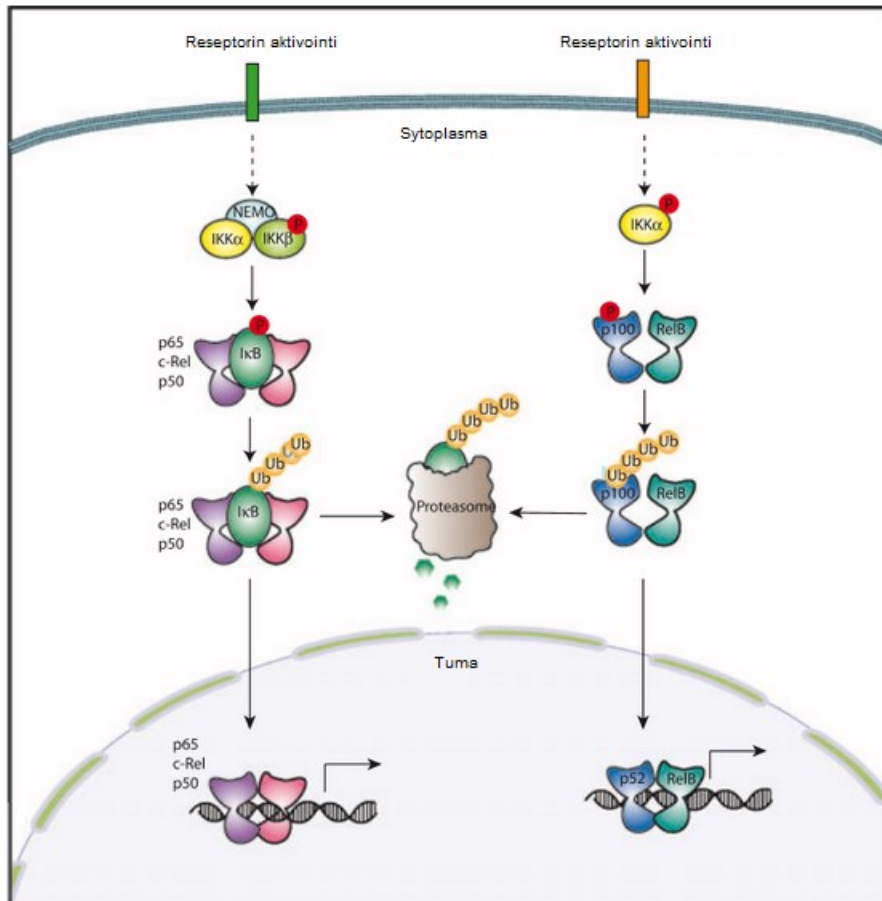
Interleukiini 10 (IL-10) on anti-inflammatorinen sytokiini, jolla on immuunisuppressiivisia ominaisuuksia, kuten interferoni  $\gamma$ :n (INF $\gamma$ ) ja TNF $\alpha$ :n tuotannon inhibointi (Razavi ym. 2016). Glioblastoomasolut itse erittävät anti-inflammatorisia sytokiineja, kuten IL-10:tä (Kruse ym. 2014). IL-10 osallistuu PD-L1:n ilmentymisen säätelyyn voimistavasti yhdessä STAT3:n kanssa (Gabrusiewicz ym. 2018). On kuitenkin hyvä huomata, että anti-inflammatorisena transkriptiofaktorina STAT3 itse on myös mukana signalointireitissä, joka johtaa IL-10 säätelyn voimistamiseen (Arcuri ym. 2017).

IL-10 tehtävät eivät kuitenkaan rajoitu vain PD-L1:n säätelyyn, vaan se esimerkiksi inhiboi NF $\kappa$ B:n kanonisen muodon aktivointia (Kruse ym. 2014). Anti-inflammatorisena sytokiininä IL-10 myös polarisoi GAM:eja kohti M2-muotoa (Razavi ym. 2016).

### 3.1.6 NF $\kappa$ B

NF $\kappa$ B on transkriptiofaktori, joka säätelee immuunivastetta (Mieczkowski ym. 2015) osallistumalla sytokiini geenien ilmenemisen säätelyyn esimerkiksi vasteena proinflammatoriselle TNF $\alpha$ :lle (Cahill ym. 2016). Sillä on 5 erilaista alayksikköä: p50, p52, p65, RelB ja c-Rel (Cahill ym. 2016). MAPK-signaalintireitti osallistuu myös NF $\kappa$ B:n aktivaatioon (Kythreotou ym. 2018) ja näin ollen myös NF $\kappa$ B:n aktivaatitasot voivat muuttua, kun NF1 menetetään.

IL-10 inhiboi NFκB:n kanonista heterodimeeriä (p50/p65) ja mahdollistaa homodimeerin (p50/p50) yli-ilmentymisen (Kruse ym. 2014). Homodimeeri (p50/p50) edelleen estää proinflammatoristen sytokiinien transkription elongaation (Kruse ym. 2014). Näin ollen homodimeeri ajaa makrofageja M2-muotoon ja heterodimeerin (p65/p50) kerrotaan puolestaan johtavan makrofagien M1-muotoon (Kruse ym. 2014).



**Kuva 2.** NFκB:n kanoninen ja ei-kanoninen aktivointireitti mukailten (Oh & Ghosh 2013).

Kuvassa esitellään NFκB:n aktivointi kanonista ja ei-kanonista reittiä pitkin. p65, p50 ja toisinaan myös c-Rel-alayksiköistä muodostuva kanoninen muoto on inhiboitu IκB:n toimesta. Aktivoiva IKK-kompleksi, joka muodostuu IKKα-, IKKβ- ja NEMO-alayksiköistä ubiquitinoi IκB:n ja johdattaa sen hajotettavaksi proteosomiin. Vapautunut NFκB translokoituu tumaan ja säätelee transkriptiota. NFκB:n toiminta ei rajoitu sen kanoniseen muotoon, vaan sen muista alayksiköistä muodostuvat dimeerit ovat myös merkittäviä.

NFκB:n heterodimeerin (p65/p50) ilmentymistasojen onkin kerrottu olevan sekä matalampia (Mieczkowski ym. 2015) että koholla glioblastoomissa (Cahill ym. 2016, Yamini 2018). NFκB:n heterodimeerin matalaan aktivaatioon kerrotaan vaikuttavan IKKβ:a koodaavan IKBKB-geenin matala ilmentyminen (Mieczkowski ym. 2015). Kuten kuvassa 2 nähdään, IKKβ on osana kompleksia, joka

aktivoi NFκB:tä (Gray ym. 2014) fosforyloimalla NFκB-inhibiittorin (IκB) ja vapauttamalla NFκB-transkriptiotekijän (Oh & Ghosh 2013). NFκB kuljetetaan tumaan, missä p65-alayksiköllä on tärkeä rooli transkriptiossa (Yamini 2018). Mieczkowski ym. kertovat, että glioblastoomassa GAM:it eivät ilmennä yhtä paljon IκB-geeniä kuin matala-asteisissa glioomissa, mikä johtaisi glioblastoomissa matalampaan NFκB:n aktivointiin (Mieczkowski ym. 2015). Tämä ei olisi yllättävää ottaen huomioon sen, että NFκB aktivoituu kanonisesti vasteena proinflammatorisille signaaleille (Cahill ym. 2016). Immuunisuppressiivisessa ympäristössä olisikin oletettavaa, etteivät proinflammatoriset signaalit välittyisi eteenpäin. Kuitenkin yliaktiivinen Ras voi aktivoida NFκB:n p65:n kautta siten, että aktivaatio on klassisesta IKK-signaloinnista riippumaton (Cahill ym. 2016). Tämä onkin merkittävä huomio juuri siksi, että NF1:n menetys johtaa Ras:in yliaktiivisuuteen (Arcuri ym. 2017).

NFκB:n tasojen kerrotaan vaihtoehtoisesti olevan myös koholla (Cahill ym. 2016, Yamini 2018). Tämä on yllättävää ottaen huomioon NFκB:n roolin proinflammatoristen sytokiinien transkriptiossa. Vaikka NFκB osallistuu proinflammatoristen sytokiinigeenien luentaan, sillä on kuitenkin myös muita rooleja. NFκB on avainasemassa CD4-positiivisten T-solujen erilaistumisessa, joista suuressa roolissa ovat immuunivastetta hillitsevät Treg-solut (Oh & Ghosh 2013). Hiirillä IKKβ:n aktiivisuus mutaatio sai aikaan Treg-solujen tuotannon kateenkorvassa silloin, kun niitä ei normaalisti tuotettaisi (Oh & Ghosh 2013). Tämän lisäksi NFκB osallistuu myös PD-L1:n transkriptioon (Kythreotou ym. 2018). Tämä osoittaa, ettei NFκB ole vastuussa ainoastaan pro-inflammatorisesta vasteesta, vaan sillä on myös muunlaisia tehtäviä.

On hyvä huomioida, että esimerkiksi mesenkymaalisessa GBM-alatyypissä tärkeä NFκB ei kuitenkaan ole kanoninen p65/p50, vaan sellainen, joka sisältää alayksikön RelB (Cahill ym. 2016). Suuri osa kokeellisista tutkimuksista keskittyy kuitenkin p65-alayksikköön, sillä sitä on kokeellisesti helppo havainnoida, kuin esimerkiksi p52- tai RelB-alayksiköitä (Yamini 2018). Siksi onkin mahdollista, että NFκB:n muiden alayksiköiden rooli glioblastoomissa on suurempi kuin tällä hetkellä ymmärretään (Yamini 2018), ja tämä saattaisi selittää sen moninaisia vasteita.

Translokaatio tumaan on tärkein tapa NFκB:n säätelyyn, mutta säätelyssä on mukana myös muitakin tekijöitä (Yamini 2018). Näihin tekijöihin kuuluu muun muassa NFκB-dimeerin muodostamat alayksiköt, alayksiköiden post-translaationaaliset modifikaatiot sekä kussakin promoottorissa olevat muut transkriptiofaktorit (Yamini 2018). Näin ollen NFκB:n dimeerienkin toiminta on todennäköisesti monimuotoisempaa kuin tällä hetkellä ymmärretään. Lisäksi samalla signaalintimolekyylillä voi olla erilainen vaste eri solutyypissä. Yhdessä nämä tekijät saattavat selittää sen, miten NFκB ja sen ylävirran proteiinit, kuten IKKβ, voivat samaan aikaan toimia proinflammatoristen signaalien reiteillä sekä osallistua immuunisuppressiivisten Treg-solujen aktivaatioon.

## 4. YHTEENVETO

Glioblastooman immuunisuppressionin eri osa-alueista voidaan erottaa tarkasteluun kaksi osaa: T-solujen toiminnan muokkaus ja GAM:ien M2-polarisaatio. Nämä prosessit eivät kuitenkaan ole täysin erillisiä toisistaan. Esimerkiksi GAM:it kantavat Fas-ligandia, voiden näin aiheuttaa apoptoosin Fas-reseptoria kantavissa T-soluissa (Roesch ym. 2018).

Glioblastooman immuunisuppressioon vaikuttaa useita tärkeitä signaalintireittejä ja tässä työssä on esitelty niistä vain muutama merkittävin. Signaalintimolekyyleistä kaikki ei ilmene GAM:eissa, kuten esimerkiksi mahdollisesti menetettävä NF1. Näin ollen on tärkeää ymmärtää kunkin signaalintimolekyylin aktiivisuus ja rooli GAM:ien ja glioblastooman solujen signaloinnissa. Samalla signaalintimolekyylillä voi olla erilainen vaste eri solutyypille. Siksi on olennaista, että glioblastooman immuunisuppressiota tutkiessa selvitetään merkittävien signaalintimolekyyliden vasteiden ero GAM:eissa ja glioblastooman soluissa.

Signaalintimolekyylit ovat toisiinsa vahvasti linkittyneitä, sillä kuten esimerkiksi tekstissä käsiteltiin, STAT3 aktivoi IL-10:ä ja yhdessä nämä kaksi aktivoivat PD-L1:n ilmentymistä. Näin ollen signaalintimolekyyliden tehtäviin voi kuulua muiden signaalintimolekyyliden säätely.

STAT3 on anti-inflammatorinen transkriptiofaktori ja näin ollen polarisoi GAM:eja M2-muotoon. STAT3 on aktivoitunut yli 66% glioblastoomista (Chang ym. 2017) ja se osallistuu IL-10 tuotantoon sekä GAM:eissa että GBM-soluissa. IL-10 on anti-inflammatorinen sytokiini ja siksi ajaa M2-polarisointia GAM:eissa. Tämä tapahtuu esimerkiksi siten, että IL-10 inhiboi NFκB:n kanonisen muodon aktivoitumista, joka puolestaan johtaa M2-muotoa ajavan homodimeerin yleistymiseen. Yhdessä STAT3:n kanssa IL-10 johtaa PD-L1 ilmentymisen nousuun sekä GAM:eissa että GBM-soluissa.

PD-L1 heikentää T-solujen normaalia toimintaa ja proliferaatiota. Sen rooli glioblastoomassa ei kuitenkaan ole välttämättä yhtä suuri kuin muissa syövässä siksi, että glioblastoomassa T-solujen määrä on matala.

NFκB puolestaan voi toimia monilla eri tavoilla ja saada aikaan vastakkaisiakin immunologisia vasteita. NFκB esimerkiksi osallistuu proinflammatoristen geenien luentaan, mutta samalla myös PD-L1:n geenin luentaan. PD-L1 ilmentyy sekä GAM:eissa että GBM-soluissa, joten tästä voidaan päätellä että NFκB on aktiivinen molemmissa solutyypeissä. Lisäksi NFκB osallistuu Treg:ien erilaistumiseen ja NFκB:n homodimeeri osallistuu M2-polarisaatioon. NFκB saattaa toimia laajemmassa tehtäväkirjossa, kuin ymmärretään, mutta niiden kartoittamista on hidastanut kokeellisen tutkimuksen keskittyminen p65-alayksikköön.

Verrattuna IDH-villityyppiin, IDH-mutantit kasvaimet eivät ole immunologisesti yhtä aktiivisia. Tämä johtuu IDH-mutaation DNA:n metylaatiota edistävästä sekä proinflammatorista mikroympäristöä ajavista vaikutuksista.

STAT3 vaikuttaa keskeisen roolinsa vuoksi houkuttelevalla kohteella terapeuttisiin sovelluksiin. Sen inhibiittoreita on markkinoilla vähän, mutta eräs niistä on vaikuttanut eläinkokeissa lupaavalta glioblastooman hoidossa (Li ym. 2019).

Signaloinnin yhteisvaikutuksen ymmärtäminen olisi glioblastooman tutkimuksen kannalta tärkeä asia. Erityisen tärkeää olisi ymmärtää konkreettisemmalla tasolla signaloinnin vaikutus GAM:eihin ja glioblastooman soluihin. Näin olisi mahdollista hyödyntää terapeuttisissa sovelluksissa kombinatorisia hoitoja, jotka kohdennetaan juuri oikeisiin signaalintireitteihin.

## 5. LÄHTEET

- Arcuri C., Fioretti B., Bianchi R., Mecca C., Tubaro C., Beccari T., Franciolini F., Giambanco I. & Donato R. (2017) Microglia-glioma cross-talk a two way approach to new strategies against glioma. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)* **22**(2), 268-309.
- Cahill K.E., Morshed R.A. & Yamini B. (2016) Nuclear factor- $\kappa$ B in glioblastoma: insights into regulators and targeted therapy. *Neuro-Oncology* **18**(3), 329-339.
- Chang N., Ahn S.H., Kong D., Lee H.W. & Nam D. (2017) The role of STAT3 in glioblastoma progression through dual influences on tumor cells and the immune microenvironment. *Molecular and Cellular Endocrinology* **451**, 53-65.
- Gabusiewicz K., Li X., Wei J., Hashimoto Y., Marisetty A.L., Ott M., Wang F., Hawke D., Yu J., Healy L.M., Hossain A., Akers J.C., Maiti S.N., Yamashita S., Shimizu Y., Dunner K., Zal M.A., Burks J.K., Gumin J., Nwajei F., Rezavanian A., Zhou S., Rao G., Sawaya R., Fuller G.N., Huse J.T., Antel J.P., Li S., Cooper L., Sulman E.P., Chen C., Geula C., Kalluri R., Zal T. & Heimberger A.B. (2018) Glioblastoma stem cell-derived exosomes induce M2 macrophages and PD-L1 expression on human monocytes. *Oncot Immunology* **7**(4), e1412909.
- Ghirelli C. & Hagemann T. (2013) Targeting immunosuppression for cancer therapy. *The Journal of Clinical Investigation* **123**(6), 2355-2357.



- Gray G.K., McFarland B.C., Nozell S.E. & Benveniste E.N. (2014) NF- $\kappa$ B and STAT3 in glioblastoma: therapeutic targets coming of age. *Expert Review of Neurotherapeutics* **14**(11), 1293-1306.
- Kruse C., Liao L., Prins R., Antonios J., Ha E., Kasahara N., Soto H. & Yang I. (2014) Chronic inflammation drives glioma growth: cellular and molecular factors responsible for an immunosuppressive microenvironment. *Neuroimmunology and Neuroinflammation* **1**(2), 66.
- Kythreotou A., Siddique A., Mauri F.A., Bower M. & Pinato D.J. (2018) PD-L1. *Journal of Clinical Pathology* **71**(3), 189-194.
- Li Z., Zhu T., Xu Y., Wu C., Chen J., Ren Y., Kong L., Sun S., Guo W., Wang Y., Jing C., Dong J., Zhou J., Zhang L., Shen Q. & Zhou X. (2019) A novel STAT3 inhibitor, HJC0152, exerts potent antitumor activity in glioblastoma. *American Journal of Cancer Research* **9**(4), 699-713.
- Locarno C.V., Simonelli M., Carezza C., Capucetti A., Stanzani E., Lorenzi E., Persico P., Della Bella S., Passoni L., Mavilio D., Bonecchi R., Locati M. & Savino B. (2019) Role of myeloid cells in the immunosuppressive microenvironment in gliomas. *Immunobiology* .
- Louis D., Perry A., Reifenberger G., von Deimling A., Figarella-Branger D., Cavenee W., Ohgaki H., Wiestler O., Kleihues P. & Ellison D. (2016) The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica* **131**(6), 803-820.
- Luoto S., Hermelo I., Vuorinen E.M., Hannus P., Kesseli J., Nykter M. & Granberg K.J. (2018) Computational Characterization of Suppressive Immune Microenvironments in Glioblastoma. *Cancer Research* **78**(19), 5574-5585.
- Luwor R.B., Stylli S.S. & Kaye A.H. (2013) The role of Stat3 in glioblastoma multiforme. *Journal of Clinical Neuroscience* **20**(7), 907-911.
- Mieczkowski J., Kocyk M., Nauman P., Gabrusiewicz K., Sielska M., Przanowski P., Maleszewska M., Rajan W.D., Pszczolkowska D., Tykocki T., Grajkowska W., Kotulska K., Roszkowski M., Kostkiewicz B. & Kaminska B. (2015) Down-regulation of IKK $\beta$  expression in glioma-infiltrating microglia/macrophages is associated with defective inflammatory/immune gene responses in glioblastoma. *Oncotarget* **6**(32), 33077-33090.

- Morisse M.C., Jouannet S., Dominguez-Villar M., Sanson M. & Idbaih A. (2018) Interactions between tumor-associated macrophages and tumor cells in glioblastoma: unraveling promising targeted therapies. *Expert Review of Neurotherapeutics* **18**(9), 729-737.
- Mu L., Long Y., Yang C., Jin L., Tao H., Ge H., Chang Y.E., Karachi A., Kubilis P.S., Leon G., Qi J., Sayour E.J., Mitchell D.A., Lin Z. & Huang J. (2018) The IDH1 Mutation-Induced Oncometabolite, 2-Hydroxyglutarate, May Affect DNA Methylation and Expression of PD-L1 in Gliomas. *Frontiers in Molecular Neuroscience* **11**.
- Oh H. & Ghosh S. (2013) NF- $\kappa$ B: roles and regulation in different CD4<sup>+</sup> T-cell subsets. *Immunological Reviews* **252**(1), 41-51.
- Razavi S., Lee K.E., Jin B.E., Aujla P.S., Gholamin S. & Li G. (2016) Immune Evasion Strategies of Glioblastoma. *Frontiers in Surgery* **3**, 11.
- Roesch S., Rapp C., Dettling S. & Herold-Mende C. (2018) When Immune Cells Turn Bad—Tumor-Associated Microglia/Macrophages in Glioma. *International Journal of Molecular Sciences* **19**(2), 436.
- Wang Q., Hu B., Hu X., Kim H., Squatrito M., Scarpace L., deCarvalho A.C., Lyu S., Li P., Li Y., Barthel F., Cho H.J., Lin Y., Satani N., Martinez-Ledesma E., Zheng S., Chang E., Sauv e C.G., Olar A., Lan Z.D., Finocchiaro G., Phillips J.J., Berger M.S., Gabrusiewicz K.R., Wang G., Eskilsson E., Hu J., Mikkelsen T., DePinho R.A., Muller F., Heimberger A.B., Sulman E.P., Nam D. & Verhaak R.G.W. (2017) Tumor evolution of glioma intrinsic gene expression subtype associates with immunological changes in the microenvironment. *Cancer Cell* **32**(1), 42-56.e6.
- Yamini B. (2018) NF- $\kappa$ B, Mesenchymal Differentiation and Glioblastoma. *Cells* **7**(9), 125.