

Mariusz Stram¹, Jacek Tabarkiewicz¹,
Paweł Rybojad², Mariusz Kędra²,
Marek Sawicki², Jacek Roliński¹

¹ Katedra i Zakład Immunologii
Klinicznej Uniwersytetu Medycznego
w Lublinie
Kierownik: prof. dr hab. n. med.
Jacek Roliński

² Katedra i Klinika Chirurgii Klatki
Piersiowej Uniwersytetu Medycznego
w Lublinie
P. O. kierownika: dr n. med.
Marek Sawicki

Address for correspondence/
Adres do korespondencji:
lek. med. Mariusz Stram,
Katedra i Zakład Immunologii
Klinicznej Uniwersytetu Medycznego
w Lublinie,
ul. Jaczewskiego 8, 20-095 Lublin
Tel: +48 81 718 73 15;
Fax: +48 81 718 73 15;
e-mail: mariuszstram@op.pl

Received: 17.08.2009
Accepted: 13.09.2009
Published: 10.11.2009

Expression of CD74 on the lymphocytes from peripheral blood, lymph nodes and tumor tissue of patients with NSCLC

Ekspresja CD74 na limfocytach krwi obwodowej, węzłów chłonnych, naciekających guz u pacjentów chorych na NDRP

Original article/Artykuł oryginalny

Summary

Introduction. MIF (macrophage migration inhibitory factor) is the cytokine overexpressed in lung cancer and interaction between MIF and its receptor could be associated with angiogenic activity. The MIF receptor (CD74) was recently discovered and found to be the invariant chain of the HLA class II molecule. Moreover, it has recently been shown to have a role as an accessory-signaling molecule and has been implicated in malignant B-cell proliferation, survival and as target for immunotherapy.

The aim of the study. The aim of our study was to determine expression of CD74 in B-cell isolated from tissues of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC).

Material and methods. Mononuclear leukocytes were isolated from peripheral blood (PB), lymph nodes (LN) and cancer tissue (CT). Additionally results from PB were compared to results from blood of healthy donors (HD).

Results. We found that CD19+/CD74+ lymphocytes are accumulated in the tissues directly involved in cancer process: LN and CT, when compared to PB. We also found that percentage of CD19+/CD74+ cells was significantly higher in PB of NSCLC patients than in HD.

Conclusions. Our results stay in accordance with reports describing involve of CD74 in cancerogenesis and could suggest that infiltration with CD74+ B cells could be phenomenon included in cancer "immunescape". Our results stay in accordance with publications describing negative role of B lymphocytes in anti-cancer immune response.

Key words: CD74, MIF, non-small cell lung cancer

Streszczenie

Wstęp. MIF (czynnik hamujący migrację makrofagów) jest cytokiną, której nadmierną ekspresję opisano m.in. w raku płuca i której interakcja z odpowiednim receptorem może być związana z działaniem angiogennym. Receptor dla MIF (CD74) jest niezmiennym łańcuchem cząsteczki HLA klasy II. Ponadto opisano jego rolę jako dodatkowej cząsteczki sygnałowej związanej z nowotworową proliferacją limfocytów B, ich przeżyciem oraz znaczenie, jakie może odgrywać jako cel przyszłej immunoterapii.

Cel pracy. Celem naszej pracy było określenie ekspresji CD74 na limfocytach B izolowanych z tkanek pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuc (NDRP).

Material i metody. Komórki jednojądrzaste były izolowane z krwi obwodowej (KO), węzłów chłonnych (WCH) i tkanki nowotworowej (TN). Dodatkowo wyniki z krwi obwodowej były porównywane z wynikami z krwi zdrowych dawców (ZD).

Wyniki. Stwierdziliśmy akumulację limfocytów o fenotypie CD19+/CD74+ w tkankach bezpośrednio związanych z procesem nowotworowym: WCH i TN w porównaniu z KO. Stwierdziliśmy również, że procentowy udział komórek o fenotypie CD19+/CD74+ był znacząco wyższy w KO pacjentów niż zdrowych dawców.

Wnioski. Nasze wyniki pozostają zgodne z doniesieniami opisującymi wpływ CD74 na proces kancerogenezy oraz mogą sugerować, iż limfocyty B CD74+ mogą być czynnikiem wpływającym na ucieczkę nowotworu przed odpowiedzią immunologiczną. Nasze wyniki pozostają zgodne z publikacjami opisującymi niekorzystną rolę limfocytów B w przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej.

Słowa kluczowe: CD74, MIF, niedrobnokomórkowy rak płuca

STATISTIC STATYSTYKA

Word count Liczba słów	1638/1435
Tables Tabele	1
Figures Ryciny	2
References Piśmiennictwo	23

INTRODUCTION

Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is a proinflammatory cytokine which is overexpressed in many types of cancer, inter alia, lung cancer, colon cancer, prostate cancer. Moreover, interaction between MIF and an appropriate receptor may be involved in cancerogenesis [1]. Through up-regulation of CXC-type chemokines MIF is able to stimulate tumor angiogenesis that is one of the major factors responsible for tumor development. MIF overexpression in oncologic patients may be connected with worse prognosis and shorter survival time [2, 3]. MIF activity involves the influence on cancer cells survival by cell division initiation, pathologic angiogenesis as well as immune response inhibition [4]. In addition, MIF inhibits the activity of suppressive protein – p53 – and therefore promotes cancer cells growth and inhibits cancer cells apoptosis [5].

CD74 serves as a MIF receptor. It is a type II glycoprotein related to α and β -chains of HLA-DR (MHC class II). It is composed of a short, 30-aminoacid, cytoplasmatic part and a transmembrane region (31 to 55-aminoacid) bound to a 160-aminoacid extracellular domain [6, 7]. CD74 is moderately expressed on B cells; while its expression on monocytes, macrophages, dendritic cells and activated T cells is lower [8]. Apart from CD74 presence on normal B cells, overexpression of this molecule was found in various types of tumors, including sarcomas [9, 10]. It is suggested that CD74 may play a role in antigen processing and presentation. CD74-HLA-DR complex binds antigen peptides and transports them into the cell surface to present the antigen to CD4+ T cell [10, 11]. In addition to CD74 role in antigen transport, the molecule is involved in B cell maturation by activation and transcription of NF- κ B. NF- κ B activation depends on the cytoplasmatic region of CD74, which is transported to the nucleus [12]. This process induces progression of B cells to S-phase of the cell cycle, initiates DNA synthesis, cell division and Bcl-2 family antiapoptotic proteins overexpression [13, 14]. The described observations suggest that CD74 is a receptor responsible for cell survival processes [15]. Binsky et al. showed that MIF-induced activation of CD74 initiates signaling pathway activation that results in e.g. interleukin-8 (IL-8) secretion. IL-8 influence B cell survival by regulation of Bcl-2 family of proteins [14]. Low percentage of CD74 is connected to chondroitin sulphate (CD74-CS) and present on the antigen presenting cells surface, including both B cells and macrophages. CD74 blocking antibodies assays showed the interactions between CD74-CS and CD44, which activates Src-dependent signaling pathway [16]. CD44 is a glycoprotein that plays an important role in cell-cell interactions, cell adhesion and T cell activation. Recently, CD44 was described as an integral part of CD74 receptor complex [17]. Although CD74 as a single molecule is able to bind MIF, CD44 is needed for further signal transduction [18]. McClelland et al. showed that CD74 expression as well as MIF level

WSTĘP

Czynnik hamujący migrację makrofagów (MIF) jest prozapalną cytokiną, której zwiększoną ekspresję wykazano w wielu nowotworach m.in.: w raku płuc, jelita grubego, prostaty i której interakcja z odpowiednim receptorem może być związana z procesem nowotworzenia [1]. Poprzez indukcję ekspresji chemokin typu CXC, MIF może pobudzać angiogenezę nowotworową, będąc jednym z głównych czynników wpływających na rozwój nowotworu. Zwiększona ekspresja MIF u pacjentów chorych na raka płuca może być związana z gorszym rokowaniem i krótszym czasem przeżycia [2, 3]. Funkcja MIF wiąże się z wpływem na przeżycie komórek nowotworowych poprzez inicjowanie podziałów komórkowych, patologiczną angiogenezą oraz tłumieniem odpowiedzi immunologicznej [4]. Ponadto MIF hamuje aktywność supresyjnego białka p53, co sprzyja wzrostowi komórek guza oraz hamuje ich apoptozę [5].

Receptorem dla MIF jest CD74, glikoproteina typu II związana z łańcuchami α i β HLA-DR (MHC klasy II), składająca się z krótkiego 30 aminokwasowego odcinka cytoplazmatycznego i 31 do 55 aminokwasowego regionu przezbłonowego, połączonego z 160 aminokwasową domeną zewnątrzcytoplazmatyczną [6, 7]. Umiarkowaną ekspresją CD74 cechują się limfocyty B, słabszą monocyty, makrofagi, komórki dendrytyczne i aktywne limfocyty T [8]. Oprócz obecności na prawidłowych limfocytach B, wykazano zwiększoną ekspresję CD74 na limfocytach B w wielu typach nowotworów m.in.: w mięsakiach [9, 10]. Postulowana jest rola CD74 w procesie przetwarzania i prezentacji antygeny. Kompleks CD74-HLA-DR wiąże peptydy antygenowe i transportuje je na powierzchnię komórki, celem prezentacji antygenów limfocytom T CD4+ [10, 11]. Oprócz roli, jaką odgrywa w transporcie antygenów, CD74 jest związany z dojrzewaniem limfocytów B przez aktywację i transkrypcję czynnika jądrowego NF- κ B. Aktywacja NF- κ B odbywa się przy udziale regionu cytoplazmatycznego CD74, który jest transportowany do jądra komórki [12]. Umożliwia to wejście limfocytów B w fazę S cyklu komórkowego, syntezę DNA, podział komórki i zwiększenie ekspresji antyapoptotycznych białek rodziny Bcl-2 [13, 14]. Te obserwacje mogą wskazywać na funkcję CD74 jako receptora związanego z przeżyciem komórki [15]. Binsky i wsp. wykazali, iż aktywacja CD74 za pomocą MIF, inicjuje kaskadę sygnałów, której rezultatem jest m.in. sekrecja IL-8 (interleukina-8). IL-8 wpływa na przeżycie limfocytów B poprzez regulację ekspresji białek rodziny Bcl-2 [14]. Niewielki odsetek CD74 występuje w połączeniu z siarczanem chondroityny (CD74-CS) na powierzchni komórek prezentujących antygen, włączając zarówno limfocyty B jak i makrofagi. Badania z wykorzystaniem przeciwciał blokujących CD74 wykazały interakcję CD74-CS z CD44, który to aktywuje szlak kinaz Src zależnych [16]. CD44 jest glikoproteina mającą dość duże znaczenie w interakcjach międzykomórkowych, adhezji komórek oraz wpływającą na aktywację limfocytów T. Ostatnio opisano rolę

is related to increased level of CXC-type chemokines, and therefore better tumor vascularization [19].

Lung cancer is one of the most common types of cancer in the world. High mortality and unsatisfactory treatment results make this tumor type a major social problem. The interactions between lung cancer cells and immune system still remain unexplained. The aim of this study was to assess CD74 antigen expression on B cells in the tissues obtained from patients with non-small cell lung cancer (NSCLC).

MATERIALS AND METHODS

11 men with NSCLC (8 cases of squamous cell carcinoma and 3 cases of adenocarcinoma) surgically treated in Thorax Surgery Clinic, Medical University of Lublin, were enrolled to the study. The patients did not receive nor neoadjuvant chemotherapy or drugs influencing immune system. The trial protocol was approved by Institutional Review Board of Medical University of Lublin. All the patients gave written, informed consent.

The blood samples were drawn from basilic vein of NSCLC patients on the day of surgery. The samples were collected in natrium heparin-containing tubes (Sarstedt, Germany) (20 units per 1 ml of blood). During tumor resection a draining lymph node as well as a tumor sample were collected and preserved in physiological saline solution (Baxter, Poland). The obtained tissues as well as blood samples were examined immediately after sampling. Peripheral blood obtained from 10 healthy donors served as control. Peripheral blood was diluted 1:1 with buffered physiological saline solution – PBS without Ca^{2+} and Mg^{2+} ions (Biochrome AG, Germany) and next layered onto Gradisol L (Aqua Medica, Poland) and centrifugated (700 g for 20 minutes). The obtained mononuclear cells fraction was washed twice in PBS (centrifugation 5 minutes, 700 g). After washing the cells were suspended in 1 ml of PBS without Ca^{2+} and Mg^{2+} ions and counted in Neubauer chamber. The lymph nodes and tumor tissue were fragmented using surgical lancet, suspended in PBS without Ca^{2+} and Mg^{2+} ions and homogenized using Medimachine device (Dako, Denmark). The obtained cell suspension was layered onto Gradisol L and centrifugated (700 g for 20 minutes). After centrifugation, the number of isolated cells was assessed using Neubauer chamber.

CD44 jako integralnej składowej kompleksu receptora CD74 [17]. Podczas, gdy receptor CD74 może „samotnie” związać MIF, CD44 jest niezbędny celem dalszego przetworzenia sygnału pochodzącego od MIF [18]. McClelland i wsp. wykazali, iż ekspresja CD74 jak i poziom MIF wiąże się z wyższym poziomem chemokin typu CXC, a tym samym z lepszym unaczynieniem guza nowotworowego [19].

Rak płuca jest jednym z najczęściej występujących nowotworów na świecie. Wysoka śmiertelność i ciągle niezadowalające efekty klasycznych metod leczenia czyni zeń poważny problem społeczny. Interakcje pomiędzy komórkami raka płuca a układem immunologicznym pozostają niewyjaśnione. Celem niniejszej pracy było zbadanie ekspresji antygenu CD74 na limfocytach B w tkankach pacjentów chorych na niedrobnokomórkowego raka płuc.

MATERIAŁ I METODY

Do badania włączono 11 mężczyzn leczonych operacyjnie z powodu NDRP w Klinice Chirurgii Klatki Piersiowej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie (8 przypadków raka płaskonabłonkowego i 3 przypadki raka gruczołowego). Pacjenci nie otrzymywali chemioterapii przedoperacyjnej, ani leków wpływających na układ immunologiczny. Protokół badawczy został zaakceptowany przez Uczelnianą Komisję Bioetyczną, a pacjenci wyrazili pisemną zgodę.

Krew z żyły odłokciowej pobierano od chorych na NDRPw dniu zabiegu operacyjnego, do próbek zawierających heparynę sodową (Sarstedt, Niemcy) w ilości 20 j/ml krwi. Drenujący węzeł chłonny oraz wycinek guza były pobierane w trakcie resekcji guza i umieszczone w roztworze soli fizjologicznej (Baxter, Polska). Pozyskane tkanki jak i krew opracowywano natychmiast po pobraniu materiału. Materiał kontrolny dla krwi pacjentów stanowiła krew obwodowa 10 zdrowych dawców. Krew obwodową rozcieńczano w stosunku 1:1 zbuforowanym roztworem soli fizjologicznej – PBS bez jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} (Biochrome AG, Niemcy), nawarstwiano na Gradisol L (Aqua Medica, Polska) i wirowano 20 minut w gradiencie gęstości przy przyśpieszeniu 700xg. Uzyskaną frakcję komórek mononuklearnych dwukrotnie płukano w PBS bez jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} przez 5 minut przy przyśpieszeniu 700xg. Po zakończeniu płukania komórki zawieszane były w 1 ml PBS bez jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} i liczone w komorze Neubauera. Węzły chłonne i tkanka nowotworowa były rozdrabniane przy pomocy skalpela chirurgicznego, zawieszane w PBS bez Ca^{2+} i Mg^{2+} , a następnie poddawane homogenizacji przy pomocy urządzenia Medimachine (Dako, Dania). Uzyskana zawiesina komórek była nawarstwiana na Gradisol L i wirowana 20 minut w gradiencie gęstości przy przyśpieszeniu 700xg. Następnie w komorze Neubauera oceniano liczbę wyizolowanych komórek.

Do oznaczenia ekspresji antygenu CD74 na limfocytach B zostały użyte przeciwciała monoklonalne:

To assess CD74 antigen expression of B cells the following monoclonal antibodies were used:

- anti-CD74 FITC (IgG_{2a} isotype) (BD Pharmingen, USA)
- anti-CD19 PE (IgG₁ isotype) (BD Pharmingen, USA)

The cells were labeled with the monoclonal antibodies set described above by addition of 10 μ l of antibody per each 1×10^6 of examined cells. After 20 minutes of incubation in 22°C in dark, the cells were washed with PBS without Ca²⁺ and Mg²⁺ ions (for 5 minutes, 700 g). Next, the supernatant was decanted while the remaining cells were analyzed in a flow cytometer.

- anti-CD74 FITC (izotyp IgG_{2a}) (BD Pharmingen, USA)
- anti-CD19 PE (izotyp IgG₁) (BD Pharmingen, USA)

Komórki znakowano wymienionym zestawem przeciwciał monoklonalnych dodając 10 μ l przeciwciał na każde 1×10^6 badanych komórek. Po inkubacji trwającej 20 min. w 22°C w ciemności, komórki płukano w PBS bez jonów Ca²⁺ i Mg²⁺ przez 5 min. przy obrotach 700xg. Następnie zlewano supernatant, a pozostałe komórki poddawano analizie w cytometrze przepływowym.

Fig. 1. The content of CD19+/CD74+ cells in NSCLC patients tissues

Ryc. 1. Rozkład komórek CD19+/CD74+ w tkankach pacjentów chorych na NDRP

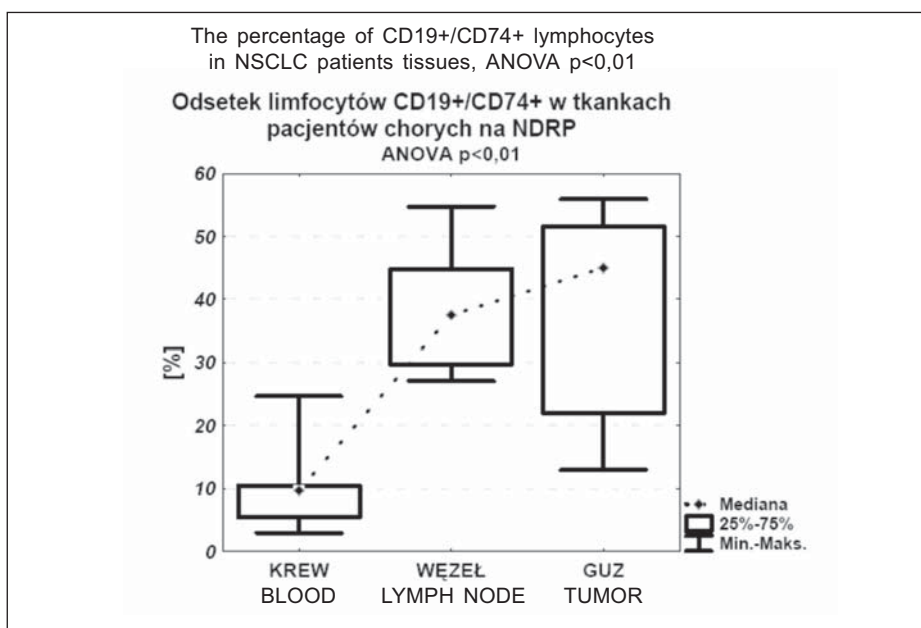
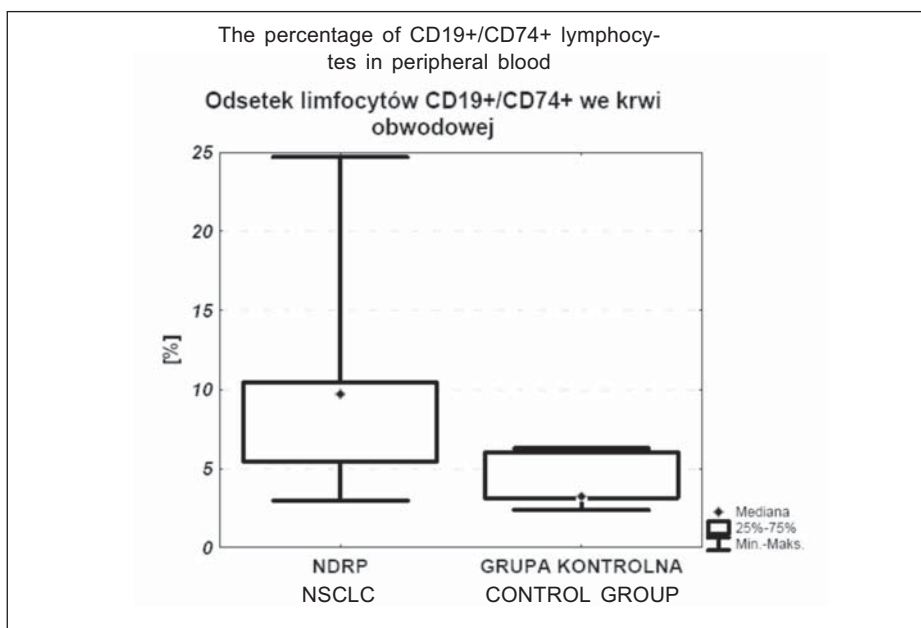


Fig. 2. The comparison of CD19+/CD74+ lymphocytes content in peripheral blood obtained from NSCLC patients and health donors.

Ryc. 2. Porównanie odsetka limfocytów CD19+/CD74+ krwi obwodowej pacjentów z NDRP i zdrowych dawców



The immunophenotyping of the isolated cells was performed using FACSCalibur cytometer (Becton Dickinson, USA), equipped with argon laser 488 nm. The flow cytometry results analysis was performed using CellQuest software (Becton Dickinson, USA), while the statistical analysis of the obtained results was carried out using Statistica 7.0 PL software.

RESULTS

We have demonstrated that in the tissues directly affected by neoplastic process, that is lymph node tissue and cancer tissue, the percentage of CD19+/CD74+ lymphocytes were significantly higher (37,5%, IQR=15 and 45%, IQR=29,5 respectively) in comparison to peripheral blood samples (9,7%, IQR=5,0) (Figure 1).

In addition to that, we stated that the percentage of CD19+/CD74+ cells was significantly higher in peripheral blood samples obtained from patients with NSCLC in comparison to peripheral blood samples obtained from healthy donors (3,2%, IQR=2,9) (Figure 2).

The statistical analysis results are showed in Table 1.

DISCUSSION

CD74 (invariant chain) is a transmembrane glycoprotein type II, connected to α and β -chains of HLA-DR. It is involved in the transport of CD74-HLA-DR complex to the endosomes and lysosomes, and next in the transport of peptides onto the cell surface. CD74-HLA-DR complex may suppress the immune response that may result in faster cancer progression [8]. CD74 expression was showed not only on antigen presenting cells surface but also on many cancer cells, e.g. gastric cancer and kidney cancer. Moreover, in limited range CD74 antigen is present in the healthy tissues [20, 21, 22].

Meyer-Siegler et al. proved, that blockade of MIF-CD74 interaction, or down-expression of MIF and/or CD74, decrease cell proliferation rate, increase the incidence of apoptosis and therefore can be a potential factor inhibiting prostate cancer invasion [1]. Young et al. demonstrated increased expression of CD74 on kidney cancer cells. In addition to that, they described a positive correlation between CD74 expression level and tu-

Ocena immunofenotypu wyizolowanych komórek przeprowadzana była przy pomocy cytometru przepływowego FACSCalibur (Becton Dickinson, USA) wyposażonego w laser argonowy 488 nm, analizę wykonano przy pomocy programu CellQuest (Becton Dickinson, USA), natomiast statystyczne opracowanie otrzymanych wyników przeprowadzano przy pomocy programu Statistica 7.0 PL.

WYNIKI

Wykazaliśmy istotnie wyższy odsetek limfocytów o fenotypie CD19+/CD74+ w tkankach bezpośrednio zajętych przez proces nowotworowy WCH (37,5%, IQR=15) i TN (45%, IQR=29,5) w porównaniu do KO (9,7%, IQR=5,0) (Ryc. 1).

Stwierdziłmy również, że procentowy udział komórek o fenotypie CD19+/CD74+ był znacząco wyższy w KO u pacjentów z NDRP, niż u ZD (3,2%, IQR=2,9) (Ryc. 2).

Wyniki analizy statystycznej przedstawia tabela 1.

DYSKUSJA

CD74 (niezmienny łańcuch) jest przezbłonową glikoproteiną typu II, związaną z łańcuchami α i β HLA-DR i biorącą udział w transporcie kompleksów CD74-HLA-DR do endosomów i lizosomów, a później peptydów na powierzchnię komórki. Kompleks CD74-HLA-DR może wywierać supresyjny efekt na odpowiedź immunologiczną, czego skutkiem może być szybsza progresja nowotworu [8]. CD74 jest antygenem, którego ekspresję oprócz powierzchni komórek prezentujących antygen, wykazano na wielu komórkach nowotworowych m.in.: raka żołądka, nerki i który w ograniczonym zakresie występuje na powierzchni zdrowych tkanek [20, 21, 22].

Meyer-Siegler i wsp. udowodnili, iż zablokowanie interakcji MIF-CD74, czy też obniżenie ekspresji MIF i/lub CD74, zmniejsza proliferację komórek, zwiększa apoptozę i może być potencjalnym czynnikiem hamującym inwazję nowotworu prostaty [1]. Young i wsp wykazali zwiększoną ekspresję CD74 na komórkach raka nerki. Ponadto opisali dodatnią korelację między ekspresją CD74, a stopniem nacieku guza przez limfocyty, co

Tab. 1. The detailed results of statistical analysis

The comparison of examined tissues obtained from NSCLC patients (ANOVA analysis)	p<0,01
The detailed comparison of examined tissues (Wilcoxon test)	blood and lymph node –p<0.01 blood and tumor tissue – p<0.05 lymph node and tumor tissue – not significant
The comparison between CD74+ cells content in peripheral blood obtained from health donors and NSCLC patients (Mann-Whitney U-test)	p<0,05

Tab. 1. Szczegółowe wyniki analizy statystycznej

Porównanie badanych tkanek u chorych na NDRP (test ANOVA)	p<0,01
Szczegółowe porównanie badanych tkanek (test Wilcoxon)	krw i węzeł chłonny – p<0,01 krw i tkanka guza – p<0,05 węzeł chłonny i tkanka guza – brak istotności
Porównanie pomiędzy odsetkami we krwi obwodowej zdrowych dawców i chorych na NDRP (test U Manna-Whitney'a)	p<0,05

mor infiltration by lymphocytes. These findings highlight the importance of CD74 for future immunotherapy approaches [21]. Ishigami et al. examined invariant chain expression in gastric cancer cells and assessed its relation to tumor invasion depth and clinical staging of the tumor. The researchers confirmed the positive correlation between CD74 expression and tumor invasion depth and clinical staging. In addition to that, they demonstrated a negative correlation between CD74 expression level and overall survival rate of patients with gastric cancer [20]. The results of CD74 expression assessment in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) was published by Nagata et al. The authors examined a correlation between CD74 expression level in tumor tissue and tumor invasiveness rate or patient's survival rate. The negative correlation between survival rate and CD74 expression and the positive correlation between CD74 expression and invasiveness rate of PDAC (according to TNM classification) were found. Nagata et al. showed that CD74 might be an independent prognostic factor in patients with PDAC [23].

In the present study we assessed CD74 expression in blood, lymph nodes and cancer tissue obtained from patients with NSCLC, as well as CD74 expression rate in blood samples obtained from healthy donors. The increased accumulation of CD74-expressing B cells in the tissues directly affected by cancer process such as lymph nodes and tumor tissue in comparison to peripheral blood as well as increased percentage of these cells in peripheral blood samples of cancer patients in comparison to blood samples obtained from healthy donors, may confirm the results of previous studies suggesting CD74 role in cancerogenesis. Additionally, the results of our study suggest that CD74-expressing B cells may be a factor influencing tumor escape from immune response. The present results are consistent with other studies describing adverse activity of B cells in tumor immune response.

CONCLUSIONS

CD74-expressing B cells were found in all examined tissue samples. In the samples directly affected by the cancer process (lymph nodes draining the tumor area, tumor tissue) significantly higher percentage of CD19+/CD74+ lymphocytes was found. In the peripheral blood obtained from patients with NSCLC the percentage of CD74-expressing lymphocytes was significantly higher in comparison to the healthy population.

The role of CD74 antigen as an additional signal molecule involved in neoplastic proliferation of B cells and their survival can be a key target for future immunotherapeutic approaches. Additionally, increased expression of CD74 in many types of cancer suggest, that the assessment of its expression may become quite important prognostic factor while the correlation between CD74-positive cells percentage with tumor staging may be a useful marker of the disease progression [8].

potwierdza znaczącą rolę, jaką może odegrać CD74 w przyszłej immunoterapii [21]. Ishigami i wsp. badali ekspresję niezmiennego łańcucha na komórkach raka żołądka i oceniali jej związek w powiązaniu z głębokością nacieku i stopniem klinicznego zaawansowania nowotworu. Potwierdzili dodatnią korelację między ekspresją CD74, a głębokością inwazji i stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu. Ponadto wykazali również ujemną korelację między poziomem ekspresji CD74, a czasem przeżycia chorych z rakiem żołądka [20]. Ocena ekspresji CD74 u chorych z gruczolakorakiem przewodowym trzustki (pancreatic ductal adenocarcinoma-PDAC) była przedmiotem pracy Nagaty i wsp. Autorzy badali korelację między poziomem ekspresji CD74 w tkance nowotworowej, a stopniem inwazyjności nowotworu i czasem przeżycia chorych. Wykazano ujemną zależność czasu przeżycia od ekspresji CD74, oraz wykazano dodatnią korelację między poziomem ekspresji CD74, a stopniem inwazyjności PDAC ocenianym za pomocą klasyfikacji TNM. Nagata i wsp. wykazali, iż CD74 może być niezależnym czynnikiem prognostycznym w przypadku chorych z PDAC [23].

W naszej pracy ocenialiśmy ekspresję CD74 we krwi, węzłach chłonnych i tkance nowotworowej chorych na NDRP, oraz poziom ekspresji CD74 we krwi chorych z NDRP i zdrowych dawców. Zwiększona akumulacja limfocytów B z ekspresją CD74 w tkankach bezpośrednio związanych z procesem nowotworowym: węzłach chłonnych, tkance nowotworowej w porównaniu z krwią obwodową, oraz zwiększony ich odsetek we krwi chorych z NDRP w porównaniu z krwią zdrowych dawców, może potwierdzać wcześniejsze badania, co do roli CD74 w procesie karcynogenezy. Ponadto nasze wyniki mogą sugerować, iż limfocyty B z ekspresją CD74 mogą być czynnikiem wpływającym na ucieczkę nowotworu przed odpowiedzią immunologiczną. Nasze wyniki pozostają zgodne z publikacjami opisującymi niekorzystną rolę limfocytów B w przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej.

WNIOSKI

We wszystkich badanych tkankach stwierdziliśmy obecność limfocytów B z ekspresją CD74. W tkankach bezpośrednio zaangażowanych w chorobę nowotworową: drenujące węzły chłonne i tkanka guza stwierdzono istotnie wyższy odsetek limfocytów CD19+/CD74+. We krwi obwodowej chorych na NDRP odsetek limfocytów z ekspresją CD74 był istotnie wyższy niż u osób zdrowych.

Rola CD74 jako dodatkowej sygnałowej cząsteczki związanej z nowotworową proliferacją limfocytów B i ich przeżyciem może mieć kluczowe znaczenie jako cel przyszłej immunoterapii. Ponadto zwiększona ekspresja CD74 w wielu typach nowotworów sugeruje, iż oznaczenie jej odsetka może być dość ważnym czynnikiem prognostycznym, a skorelowanie odsetka CD74 ze stadium zaawansowania nowotworu może być użytecznym markerem progresji choroby [8].

References/Piśmiennictwo:

1. Meyer-Siegler F, Iczkowski F, Leng L i wsp.: Inhibition of macrophage migration inhibitory factor or its receptor (CD74) attenuates growth and invasion of DU-145 prostate cancer cells. *J Immunol.* 2006; 177: 8730-8739.
2. Kamimura A, Kamachi M, Nishihira J i wsp.: Intracellular distribution of macrophage migration inhibitory factor predicts the prognosis of patients with adenocarcinoma of the lung. *Cancer* 2000; 89: 334-341.
3. Tomiyasu M, Yoshino I, Suemitsu R i wsp.: Quantification of macrophage migration inhibitory factor mRNA expression in non-small cell lung cancer tissues and its clinical significance. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3755-3760.
4. Amin MA, Volpert OV, Woods JM i wsp.: Migration inhibitory factor mediates angiogenesis via mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol kinase. *Circ Res* 2003; 93: 321-329.
5. Mitchell RA, Liao H, Chesney J i wsp.: Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 345-350.
6. Strubin M, Mach B, Long EO. The complete sequence of the mRNA for the HLA-DR-associated invariant chain reveals a polypeptide with an unusual transmembrane polarity. *EMBO J* 1984; 3: 869-872.
7. Claesson L, Larhammer D, Rask L, Peterson PA. cDNA clone for the human invariant gamma chain of class II histocompatibility antigens and its implications for the protein structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 7395-7399.
8. Stein R, Mattes J, Cardillo T I i wsp.: CD74: a new candidate target for the immunotherapy of B-cell neoplasms. *Clin Cancer Res.* 2007;13:5556-5563.
9. Stein R, Qu Z, Cardillo T i wsp.: Antiproliferative activity of a humanized anti-CD74 monoclonal antibody, hLL1, on B-cell malignancies. *Blood* 2004; 104: 3705-3711.
10. Becker-Herman S, Arie G, Medvedovsky H i wsp.: CD74 is a member of the regulated intramembrane proteolysis-processed protein family. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 5061-5069.
11. Germain RN, Margulies DH. The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Annu Rev Immunol.* 1993; 11: 403-450.
12. Matza D, Kerem A, Lantner F i wsp.: Invariant chain-induced B cell differentiation requires intramembrane proteolytic release of the cytosolic domain. *Immunity* 2002; 17: 549-560.
13. Lantner F, Starlets D, Gorge Y i wsp.: CD74 induces TAp63 expression leading to B-cell survival. *Blood* 2007; 110: 4303-4311.
14. Binsky I, Haran M, Starlets D i wsp.: IL-8 secreted in a macrophage migration-inhibitory factor- and CD-74-dependent manner regulates B cell chronic lymphocytic leukemia survival. *PNAS* 2007; 104: 13408-13413.
15. Starlets D, Gore Y, Binsky I i wsp.: Cell-surface CD74 initiates a signaling cascade leading to cell proliferation and survival. *Blood* 2006; 107: 4807-4816.
16. Naujokas MF, Morin M, Anderson MS i wsp.: The chondroitin sulfate form of invariant chain can enhance stimulation of T cell responses through interaction with CD44. *Cell* 1993; 74: 257-268.
17. Shi X, Leng L, Wang T i wsp.: CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex. *Immunity* 2006; 25: 595-606.
18. Meyer-Siegler KL, Leifheit EC, Vera PL. Inhibition of macrophage migration inhibitory factor decreases proliferation and cytokine expression in bladder cancer cells. *BMC Cancer.* 2004; 4:34.
19. McClelland M, Zhao I, Carskadon S i wsp.: Expression of CD74, the Receptor for Macrophage Migration Inhibitory Factor, in Non-Small Cell Lung Cancer. *Am J Pathol.* 2009; 174: 638-646.
20. Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K i wsp.: Invariant chain expression in gastric cancer. *Cancer Lett.* 2001; 168: 87-91.
21. Young AN, Amin MB, Moreno CS i wsp.: Expression profiling of renal epithelial neoplasms: a method for tumor classification and discovery of diagnostic molecular markers. *Am J Pathol.* 2002; 158: 1639-1651.
22. Burton JD, Ely S, Reddy PK i wsp.: CD74 is expressed by multiple myeloma and is a promising target for therapy. *Clin Cancer Res.* 2004; 10: 6606-6611.
23. Nagata S, Jin Y, Yoshizato K i wsp.: CD74 is a novel prognostic factor for patients with pancreatic cancer receiving multimodal therapy. *Ann Surg Oncol* 2009 [E-published ahead of print].