



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Inflammation and immunomodulation in uveal melanoma

Ly, L.V.

Citation

Ly, L. V. (2011, April 12). *Inflammation and immunomodulation in uveal melanoma*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/16710>

Version: Corrected Publisher's Version

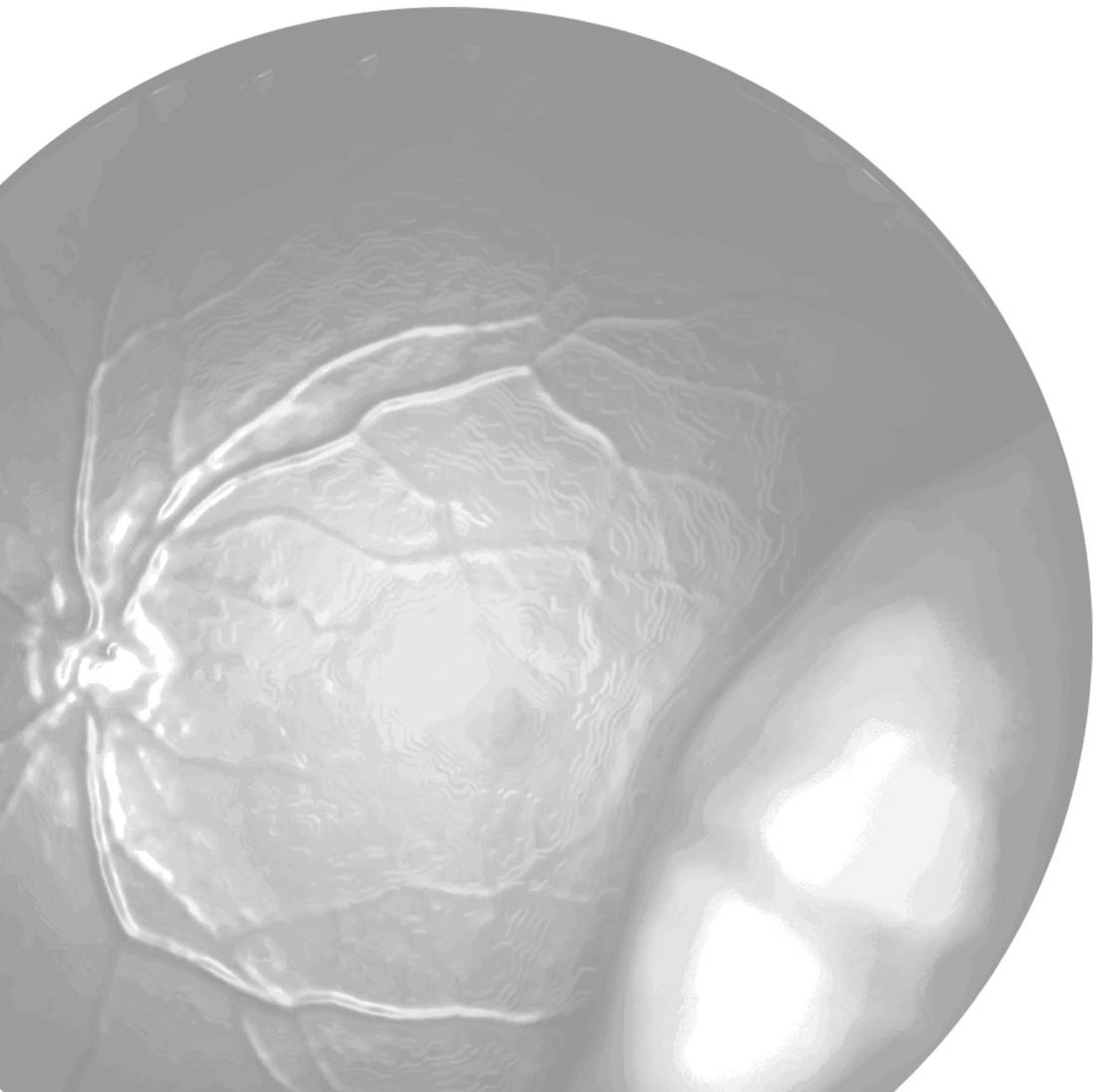
License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/16710>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Chapter 11

**Synopsis, conclusions and future perspectives in Dutch
Samenvatting, conclusies en toekomstperspectieven**



Chapter 11

Samenvatting

Hoewel de behandelingen van het primaire uveamelanoom over het algemeen effectief is, is de overleving van de patient nog steeds relatief slecht: micrometastasen zijn al ten tijde van de diagnose van het primaire oogmelanoom aanwezig en uitzaaiingen van de tumor zijn moeilijk te behandelen¹. Ondanks betere inzichten in de etiologie en pathogenese van deze dodelijke vorm van kanker, resten er nog veel vragen over de wijze waarop deze tumor zich ontwikkelt en hoe we kunnen voorkomen dat er progressie plaatsvindt van de uveamelanoommetastasen.

In dit proefschrift wordt beschreven hoe belangrijke aspecten van het oogmelanoom zijn bestudeerd, namelijk de rol van ontsteking en immuunmodulatie. In het algemeen speelt het immuunsysteem een belangrijke rol in de ontwikkeling van kanker en dit is niet anders in het oogmelanoom: in dit proefschrift laten we zien dat de aanwezigheid van een ontsteking in de tumor geassocieerd is met een slechtere prognose. Er is een actieve ontsteking aanwezig in ogen met een uveamelanoom, met infiltratie door macrofagen, lymfocyten en een hoge expressie van HLA klasse I en II^{2,5}.

We weten dat hoge dichtheden van macrofagen in de tumor geassocieerd zijn met een slechtere overleving door uitzaaiingen van het uveamelanoom, en daarom geven we een overzicht (hoofdstuk 2) van de literatuur over de rol van deze cellen in het immuunsysteem, met de focus op het oogmelanoom. De macrofaag is veelzijdig: in verschillende diermodellen van intraoculaire melanomen heeft deze cel juist een tumorgroei-bevorderende of een tumor-onderdrukkende rol. De functie is afhankelijk van het macrofaag fenotype, namelijk die van een antigeen-presenterende cel, een M1 (tumor-onderdrukkend) of een M2 (tumor-bevorderend) type macrofaag of van een (tumor-bevorderende) Myeloid Derived Suppressor Cell. Indien het mogelijk is om de macrofaag in het gewenste fenotype te laten differentieëren zal dit leiden tot nieuwe therapeutische mogelijkheden, en mogelijk tot een betere behandeling van de tumor.

In hoofdstuk 3 beschrijven we de ontsteking in het oogmelanoom, die wordt geassocieerd met een verminderde overleving, als het zogenaamde “inflammatoire fenotype” en laten zien dat dit fenotype gepaard gaat met een specifieke marker voor slechte prognose in het uveamelanoom, namelijk monosomie van chromosoom 3. Blijkbaar zijn de genetische en immunologische aspecten van het oogmelanoom aan elkaar gekoppeld. Dit was de eerste keer dat beschreven werd dat deze twee verschijnselen met elkaar verbonden zijn, en blijkbaar bepalen genen op chromosoom 3 de status van het immuunsysteem in de tumor, alhoewel wij de exacte genen nog niet hebben geïdentificeerd.

Verder wordt in hoofdstuk 4 specifiek naar één van de facetten van het inflammatoire fenotype in het uveamelanoom gekeken, namelijk naar de eerder beschreven macrofaag. Volgens het M1 en M2 macrofagen paradigma van Mantovani bestaan er twee soorten macrofagen, met verschillende functies^{6,7}. De M2 macrofaag is beschreven als tumor-bevorderend, voornamelijk dankzij zijn capaciteit om de matrix te veranderen, zijn pro-angiogene functie en zijn immuun-suppressieve capaciteit. Een oogmelanoom bevat veel M2 type

macrofagen en de dichtheid van deze cel correleert met de aanwezigheid van monosomie 3 en verminderde overleving, wat weer bevestigt dat het verlies van een exemplaar van chromosoom 3 leidt tot meer macrofaaginfiltratie. Een mogelijke verklaring kan zijn dat de genen die coderen voor remming van macrofageninstroom zich bevinden op chromosoom 3, en het verlies van deze specifieke genen zal leiden tot massale infiltratie.

Aangezien wij beschreven hebben dat een inflammatoir fenotype bij het uveamelanoom kan bestaan, is een van de belangrijkste vragen hoe dit eenvoudig bepaald kan worden in een oog met een tumor. Tegenwoordig wordt een Fine Needle Aspiration Biopsy (FNAB) gebruikt om via een punctie weefsel af te nemen uit een intraoculaire tumor voor analyse van chromosoom 3, maar deze methode is relatief invasief. Daarom (hoofdstuk 5) vroegen we ons af of we daarvoor in de plaats wat voorste oogkamervocht zouden kunnen nemen, hetgeen relatief eenvoudig is. Chemokines en cytokines zorgen voor de aantrekking van immuuncellen, en onze hypothese is dat de aanwezigheid van deze eiwitten geassocieerd is met het inflammatoire fenotype. We hebben een Multiplex Cytokine Array uitgevoerd op voorste oogkamervocht van geënuceerde ogen die een uveamelanoom bevatten, en kwamen tot de conclusie dat kamerwater van oogmelanoom patiënten aanzienlijk meer cytokines en chemokines bevatten dan oogvocht van gezonde patiënten. De concentraties van de cytokines waren niet geassocieerd met andere prognostische markers en voorspelden niet de overleving. Cytokines en chemokines worden ook in het oog geproduceerd bij vele andere oogheelkundige inflammatoire ziekten, zoals uveïtis en acute retina necrose⁸; dit gebeurt door immuuncellen, maar ook door retinale cellen en in ons geval, tumorcellen. We denken nu dat de productie van cytokines een reactie is op de aanwezigheid van de tumor, en dat ze een mogelijk aangrijpingspunt voor therapie kunnen zijn. Verschillende studies zijn uitgevoerd met antilichamen tegen cytokines en er is aangetoond dat ze doeltreffend zijn in de remming van de instroom van immuuncellen⁹. Experimentele studies in een diemodel kunnen met dergelijke antilichamen verricht worden.

In hoofdstuk 6 analyseren wij de rol van de tumorcelinvasie in bloedvaten bij het uveamelanoom, en we concluderen dat dit geassocieerd is met een slechtere prognose. Men kan zich voorstellen dat er een ondersteunende rol van macrofagen bestaat in dit proces, aangezien remodelering van de extracellulaire matrix een van de functies is van deze cellen en zal leiden tot invasie van tumorcellen in deze structuur. Er is beschreven dat deze functie kenmerkend is voor de tumor-bevorderende M2 macrofaag. Voor verdere bevestiging van deze redenering zullen we de aanwezigheid van M2 macrofagen moeten vergelijken met de resultaten van de tumorcelinvasie in bloedvaten.

Aan de ene kant hebben we veel verschillende negatieve aspecten van de aanwezigheid van het ontstekingsproces in het oogmelanoom gedemonstreerd, maar aan de andere kant kunnen we het immuunsysteem gebruiken voor onze belangrijkste doelstelling, nl. om een behandeling tegen deze tumor te vinden op basis van de immunologie. In hoofdstuk 7 vonden we dat macrofagen en

leeftijd een belangrijke rol spelen in het ontstaan van tumoren bij een syngene immunocompetente muis. We laten in dit hoofdstuk zien dat wanneer de ogen van oude muizen gedepleteerd zijn voor macrofagen, dit de groei van tumoren voorkomt, terwijl bij jonge muizen macrofaagmodulatie nauwelijks enig verschil maakt in tumorgroei. Met immunohistochemie en genexpressieanalyse laten we zien dat de waargenomen effecten in de oude muizen te verklaren vallen door depletie van de tumor-bevorderende, pro-angiogene en immuun-suppresserende M2 macrofaag. Een opmerkelijke bevinding is dat dit fenotype van de cellen aanwezig is in grote hoeveelheden in de ogen van de oudere individuen. De leeftijdsgerelateerde veranderingen van dit immuuncel fenotype (in dit geval de macrofaag) speelt duidelijk een rol in de tumorigeniciteit van een tumor in een muis en past bij de fysiologische veroudering. Deze constatering is van belang voor oogmelanoompatiënten, omdat we weten dat deze tumor zich ontwikkelt in relatief oudere mensen, en het is ook gebleken dat hogere aantallen van tumor-infiltrerende macrofagen worden geassocieerd met een slechtere prognose.

We hebben gebruik gemaakt van het immuunsysteem van de muis om op basis van immunologische reacties een behandeling tegen intraoculaire tumoren te ontwikkelen. In hoofdstuk 8 gebruiken we adoptieve cel transfer (ACT) van transgene T cellen specifiek voor gp100 (pmel cellen) en 20-meer lange peptide vaccinatie als profylactische behandeling voor het intraoculaire melanoom. Gp100 is één van de melanoom-differentiatie antigenen en is aanwezig in pigment en in melanoom cellen. Het activeren van adoptief-getransfereerde T-cellen was heel effectief: we slaagden erin om de geactiveerde T-cel in hoge frequenties systemisch in de muis te handhaven zonder dat we gebruik maakten van conditionering (zoals bestraling of chemotherapeutische behandeling) van de gastheer. In verschillende publicaties staat beschreven dat dat juist een essentiële factor zou zijn om zulke hoge frequenties te halen, maar deze proeven laten zien dat ook zonder conditionering goede T cel activering mogelijk is. Echter, meerdere peptide vaccinaties leidden tot een massale cytokine release (cytokine storm), met als gevolg een systemisch inflammatoir respons syndroom (SIRS) en multi-organfalen, zoals ook bij Graft-versus-host ziekte of injectie van de monoklonale antistoffen anti-CD28 of anti-CD40^{10,11} is waargenomen. Aangezien ACT al is toegepast in klinische studies, waarschuwt deze studie dat we voorzichtig moeten zijn bij het gebruik van deze combinatiebehandeling. Preventie van deze dodelijke symptomen kan waarschijnlijk worden bereikt door een peptide met lagere bindingscapaciteit of mineraal olie als oplosmiddel (Freud's adjuvans (IFA) / Montanide in plaats van fosfaat-gebufferde zoutoplossing (PBS)) te gebruiken, hetgeen zal resulteren in langzaam vrijkomen en langdurige presentatie van het peptide aan antigeen-presenterende cellen (APC). Wij hebben studies lopen om de effectiviteit en het anti-tumor effect van onze pmel cellen te analyseren na behandeling met korte peptides of montanide als oplosmiddel.

In hoofdstuk 9 tonen we het effect van een monoklonaal antilichaam, TA99, dat werkt op een ander melanoom antigeen, TRP-1^{12,13}. Wij laten zien dat een tweemaalig behandelingsregime in combinatie met een therapeutische lange peptide vaccinatie leidt tot een aanzienlijke vertraging van de

subcutane uitgroei van melanoom in de muis. Ons idee betreffende het werkingsmechanisme van TA99 is dat het de T-cel priming niet verbetert, want we hebben bewezen dat de combinatie behandeling van TA99 en vaccinatie niet leidt tot een grotere expansie van endogene T-cellen. Daarom is onze hypothese dat TA99 het tumormicromilieu moduleert, door het veranderen van macrofagen, NK-cellen en B-cellen, omdat van TA99 bekend is dat het bindt aan Fc-gamma receptoren¹² en leidt tot inhibitie van tumor-onderdrukkende cellen, zodat de tumor doeltreffender aangevallen kan worden.

Overwegingen met betrekking tot dierproeven

In hoofdstuk 7 hebben we al vermeld dat het veranderen van macrofaag fenotype blijkbaar een fysiologisch fenomeen van veroudering is, en dat het de groei van een tumor in een muis kan bepalen. Als regel wordt kanker beschreven als een proces dat voornamelijk geassocieerd is met oncogenen en tumor-suppressor genen. Het algemene paradigma is dat tumoren ontstaan wanneer verschillende genetische mutaties optreden, en dat deze fouten na verloop van tijd zullen leiden tot afwezige controle op groeiremming van gemuteerde kankercellen^{14,15}. We hebben nu beschreven dat immuuncellen bijdragen aan de oncogenese door het tumormilieu te veranderen en we voeren dit ook aan als een nieuw concept binnen het oogmelanoom.

Bovendien heeft onze bevinding dat tumoren zich anders gedragen bij oudere dieren ook implicaties: aangezien de meeste dierproeven worden uitgevoerd bij jonge individuen, betekent dit dat dit niet representatief is voor de situatie bij de mens, waarbij kanker een leeftijd-gerelateerde ziekte is. Daarom moeten resultaten in studies met jonge dieren met voorzichtigheid worden geïnterpreteerd.

Bovendien hebben oude muizen veel M2 macrofagen, met expressie van angiogene en immunosuppressieve markers. Verder onderzoek kan worden uitgevoerd om te zien of er zich meer bloedvaten bevinden in tumoren van oude muizen, omdat we van de M2 macrofaag beschreven hebben dat deze een pro-angiogene functie bezit. Echter, dit kan een probleem zijn, aangezien we te maken hebben met een kleine tumor in de voorste oogkamer van een muis, die slechts 4 mm³ groot is. We weten dat tumoren die 2 mm in diameter zijn nog kunnen groeien zonder bloedvaten. Toch kunnen angiogene signalen worden ingeschakeld op mRNA niveau in een tumor in de voorste oogkamer, zonder dat er zichtbare veranderingen in de bloedvatgroei waargenomen worden. Bovendien kan men zich afvragen of de M2 macrofaag de tumorgroei ondersteunt door te fungeren als een Myeloïde Derived Suppressor Cell, middels het remmen van cytotoxische T cellen. Aanvullende functionele experimenten met knock-out muizen voor deze cellen zijn nodig om dit te analyseren en verder zullen we T cel infiltratie in de tumoren onderzoeken om het immunosuppresserende effect van M2 macrofagen te bestuderen. Het lijkt erop dat M2 macrofagen de groei van tumoren ondersteunen, en dat deze gepolariseerde versie van de macrofaag het probleem veroorzaakt. Simpel

gezegd, als we erin slagen om de M2 macrofaag om te zetten naar een M1 macrofaag, kan dit het nadelige effect van de M2-macrofaag op de tumorgroei voorkomen^{16,17}. Hoewel dit simpel klinkt, heeft dit principe een aantal nadelen: 1) we weten dat de M1/M2 verdeling in een muis relatief is en er geen absolute polarisatie is. Hoe ver kunnen we gaan met het veranderen van de ratio om verstoring van de homeostase te voorkomen? 2) Er bestaan geen specifieke signalen om volledig gedifferentieerde M2 macrofagen terug te brengen naar de voorloper en dan vervolgens weer te stimuleren tot een M1-type. Beenmergbestraling in oude muizen om alle M2 macrofagen weg te krijgen en vervolgens het specifiek stimuleren van de nieuw geproduceerde monocytten tot M1-type macrofagen is ook een optie. Welke gevolgen zullen deze rigoureuze maatregelen echter hebben op de gastheer? Lymfocytendepletie biedt een kans voor opportunistische infecties, terwijl een absolute verandering naar het M1-fenotype, een gastheer zonder M2 macrofagen zal creëren. Het laatste subtype is van essentieel belang voor weefselherstel, zodat dit ook nadelige gevolgen zal hebben.

Onze studies voor het intraoculaire melanoom worden uitgevoerd met de weinig immunogene B16 cellijn in een C57BL/6 muis. Deze B16 cellijn groeit in de voorste oogkamer, zonder afstoting. Eerdere studies uitgevoerd met de zeer immunogene Ad5E1 cellijn in ons laboratorium en in dat van Niederkorn laten zien dat deze cellijn maximaal uitgroeit in 12 dagen, en daarna afgestoten wordt met óf behoud van de structuren van het oog ,óf totale verschrompeling (phthisis) van het oog¹⁸⁻²⁰.

Boonman¹⁹ toonde aan dat macrofagen een belangrijke rol in dit proces van afstoting spelen, omdat na het verwijderen van deze cellen middels subconjunctivale injectie van clondronaat liposomen er geen afstoting meer plaatsvond en deze tumor lange tijd in de voorste oogkamer groeide. Bovendien zijn CD4 + T-cellen en IFN- γ essentieel bij afstoting van de tumor met behoud van de rest van het oogweefsel²⁰

Onlangs heeft Niederkorn²¹ laten zien dat de M1 macrofaag een belangrijke rol speelt in de afstoting van de Ad5E1 cellijn met phthisis: iNOS, dat kenmerkend is voor de functie van M1 macrofagen, is essentieel in dit proces en verantwoordelijk voor de bijkomende schade aan de andere oogstructuren, wat uiteindelijk zal resulteren in phthisis.

De studies met de Ad5E1 cellijn zijn essentieel om het proces van tumorafstoting te bestuderen, en geven ons meer inzicht hoe men zich kan ontdoen van een tumor en hoe macrofagen kunnen bijdragen tot tumorafstoting. Echter, dit model is minder representatief dan de weinig immunogene, syngene B16 cellijn, die niet afgestoten zal worden, net zo min als humane tumoren. Daarom hebben wij ons onderzoek voor het bestuderen van de bijdrage van macrofagen in het tumorgroeiproces dan ook uitgevoerd met de B16 cellijn in C57BL/6 muizen. De rol van macrofagen in de Ad5E1 cellijn is voornamelijk tumorlytisch, terwijl in de studie met B16 melanoom macrofagen een tumor-ondersteunende functie hebben.

In onze vaccinatie studies beschrijven we dat injectie van lange peptiden

in combinatie met adoptieve transfer van specifieke T cellen tot een SIRS leidt, maar wat is het verschil met korte peptiden? Korte peptiden bestaan uit 9 aminozuren, lange peptiden variëren van 20-meer tot 34-meer. In onze vaccinatie studies gebruikten we 20-meer peptiden, terwijl de studies die beschrijven dat lange peptiden effectief zijn tegen premaligne laesies van de vulva (VIN laesies) gebruik maakten van gepatenteerde synthetische lange peptiden (SLP) die tenminste 25-meer zijn^{22,23}. Van der Burg en Melief^{24,25} hebben reeds beschreven dat de verspreiding van de 9-meer korte peptiden door het hele lichaam effectief is, terwijl de 34-meer peptiden op de injectieplaats blijven en zich niet verder verspreiden dan de drainerende lymfeklieren. We weten dat het 20-meer peptide ook lokaal blijft, maar toch een SIRS kan veroorzaken. We zouden nog verder moeten onderzoeken hoe dit 20-meer peptide ervoor zorgt dat de specifieke T-cellen systemisch geactiveerd worden en tot een cytokinestorm leiden. Een belangrijke vraag is of het 34-meer dezelfde symptomen zal veroorzaken. Volgens eerdere studies van Van der Burg en Melief^{24,25} verspreidt dit peptide zich niet systemisch, dus hypothetisch zal het niet leiden tot het induceren van systemische activering van specifieke T cellen en zal gebruik hiervan dus geen SIRS ten gevolge hebben.

Conclusies en toekomstperspectieven

In dit proefschrift hebben we benadrukt dat in het uvea melanoom vaak sprake is van een ontsteking en dat dit geassocieerd is met een slechte prognose. Aangezien dit een belangrijke factor is, kan modulatie van het immuunsysteem mogelijke therapeutische opties geven. Al een decennium geleden is beschreven dat intratumorale macrofagen geassocieerd worden met een slechtere overleving van uveamelanoom patiënten, maar tot nu toe was hier geen goede verklaring voor gevonden. We laten zien dat deze immuuncel een rol speelt bij tumorgroei. Daarnaast laten wij zien dat combinatietherapie een optie is: het gecombineerd gebruik van ACT met peptide vaccinatie leidt tot een doelgerichte therapie van tumorcellen. Hoewel dit veelbelovend lijkt, is behandeling van de tumorcellen alleen niet afdoende, maar is ook therapie gericht op cellen die een ondersteunende rol spelen in het proces van tumorgroei essentieel²⁶.

We weten dat sommige monoklonale antilichamen, zoals de in onze studie gebruikte TA99, specifiek gericht zijn op tumorcellen, maar tegelijkertijd ook van invloed kunnen zijn op immuuncellen en het tumormilieu kunnen beïnvloeden.

Nieuwe therapieën op het gebied van de oncologie vormen tyrosine kinase en angiogenese remmers^{27,28}, die tumorgroei zouden moeten tegengaan. Onderzoeksprojecten over de hele wereld laten zien dat deze medicijnen ook onderdelen van het immuunsysteem veranderen, en vooral het tumormicromilieu. Voorlopige resultaten uit ons laboratorium laten zien dat deze tyrosine kinase remmers macrofagen kunnen moduleren. Angiogenese-remmers creëren mogelijkheden voor het beïnvloeden van de tumorbloedvatvorming en van cellen die een pro-angiogene functie hebben.

Daarom is het combineren van deze medicijnen met vaccinatie een interessante optie omdat er een synergistisch mechanisme wordt geactiveerd waarbij zowel het tumor micro-milieu gemoduleerd wordt als dat de tumorcel zelf aangepakt wordt met als resultaat een verbetering van de anti-tumor effectiviteit.

Dit proefschrift toont aan dat een synergistische aanpak met een combinatie van tumorcel targeting en modulatie van het micro-milieu voor een effectieve behandeling van kanker een belangrijke benadering vormt.

Referenties

1. Kivela, T., Eskelin, S., and Kujala, E. *Metastatic uveal melanoma*. *Int.Ophthalmol.Clin.* 2006. 46:133-149.
2. Blom, D. J., Luyten, G. P., Mooy, C., Kerkvliet, S., Zwinderman, A. H., and Jager, M. J. *Human leukocyte antigen class I expression. Marker of poor prognosis in uveal melanoma*. *Invest Ophthalmol Vis.Sci.* 1997. 38:1865-1872.
3. Makitie, T., Summanen, P., Tarkkanen, A., and Kivela, T. *Microvascular density in predicting survival of patients with choroidal and ciliary body melanoma*. *Invest Ophthalmol Vis.Sci.* 1999. 40:2471-2480.
4. Makitie, T., Summanen, P., Tarkkanen, A., and Kivela, T. *Tumor-infiltrating macrophages (CD68(+)) cells and prognosis in malignant uveal melanoma*. *Invest Ophthalmol Vis.Sci.* 2001. 42:1414-1421.
5. Waard-Siebinga, I., Hilders, C. G., Hansen, B. E., van Delft, J. L., and Jager, M. J. *HLA expression and tumor-infiltrating immune cells in uveal melanoma*. *Graefes Arch.Clin Exp. Ophthalmol* 1996. 234:34-42.
6. Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., and Sica, A. *Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes*. *Trends in Immunology* 2002. 23:549-555.
7. Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization*. *Trends Immunol.* 2004. 25:677-686.
8. Ongkosuwito, J. V., Feron, E. J., van Doornik, C. E., Van der, L. A., Hoyng, C. B., La Heij, E. C., and Kijlstra, A. *Analysis of immunoregulatory cytokines in ocular fluid samples from patients with uveitis*. *Invest Ophthalmol Vis.Sci.* 1998. 39:2659-2665.
9. Balkwill, F. and Mantovani, A. *Cancer and inflammation: implications for pharmacology and therapeutics*. *Clin Pharmacol.Ther.* 2010. 87:401-406.
10. Suntharalingam, G., Perry, M. R., Ward, S., Brett, S. J., Castello-Cortes, A., Brunner, M. D., and Panoskaltsis, N. *Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412*. *N.Engl.J Med.* 2006. 355:1018-1028.
11. Vonderheide, R. H., Flaherty, K. T., Khalil, M., Stumacher, M. S., Bajor, D. L., Hutnick, N. A., Sullivan, P., Mahany, J. J., Gallagher, M., Kramer, A., Green, S. J., O'Dwyer, P. J., Running, K. L., Huhn, R. D., and Antonia, S. J. *Clinical activity and immune modulation in cancer patients treated with CP-870,893, a novel CD40 agonist monoclonal antibody*. *J Clin Oncol.* 2007. 25:876-883.
12. Bevaart, L., Jansen, M. J., van Vugt, M. J., Verbeek, J. S., van de Winkel, J. G., and Leusen, J. H. *The high-affinity IgG receptor, FcγRI, plays a central role in antibody therapy of experimental melanoma*. *Cancer Res.* 2006. 66:1261-1264.
13. Saenger, Y. M., Li, Y., Chiou, K. C., Chan, B., Rizzuto, G., Terzulli, S. L., Merghoub, T., Houghton, A. N., and Wolchok, J. D. *Improved tumor immunity using anti-tyrosinase related protein-1 monoclonal antibody combined with DNA vaccines in murine melanoma*. *Cancer Res.* 2008. 68:9884-9891.
14. McClendon, A. K., Dean, J. L., Ertel, A., and Knudsen, E. S. *Differential impact of tumor suppressor pathways on DNA damage response and therapy-induced transformation in a mouse primary cell model*. *PLoS One.* 2010. 5:e8558.
15. Rubin, P., Williams, J. P., Devesa, S. S., Travis, L. B., and Constone, L. S. *Cancer genesis across the age spectrum: associations with tissue development, maintenance, and senescence*.

- Semin.Radiat.Oncol. 2010. 20:3-11.
16. Hagemann, T., Lawrence, T., McNeish, I., Charles, K. A., Kulbe, H., Thompson, R. G., Robinson, S. C., and Balkwill, F. R. "Re-educating" tumor-associated macrophages by targeting *NF-kappaB*. *J Exp.Med.* 2008. 205:1261-1268.
 17. Timmer, A. M. and Nizet, V. *IKKbeta/NF-kappaB and the miscreant macrophage*. *J Exp.Med.* 2008. 205:1255-1259.
 18. Boonman, Z. F., van Mierlo, G. J., Fransen, M. F., de Keizer, R. J., Jager, M. J., Melief, C. J., and Toes, R. E. *Maintenance of immune tolerance depends on normal tissue homeostasis*. *J Immunol.* 2005. 175:4247-4254.
 19. Boonman, Z. F., Schurmans, L. R., van Rooijen, N., Melief, C. J., Toes, R. E., and Jager, M. J. *Macrophages are vital in spontaneous intraocular tumor eradication*. *Invest Ophthalmol Vis. Sci.* 2006. 47:2959-2965.
 20. Dace, D. S., Chen, P. W., and Niederkorn, J. Y. *CD4+ T-cell-dependent tumour rejection in an immune-privileged environment requires macrophages*. *Immunology* 2008. 123:367-377.
 21. Coursey, T. G., Chen, P. W., and Niederkorn, J. Y. *T-cell dependent rejection of ocular tumors is mediated by macrophage iNOS production and culminates in the destruction of both the tumor and the eye*. Abstract in *Keystone Symposia: Role of inflammation in oncogenesis*, Keystone CO. 2010.
 22. Kenter, G. G., Welters, M. J., Valentijn, A. R., Lowik, M. J., Berends-van der Meer DM, Vloon, A. P., Drijfhout, J. W., Wafelman, A. R., Oostendorp, J., Fleuren, G. J., Offringa, R., van der Burg, S. H., and Melief, C. J. *Phase I immunotherapeutic trial with long peptides spanning the E6 and E7 sequences of high-risk human papillomavirus 16 in end-stage cervical cancer patients shows low toxicity and robust immunogenicity*. *Clin Cancer Res.* 2008. 14:169-177.
 23. Kenter, G. G., Welters, M. J., Valentijn, A. R., Lowik, M. J., Berends-van der Meer DM, Vloon, A. P., Essahsah, F., Fathers, L. M., Offringa, R., Drijfhout, J. W., Wafelman, A. R., Oostendorp, J., Fleuren, G. J., van der Burg, S. H., and Melief, C. J. *Vaccination against HPV-16 oncoproteins for vulvar intraepithelial neoplasia*. *N.Engl.J Med.* 2009. 361:1838-1847.
 24. Bijker, M. S., Melief, C. J., Offringa, R., and van der Burg, S. H. *Design and development of synthetic peptide vaccines: past, present and future*. *Expert Rev.Vaccines.* 2007. 6:591-603.
 25. Melief, C. J. and van der Burg, S. H. *Immunotherapy of established (pre)malignant disease by synthetic long peptide vaccines*. *Nat.Rev.Cancer* 2008. 8:351-360.
 26. Yu, P., Rowley, D. A., Fu, Y. X., and Schreiber, H. *The role of stroma in immune recognition and destruction of well-established solid tumors*. *Curr.Opin.Immunol.* 2006. 18:226-231.
 27. LoRusso, P. M., Krishnamurthi, S. S., Rinehart, J. J., Nabell, L. M., Malburg, L., Chapman, P. B., DePrimo, S. E., Bentivegna, S., Wilner, K. D., Tan, W., and Ricart, A. D. *Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the oral MAPK/ERK kinase inhibitor PD-0325901 in patients with advanced cancers*. *Clin Cancer Res.* 2010. 16:1924-1937.
 28. Qiu, Y., Hoareau-Aveilla, C., Oltean, S., Harper, S. J., and Bates, D. O. *The anti-angiogenic isoforms of VEGF in health and disease*. *Biochem.Soc.Trans.* 2009. 37:1207-1213.

