

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Michaela Šimová**

Imunogenní buněčná smrt  
Immunogenic cell death

Bakalářská práce

Školitel: **RNDr. Karel Drbal, Ph.D.**

Praha, 2018

## **Poděkování**

Chtěla bych vřele poděkovat svému školiteli RNDr. Karlu Drbalovi, Ph.D. za odborné vedení, ochotu a trpělivost projevenou v průběhu zpracovávání bakalářské práce. Mé poděkování patří též rodině a přátelům, bez jejichž podpory by tato práce nevznikla.

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10. 5. 2018

.....

Michaela Šímová

## **Abstrakt**

Imunitní systém je podle „danger“ modelu aktivovaný endogenními molekulami uvolněnými z umírajících buněk, které v extracelulárním prostředí slouží jako signály nebezpečí. Jedná se o takzvané DAMP („danger-associated molecular pattern“) molekuly. Nekrotická smrt a prozánětlivé typy programovaných buněčných smrtí charakterizované porušením plazmatické membrány jsou považované za imunogenní, zatímco apoptóza byla původně definovaná jako tolerogenní typ smrti.

Za některých okolností však může být imunitní odpověď iniciovaná i apoptotickou buňkou, která je schopná externalizovat DAMP molekuly nově popsánymi sekrečními drahami. Tento jev byl pozorovaný na nádorových buňkách jako následek některých široce používaných terapeutických postupů a byl nazvaný imunogenní buněčná smrt („immunogenic cell death“ – ICD). Součástí této práce je nomenklatura vybraných typů buněčné smrti.

Cílem této bakalářské práce je poskytnout evidenci o stávajících experimentálních důkazech, které podporují teorii ICD při vyvolání imunitní odpovědi *in vivo*. Dále zhodnotím často používanou korelaci s objevením typických DAMP molekul na povrchu nádorových buněk či sekrecí těchto molekul do extracelulárního prostředí.

### **Klíčová slova**

nádor, chemoterapeutika, „danger“ model, adjuvans, DAMP, kalretikulin, ATP, interferon typu I, HMGB1, PERK, stresová odpověď ER, ROS, apoptóza, protinádorová imunita, dendritická buňka

## **Abstract**

According to the danger model, the immune system is activated by endogenous molecules known as danger-associated molecular patterns (DAMP) that are externalized from the interior of a dying cell to the cell surface or released into the extracellular space. Due to the loss of plasma membrane integrity a necrotic cell death as well as several types of proinflammatory programmed cell death are considered to be immunogenic, whereas apoptosis, on contrary, has been initially defined as a tolerogenic type of cell death.

However, under certain circumstances, the immune response can be initiated by an apoptotic cell after externalization of DAMP molecules by newly described secretory pathways. This phenomenon was observed on tumor cells as a result of some widely used therapeutic modalities and is known as immunogenic cell death (ICD). Nomenclature of selected types of cell death is part of this thesis.

The aim of this bachelor thesis is to provide an evidence of the experimental support for ICD theory during *in vivo* initiation of the immune response. I will evaluate the correlation between ICD and the induced exposure of DAMP molecules on the surface of tumor cells or their secretion to the extracellular space.

## **Keywords**

tumor, chemotherapeutic drugs, danger model, adjuvant, DAMP, calreticulin, ATP, type I interferon, HMGB1, PERK, ER stress response, ROS, apoptosis, antitumor immunity, dendritic cell

## Seznam zkratek

Ag	antigen	antigen
ABC		ATP binding cassette
ADCC	buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách	antibody-dependent cellular cytotoxicity
AML	akutní myeloidní leukémie	acute myeloid leukemia
APC	antigen prezentující buňka	antigen presenting cell
ATP	adenosintrifosfát	adenosine triphosphate
BCR	B buněčný receptor	B-cell receptor
BiP	imunoglobulin-vazebný protein	binding immunoglobulin protein
CALR	kalretikulín	calreticulin
CDDP	cisplatina	cisplatin
CHOP		CCAAT/enhancer-binding protein
		homologous protein
DAMP	molekulární vzory asociované s nebezpečím	danger associated molecular pattern
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol	
DC	dendritická buňka	dendritic cell
eIF2 $\alpha$	eukaryotický iniciační faktor 2 $\alpha$	eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$
ER	endoplazmatické retikulum	endoplasmic reticulum
GA	Golgiho aparát	Golgi apparatus
GPX4	glutathion peroxidáza 4	glutathione peroxidase 4
HHP	vysoký hydrostatický tlak	high hydrostatic pressure
HSP	proteiny teplotního šoku	heat shock protein
ICD	imunogenní buněčná smrt	immunogenic cell death
IFN	interferon	interferon
IL	interleukin	interleukin
IS	imunitní systém	immune system
LDH	laktátdehydrogenáza	lactate dehydrogenase
LPS	lipopolysacharid	lipopolysaccharide
LSP	„leaderless“ sekreční dráha	leaderless secretory pathway
MDSC	myeloidní supresorové buňky	myeloid-derived suppressor cells
MHC	hlavní histokompatibilní komplex	major histocompatibility complex
MK	mastné kyseliny	fatty acid
MLKL		mixed lineage kinase domain-like pseudokinase
MTX	mitoxantron	mitoxantrone
NK	přírození zabíječi	natural killer cells
OXA/OXP	oxaliplatin	oxaliplatin
PAMP	molekulární vzory asociované s patogeny	pathogen associated molecular pattern
PDT	fotodynamická terapie	photodynamic therapy
PE	fosfatidylethanolamin	phosphatidylethanolamine

PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza	phosphoinositide 3-kinase
PM	plazmatická membrána	plasma membrane
PRR		pattern recognition receptor
PS	fosfatidylserin	phosphatidylserine
ROS	reaktivní kyslíkové radikály	reactive oxygen species
s.c.	subkutánně	subcutaneous
SA $\beta$ -Gal	$\beta$ -galaktosidáza asociovaná se senescencí	senescence associated $\beta$ -galactosidase
SAS	sekretom asociovaný se senescencí	senescence-associated secretome
siRNA	malá interferující RNA	small interfering RNA
TAA	s nádorem asociované antigeny	tumor-associated antigens
TAM	makrofágy asociované s nádory	tumor-associated macrophages
Tc	cytotoxická T buňka	cytotoxic T cell
TCR	T buněčný receptor	T-cell receptor
TGF $\beta$	transformující růstový faktor $\beta$	transforming growth factor $\beta$
Th	pomocná T buňka	T helper cell
TLR		Toll-like receptor
TNF	nádory nekrotizující faktor	tumor necrosis factor
Treg	regulační T buňka	regulatory T cell
TSA	nádorově specifické antigeny	tumor-specific antigens
UVC	ultrafialové záření C	Ultraviolet-C light
Z-VAD	carbобензоxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]- fluoromethylketon	

## Obsah

1. Úvod.....	1
2. Kompartmentalizace buňky se zaměřením na ER.....	3
2.1. Sekreční dráhy.....	4
2.2. Odpověď na nesbalené proteiny (UPR).....	4
3. Protinádorová imunitní odpověď.....	5
3.1. „Danger“ model indukce imunitní odpovědi.....	5
3.2. Imunogenita nádorových buněk.....	7
3.3. Mechanismy protinádorové imunitní odpovědi.....	7
3.3.1. Přírozená imunita.....	8
3.3.2. Adaptivní imunita.....	9
3.3.3. Suprese IS nádorem.....	10
4. Typy buněčné smrti a jejich vliv na aktivaci IS.....	10
4.1. Senescence.....	11
4.2. Nekróza.....	11
4.3. Ferroptóza.....	11
4.4. Nekroptóza.....	12
4.5. Pyroptóza.....	12
4.6. Apoptóza a sekundární nekróza.....	12
4.7. Imunogenní buněčná smrt (ICD).....	13
5. Koncept ICD.....	16
5.1. Induktory ICD.....	16
5.2. Proteiny asociované s membránami.....	18
5.2.1. CALR a ERP57 (PDIA3).....	19
5.2.2. HSP.....	21
5.3. Solubilní molekuly a proteiny.....	21
5.3.1. ATP.....	22
5.3.2. HMGB1.....	24
5.3.3. Annexin A1 (ANXA1).....	26
6. Experimentální průkaz ICD v <i>in vivo</i> transplantačních modelech.....	26
6.1. Indukce ICD v myších nádorových liniích aplikovaných do syngenních imunokompetentních modelů.....	26
6.2. Spontánní nádorové modely.....	31
7. Závěr.....	32
8. Použitá literatura.....	34

## 1. Úvod

Účelem imunitního systému („immune system“ – IS) je udržování homeostázy organismu. IS je tvořený přirozenou a adaptivní složkou, jejichž společným úkolem je rozeznat potenciálně nebezpečnou strukturu a eliminovat ji. Buňky přirozeného IS, například makrofágy, granulocyty, NK buňky a dendritické buňky („dendritic cell“ – DC), jsou aktivované v přítomnosti adjuvans – látek, které jsou schopné vyvolat imunitní odpověď. Tyto buňky jsou následně schopné aktivovat adaptivní část IS, tedy T a B lymfocyty, které již cílí odpověď proti konkrétnímu antigenu („antigen“ – Ag). Ag je jakákoliv struktura, proti které je IS schopen vytvořit protilátky. Buňky adaptivního IS jsou zodpovědné na vznik imunologické paměti umožňující rychlejší reakci při opakovaném setkání s daným Ag a jsou tedy zodpovědné za efekt vakcinace diskutovaný v této práci.

Princip rozhodování IS o tom, zda bude na určitou molekulu reagovat, je jedním ze základních témat imunologie. Přibližně od roku 1960 převládal takzvaný „self-nonselv“ model. Vědci se domnívali, že IS, a to především jeho adaptivní složka, rozlišuje vlastní molekuly od cizích a že je to právě cizorodost, která vyvolává imunitní reakci<sup>1</sup>. Tento model však nedokázal vysvětlit všechny případy aktivity a selhání IS, například toleranci plodu během těhotenství či četná selhání v rejekci mutovaných nádorů<sup>2</sup> a byl proto postupně několikrát upravený a později plně nahrazený novým paradigmatem.

K aktivaci nezkušených T a B lymfocytů jsou nutné dva signály. Prvním signálem je vazba cíleného nativního Ag na Ag-specifický receptor B lymfocytů („B-cell receptor“ – BCR), respektive jeho krátkého strukturního fragmentu na receptor T lymfocytů („T-cell receptor“ – TCR). V roce 1989 Charlie Janeway navrhl ve svém „stranger“ modelu, že druhý signál lymfocytům poskytují kostimulační molekuly přítomné na aktivovaných a maturovaných Ag-prezentujících buňkách („antigen presenting cell“ – APC). Aktivace APC je zajišťovaná vazbou PAMP („pathogen associated molecular pattern“), molekul specifických pro patogeny, na „pattern recognition“ receptory (PRR), které dle tohoto modelu určují, zda bude Ag vyskytující se v místě a čase spolu s PAMP vnímaný jako asociovaný s infekcí a bude proti němu zahájena odpověď, nebo zda bude tolerovaný<sup>3</sup>.

Neschopnost vysvětlit pomocí „stranger“ modelu vznik autoimunitních chorob, reakci IS proti nádorům nebo rejekce transplantátů i v nepřítomnosti infekce a PAMP, respektive během sterilního zánětu, vedla Polly Matzinger k návržení „danger“ modelu. Podle tohoto modelu reaguje IS spíše na poškození integrity buněk organismu, které signalizuje nebezpečí

a porušení homeostázy, než na pouhou cizorodost Ag materiálu<sup>4</sup>. IS je tedy aktivovaný nejen patogenními PAMP, ale i molekulami vlastního těla, které plní za fyziologických podmínek funkce uvnitř buněk. Tyto takzvané DAMP („danger associated molecular pattern“) molekuly sekretované klasickými nebo alternativními dráhami z poškozených buněk, nebo pasivně unikající z buněk s porušenou plazmatickou membránou („plasma membrane“ – PM), jsou totiž rozeznávané stejnými PRR jako PAMP. Mezi DAMP molekuly patří především nukleové kyseliny a s nimi asociované proteiny – například „high-mobility group box 1“ protein (HMGB1) a histony, dále mezi ně řadíme mitochondriální a jiné proteiny uvolněné neklasickou, takzvanou „leaderless“ sekreční dráhou („leaderless secretory pathway“ – LSP) – například proteiny teplotního šoku („heat shock protein“ – HSP) a dále malé cytoplazmatické molekuly – například adenosin trifosfát („adenosine triphosphate“ – ATP)<sup>5</sup>.

PRR po vazbě PAMP a DAMP molekul aktivují celou řadu prozánětlivých signalizačních drah. Zánětlivá reakce je zásadní jak pro opravu tkání, tak i pro likvidaci patogenů. Zánět, který není následkem napadení těla patogenním organismem, je označován jako sterilní a je iniciován uvolněním DAMP molekul do extracelulárního prostředí. Obě formy zánětlivého procesu jsou charakterizované atrakcí trombocytů a neutrofilů do místa zánětu, produkcí prozánětlivých cytokinů a chemokinů a následnou indukci adaptivní imunitní odpovědi. Pokud nedojde k eliminaci zánětlivého podnětu (regeneraci tkáně, nebo odstranění infekčního agens), může zánět přejít do chronického stavu. Následkem amplifikace zánětlivé reakce pomocí dále se uvolňujících DAMP molekul dochází k masivnímu poškození buněk a tkání<sup>6</sup>.

Eukaryotické buňky jsou ohraničené intaktní PM, která funguje jako selektivní bariéra oddělující intracelulární a extracelulární prostředí. Pro udržení homeostázy v buňkách je zásadní schopnost udržet gradienty koncentrací iontů a dalších malých molekul, a to nejen na PM, ale i na všech intracelulárních membránách. Porušení homeostázy a integrity membrán nebo jiné fyzické narušení vnitřního prostředí buňky většinou vede k její smrti<sup>7</sup>.

Existuje mnoho typů buněčné smrti více či méně specifických pro určitý buněčný typ. Kromě hlavních a svým způsobem extrémních případů buněčné smrti, apoptózy a nekrózy, rozlišujeme též další typy, například nekroptózu a pyroptózu.

Nekróza je charakterizovaná zvětšením buňky, okamžitým porušením integrity PM a vylitím cytoplazmy do extracelulárního prostředí. Není závislá na aktivaci kaspáz a na energii ve formě ATP. Apoptóza je naopak regulovaný a energeticky náročný proces důležitý nejen

během ontogeneze, ale též pro běžnou obnovu tkání<sup>8</sup> a zpravidla nevede k iniciaci imunitní odpovědi, ale k jejímu utlumení – k imunitní toleranci.

Na základě dat ze tří laboratoří, které jsou navzájem historicky propojené personálně a společnými publikacemi<sup>9</sup>, byla popsána nová forma smrti nádorových buněk, která je charakterizovaná zvýšeným imunogenním potenciálem *in vivo* v myších imunokompetentních modelech, a která je označovaná termínem imunogenní buněčná smrt („immunogenic cell death“ – ICD). ICD je dle definice typ programované buněčné smrti, který vyvolá terapeuticky relevantní adaptivní imunitní odpověď proti přítomným Ag mrtvých nádorových buněk v nepřítomnosti dalších přidaných adjuvans (PAMP a DAMP) díky postupnému uvolňování DAMP molekul z těchto umírajících buněk<sup>8</sup>. S ICD je spojovaná sekrece interferonů („interferon“ – IFN) typu I a externalizace typických DAMP molekul, mezi které patří proteiny teplotního šoku kalretikulín („calreticulin“ – CALR), HSPA1A (HSP70) a HSP90AA1 (HSP90), jaderný protein HMGB1 a ATP.

Některé z induktorů ICD se v současnosti využívají v klinické praxi při léčbě nádorů. Jedná se například o různá chemoterapeutika, především antracyklinová, ale též o mitoxantron, oxaliplatinu, cyklofosfamid či bortezomib<sup>10</sup>. Pro vyvolání ICD je mimo jiné také využívána radioterapie, ultrafialové záření C („Ultraviolet-C“ – UVC)<sup>11</sup>, fotodynamická terapie („photodynamic therapy“ – PDT)<sup>12</sup> či mechanické poškození buněk vysokým tlakem („high hydrostatic pressure“ – HHP)<sup>13</sup>.

Cílem této práce je provést analýzu experimentálních potvrzení externalizace DAMP molekul asociovaných s ICD na povrch nádorových buněk, případně jejich sekrece do extracelulárního prostoru. Data by měla pocházet především z laboratoří nezávislých na výše zmíněných třech spoluobjevitelů ICD a měla by kromě *in vitro* experimentů zahrnovat i ověření schopnosti daných nádorových buněk po indukci ICD iniciovat protinádorovou imunitní odpověď v *in vivo* myším syngenním modelu (většinou BALB/c nebo C57BL/6), případně spontánních nádorových myších modelech.

## **2. Kompartmentalizace buňky se zaměřením na ER**

Buňka je ohraničená PM, která tvoří bariéru mezi extracelulárním a intracelulárním prostředím. Membrány zároveň ohraničují i intracelulární kompartmenty lišící se od cytoplazmy svým molekulárním složením a funkcí. Rolí těchto membrán je regulace lokalizace proteinů a udržení gradientů koncentrací iontů a jiných malých molekul, jejichž změny jsou stimulem pro aktivaci širokého spektra signalizačních drah. Kompartmenty tvoří

komplexní membránové kontinuum táhnoucí se od perinukleárního prostoru, přes endoplazmatické retikulum („endoplasmic reticulum“ – ER), Golgiho aparát („Golgi apparatus“ – GA) a trans-Golgi váčky až po PM<sup>7</sup>.

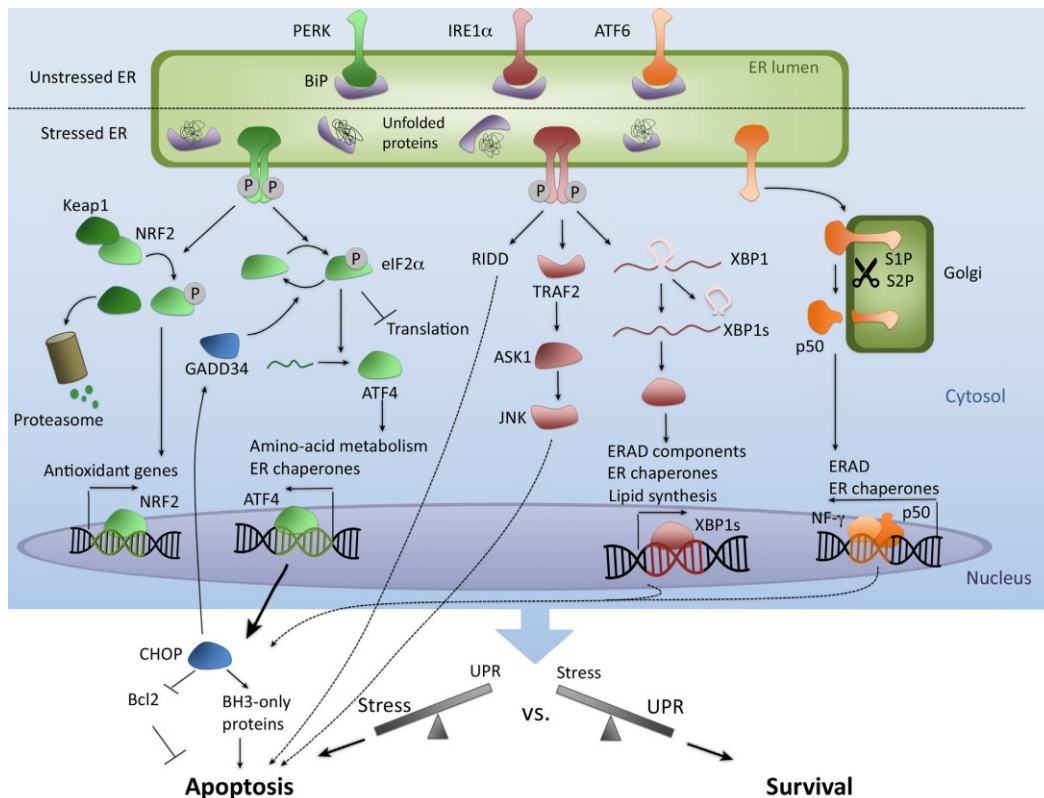
## 2.1. Sekreční dráhy

Do lumen ER jsou lokalizované proteiny obsahující na 5' konci ORF („open reading frame“) sekvenci pro hydrofobní signální peptid („leader“ sekvenci), který je předurčuje k sekreci z buňky klasickou sekreční dráhou – transportem z ER přes GA na PM. Proteiny mohou být z buňky sekretované nejen klasickou dráhou, ale i alternativními cestami. Tyto dráhy jsou většinou aktivované po stresovém či zánětlivém podnětu a jsou využívány především cytoplazmatickými proteiny postrádajícími transmembránovou doménu nebo signální peptid<sup>14</sup>. Takové proteiny pak často extracelulárně plní funkci DAMP.

Jednou z alternativních drah je „leaderless“ sekreční dráha (LSP). Sekrece touto cestou může být zprostředkována tvorbou pórů v PM nebo prostřednictvím fúze membrán, autofagozomy a endozomy a ve zvláštním případě i transportéry ABC („ATP binding cassette“) rodiny<sup>14</sup>. Autofagozomy jsou cytoplazmatické váčky ohraničené dvojitou membránou, které obsahují cytoplazmatické komponenty a organely. Jejich fúzí s lyzozomy vznikají autofagolyzozomy, ve kterých je materiál regulovaně degradován. Významným proteinem sekretovaným LSP je prozánětlivý cytokin IL-1 $\beta$  řazený mezi DAMP molekuly, který může být uvolňován jak skrze póry při zánětlivém podnětu<sup>15</sup>, tak i během hladověním indukované autofágie z autofagozomů<sup>16</sup>.

## 2.2. Odpověď na nesbalené proteiny (UPR)

ER je kompartment bohatý na chaperony, který je mimo jiné zodpovědný za kontrolu kvality nově syntetizovaných proteinů. Při stresem vyvolaných poruchách v biosyntetické dráze dochází v ER k akumulaci špatně sbalených proteinů, jejichž přítomnost aktivuje takzvanou odpověď na nesbalené proteiny („unfolded protein response“ – UPR). UPR je zprostředkována třemi transmembránovými proteiny: ERN1, EIF2AK3 („pancreatic ER kinase-like ER kinase“ – PERK) a ATF6, které jsou aktivované po vyvázání jejich společného inhibitoru HSPA5 („binding immunoglobulin protein“ – BiP) nahromaděnými proteiny (viz obrázek č. 1). Jejím cílem je obnovení proteostázy a záchrana buňky<sup>17</sup>.



**Obrázek č. 1:** Odpověď na špatně sbalené proteiny (UPR). Při akumulaci špatně sbalených proteinů dochází v ER k jejich vazbě na BiP protein, a tedy aktivaci PERK, IRE1 $\alpha$  a ATF. Cílem UPR je zajistit přežití buňky, nebo navést buňku do apoptózy zapojením CHOP proteinu. Převzato z <sup>17</sup>

Jedním z mechanismů UPR je celkové snížení intenzity AUG-závislé translace na tRNAMet a zvýšení exprese chaperonů HSP70 a HSP90, jejichž transkripty mají alternativní start (non-AUG) kodón. Tento proces je iniciován PERK-zprostředkovanou fosforylací EIF2S1 („eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$ “ – eIF2 $\alpha$ )<sup>18,19</sup>. Při mírném stresu tak UPR usnadňuje obnovení proteostázy. Pokud je však stres příliš závažný a buňku nelze zachránit, UPR přepne na program vedoucí k apoptotické programované smrti. Za aktivaci apoptózy je zodpovědný CHOP (DDIT3) protein, který inhibuje antiapoptotický protein BCL2 a aktivuje proapoptotické „BH3-only“ proteiny. Též zastavuje buněčný cyklus pomocí GADD34 proteinu, který zprostředkuje defosforylací eIF2 $\alpha$ , a tedy obnovení translace<sup>17</sup>.

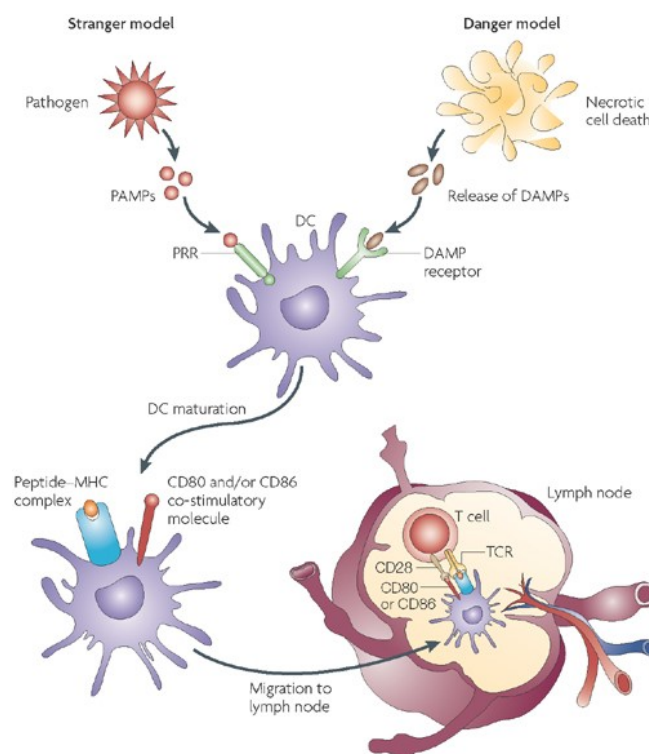
### 3. Protinádorová imunitní odpověď

#### 3.1. „Danger“ model indukce imunitní odpovědi

Na základě „danger“ modelu<sup>4</sup> není primárním úkolem IS rozeznat cizorodost, ale chránit organismus před nebezpečím. Impulz k aktivaci IS může pocházet i z vnitřního prostředí organismu a přítomnost cizích látek či patogenů tedy není nezbytná<sup>4</sup>. Obecně je IS

řízen kontextem stavu tkání. Pokud jsou zdravé a ve stavu homeostázy, navozují toleranci. Pokud jsou poškozené, dochází k aktivaci buněk přirozeného a následně i adaptivního IS.

Pro aktivaci nezkušených T lymfocytů jsou nutné dva signály. Prvním je rozeznání Ag-peptidu v komplexu s glykoproteiny hlavního histokompatibilního komplexu („major histocompatibility complex“ – MHC) pomocí vysoce specifického TCR a s ním asociovaných koreceptorů CD8 (pro vazbu MHC-I) a CD4 (pro vazbu MHC-II). Vnitřní Ag buňky, kódované v jejím genomu, jsou po proteosyntéze a následné ubiquitylaci a proteolýze v proteazomu transportované do ER, kde jsou vystavované na MHC I. třídy (MHC-I) a následně rozeznávané TCR na cytotoxických T buňkách s koreceptorem CD8 („cytotoxic T cell“ – Tc). Naopak pohlcené vnější Ag jsou prezentované na MHC II. třídy (MHC-II) v endocytické dráze a následně rozeznávané TCR na pomocných T buňkách s koreceptorem CD4 („T helper cell“ – Th). Druhým nezbytným signálem je kostimulace prostřednictvím inducibilních receptorů B7 rodiny, konkrétně CD80 a CD86 molekul, které se objeví ve velkém množství na aktivovaných a zralých APC po jejich stimulaci PRR (viz obrázek č. 2)<sup>20</sup>.



**Obrázek č. 2:** „Stranger“ a „danger“ model. DC jsou aktivované vazbou PAMP a DAMP na PRR. Po maturaci exprimují DC kostimulační molekuly CD80 a CD86 a vystavují Ag-peptidy navázané v komplexu s MHC glykoproteiny. Zároveň migrují do lymfatických uzlin, kde stimulují Ag-specifické T lymfocyty. Převzato z <sup>21</sup>

### **3.2. Imunogenita nádorových buněk**

Nádor je útvar tvořený buňkami vlastního původu, které se ovšem nekontrolovatelně množí. K nádorové transformaci buňky dochází následkem více dějů. Z nich je nejdůležitější deregulace buněčného cyklu a apoptózy jako následek objevení více řídících („driver“) mutací v protoonkogenech nebo tumor supresorových genech. To jsou většinou geny kódující proteiny zodpovědné za regulaci replikace a oprav DNA<sup>22</sup>. Během těchto procesů se na nádorových buňkách objevují stresem-indukované vlastní molekuly.

Nádorové buňky jsou vlastními buňkami organismu a v klidovém stavu nejsou primárně imunogenní, a to i přesto, že exprimují náhodně klonálně vzniklé mutované proteiny, takzvané neoAg, respektive jejich příslušné lineární neoepitopy. Imunitní odpověď není spuštěná v případech, kdy nádor tlumí aktivně celý IS nebo v případě, kdy není schopný aktivovat APC prostřednictvím jejich PRR. Pouze APC mají schopnost poskytnout imunokompetentním, ale nezkušeným lymfocytům nezbytné kostimulační signály<sup>4</sup>. Aktivace buněk přirozené imunity vazbou DAMP a PAMP molekul na PRR tedy nezbytně předchází iniciaci adaptivní protinádorové imunity a je zásadní pro identifikaci a následnou eliminaci nádorových buněk adaptivní částí IS. K úplné eliminaci nádorových buněk dochází až po rozeznání nádorově specifických Ag („tumor-specific antigens“ – TSA), které jsou jedinečné pro každý nádor a mezi které řadíme i výše zmíněné mutované neoepitopy, a nebo po rozeznání Ag asociovaných s nádory („tumor-associated antigens“ – TAA), které jsou prezentované jak transformovanými, tak i normálními buňkami<sup>23</sup>. V boji proti nádoru se koordinovaně uplatňují efektorové mechanismy přirozeného i adaptivního IS.

### **3.3. Mechanismy protinádorové imunitní odpovědi**

IS vyvíjí na nádorové buňky trvalý selekční tlak vedoucí k přežití takových nádorových buněk, které jsou schopné uniknout jeho mnohočetným efektorovým mechanismům. Tato hypotéza imunitního dohledu a editace nádoru má tři fáze: 1) eliminaci nádorových buněk, během které IS rozeznává a likviduje nádorově transformované buňky, 2) ustanovení rovnováhy mezi nádorovými buňkami a organismem, kdy nádorové buňky sice proliferují, ale jejich růst je omezován probíhající imunitní odpovědí, 3) mutacemi indukovaný vznik nových klonů nádorových buněk, které jsou schopné uniknout kontrole IS a v dlouhodobém procesu vývoje spontánních nádorů dokáží následně vytvořit silné imunosupresivní prostředí, které buňky IS účinně inhibuje, a to i na systémové úrovni. Zároveň však tyto klony náhodně vytváří i nové antigenní cíle (neoAg), které mohou být rozeznávané T buněčnými klony<sup>24</sup>.

Jedná se totiž o naprosto náhodné děje – jak mutace v nádorové buňce, tak i rekombinace TCR každého klonu T buněk.

Infiltrace nádoru imunitními buňkami může, ale nemusí vést k protinádorové imunitní odpovědi. Buňky IS mohou též ve stavu chronického zánětu podporovat vývoj nádoru od jeho počátku až po tvorbu metastáz. Vždy záleží na funkčním stavu a polarizaci konkrétních imunitních buněk<sup>25</sup>.

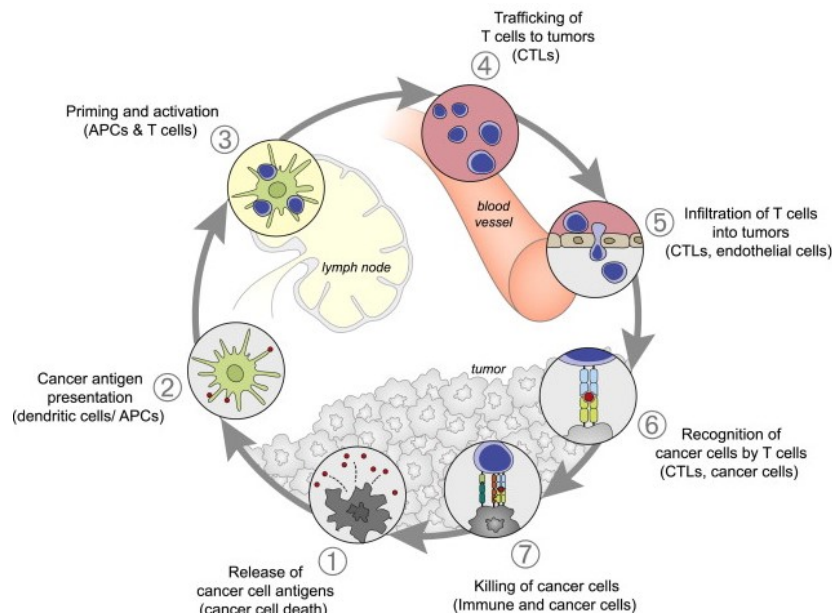
### 3.3.1. Přirozená imunita

O aktivaci buněk přirozené imunity rozhoduje bilance mezi signalizací z aktivačních a inhibičních receptorů. Během indukce protinádorové imunitní odpovědi jsou v rámci přirozeného IS účinné především mechanismy makrofágů a NK („natural killer“) buněk. Oba typy buněk disponují inhibičními receptory, které reagují na snížení exprese vlastních povrchových znaků jako častého následku nádorové transformace. Makrofágy fagocytují nádorové buňky po ztrátě inhibice SIRPA receptoru, který rozeznává normální vysokou expresi antifagocytické molekuly CD47 („don't eat-me“ signál), nebo po interakci s profagocytickými molekulami („eat-me“ signály), například po vazbě CALR na CD91. Makrofágy mohou následně prezentovat nádorové Ag na MHC-II a aktivovat tak Th buňky<sup>26</sup>, případně zkříženě prezentovat neoAg na MHC-I a aktivovat přímo Tc bez pomoci Th buněk<sup>27</sup>. Antifagocytický efekt má i nově popsany inhibiční receptor makrofágů LILRB1, který interaguje s MHC-I, respektive s  $\beta$ 2-mikroglobulinem<sup>28</sup>.

NK buňky jsou schopné rozeznat potenciálně nebezpečné buňky pomocí svých aktivačních a inhibičních receptorů. Reagují na nedostatečnou expresi MHC-I, která vyvolá aktivaci licencovaných NK buněk ztrátou signálu z inhibičních KIR receptorů (takzvaná „missing-self“ hypotéza)<sup>29</sup>. Naopak licencované i nelicencované NK buňky jsou schopné reagovat na produkci stresem indukovaných molekul (například MICA a MICB), které stimulují jejich aktivační receptory (například NKG2D)<sup>29</sup>. V obou případech dochází během aktivace NK buněk k jejich degranulaci a uvolnění cytotoxických proteinů indukujících v cílových buňkách apoptózu. Zároveň produkují IFN- $\gamma$ , který zpětně posiluje expresi MHC-II v makrofázích a DC a podílí se tím nepřímo na aktivaci buněk adaptivního IS. Makrofágy i NK buňky mohou být též aktivované vazbou nízkoafinního  $F_c\gamma$  receptoru CD16 na protilátky na nádorových buňkách. V tomto případě se jedná o takzvanou ADCC („antibody-dependent cellular cytotoxicity“) reakci<sup>29</sup>.

### 3.3.2. Adaptivní imunita

Během adaptivní protinádorové imunitní odpovědi se uplatňují především efektorové mechanismy T lymfocytů. Nezkušené T lymfocyty rozeznávají nádorové Ag nejdříve v MHC komplexu na APC v sekundárních lymfatických orgánech (především v uzlinách), kde dochází k jejich aktivaci, a poté přímo na nádorových buňkách (viz obrázek č. 3)<sup>30</sup>. Aktivované Tc zabíjejí nádorové buňky po rozeznání Ag na jejich povrchu dvěma hlavními mechanismy. Na svém povrchu exprimují ligandy (FasL a TRAIL), které po vazbě na takzvané „receptory smrti“ přítomné mimo jiné i na nádorových buňkách indukují jejich smrt, která má apoptotický charakter. Druhým efektorovým mechanismem Tc je exocytóza cytoplazmatických granulí, které obsahují cytolytické proteiny tvořící póry v membráně nádorových buněk (PRF1) a enzymy aktivující program apoptózy štěpením kaspáz (granzymy GZMA a GZMB)<sup>31</sup>. Jedná se tedy v principu o shodný mechanismus jako u NK buněk.



**Obrázek č. 3:** Imunitní reakce T lymfocytů proti nádoru. Cyklická reakce proti nádorům zahrnuje 7 hlavních kroků. Začíná uvolněním Ag z nádorových buněk a jejich prezentací na povrchu APC v lymfatických uzlinách T lymfocytům. Aktivované T lymfocyty poté putují do místa nádoru, kde rozeznávají nádorové buňky a zabíjejí je. Převzato z <sup>32</sup>

Th buňky jsou zodpovědné především za polarizaci odpovědi k prozánětlivému Th1 a Th17 typu a vytvářejí lokální cytokinové prostředí aktivující Tc (hlavně Tc1) a makrofágy typu M1, které následně zabíjejí a odstraňují nádorové buňky<sup>30</sup>.

Přestože B lymfocytům není připisovaná tak významná role během protinádorové odpovědi jako T lymfocytům, mohou fungovat lokálně v nádoru jako APC pro aktivované a paměťové Tc buňky, ale dokonce i sekretovat cytolytický GZMB či produkcí cytokinů

podporovat ostatní buňky IS<sup>33</sup>. ICD je však, co se týče adaptivní imunity, spojovaná pouze s indukcí T buněčné odpovědi, a proto není B buněčná odpověď v dalších kapitolách této práce zmiňovaná.

### 3.3.3. Suprese IS nádorem

Nádorové buňky dokáží aktivně navozovat imunosupresivní podmínky a ovlivnit tak buňky IS. Nádorové mikroprostředí se vyznačuje přítomností takových APC, které nejsou schopné efektivní kostimulace a zkřížené prezentace, ale naopak navozují toleranci T buněk, a to především produkcí supresivních cytokinů jako je například TGF $\beta$  („transforming growth factor  $\beta$ “) a ligandů inhibičních „checkpointů“. Stejnou funkci mají i s nádory asociované makrofágy („tumor-associated macrophage“ – TAM), které navíc přispívají i k tvorbě metastáz. Na IS působí inhibičně také nádory indukovaný vznik myeloidních supresorových buněk („myeloid-derived suppressor cells“ – MDSC), které nejsou schopné diferencovat do funkčních DC či do prozánětlivých makrofágů<sup>34</sup> a následně působí systémový útlum IS.

Supresorové T buňky („regulatory T cells“ – Treg) mají inhibiční efekt na APC, které v jejich přítomnosti snižují expresi kostimulačních ligandů a ztrácí schopnost aktivace Tc<sup>34</sup>. Na T lymfocytech mohou být exprimované i inhibiční receptory (takzvané inhibiční „checkpointy“), konkrétně CTLA4 a PD-1. Interakce s jejich ligandy (CD80, CD86 a PD-L1) inhibuje efektorové klony aktivovaných T lymfocytů v nádorovém mikroprostředí a tím i probíhající imunitní odpověď<sup>24</sup>. Přítomnost B buněk v nádoru je spojovaná s jeho progresí díky jejich podílu na vzniku angiogenního a prozánětlivého prostředí a na supresi aktivace Tc. Jimi produkované protilátky tvoří imunokomplexy s Ag a atrahují MDSC. Subpopulace regulačních B buněk též produkuje imunosupresivní cytokiny Il-10 a TGF $\beta$ , které jsou jinak produkované především Treg buňkami<sup>33</sup>.

## 4. Typy buněčné smrti a jejich vliv na aktivaci IS

Buňka je považovaná za mrtvou po ukončení buněčných procesů (například produkce ATP a udržování oxido-redukční homeostázy), porušení integrity PM a tedy ztrátě membránového potenciálu, nebo po fragmentaci buňky do tělísek jako v případě apoptózy<sup>8</sup>. Buněčné fragmenty jsou následně odstraňované profesionálními fagocyty – především neutrofily a makrofágy, ale i DC. Makrofágy degradují pohlcený materiál hydrolázami v lyzozomech, zatímco v DC není degradace kompletní a fragmenty Ag peptidů jsou preferenčně vystavované na povrchu v komplexu s MHC pro prezentaci T lymfocytům<sup>35</sup>.

Obecně se typy buněčné smrti dělí na tři skupiny: a) náhodnou buněčnou smrt, která je způsobená mechanickým, fyzikálním či chemickým poškozením a není regulovatelná molekulárními zásahy, b) regulovanou buněčnou smrt, kterou je možné ovlivňovat geneticky či farmakologicky, protože je stále kontrolovaná buněčnými mechanismy, c) programovanou buněčnou smrt, která je podskupinou regulované smrti a objevuje se za běžných fyziologických podmínek<sup>36</sup>.

Formy buněčné smrti spojené s uvolněním intracelulárních DAMP molekul do extracelulárního prostoru jsou schopné aktivovat přirozený IS přes PRR. Kromě nekrózy může docházet k uvolnění DAMP z cytoplazmy například i při pyroptóze<sup>37,38</sup>, nekroptóze<sup>39</sup> a ICD<sup>40</sup> (viz Tabulka č. 1).

#### **4.1. Senescence**

Při vyčerpání replikačního potenciálu buňky nebo při jejím stresu (například při poškození DNA) dochází k zastavení buněčného cyklu a buňka se i přes stálou metabolickou aktivitu přestává dělit. Senescence tak zabraňuje transformaci buňky na neomezeně se replikující nádorovou buňku, ale na druhou stranu se senescentní buňky mohou podílet na vytváření pronádorového prostředí sekrecí prozánětlivých cytokinů (IL-1, IL-6) a chemokinů (IL-8), růstových faktorů či faktorů remodelujících extracelulární matrix<sup>41</sup>.

#### **4.2. Nekróza**

Nekróza je prozánětlivý typ buněčné smrti charakterizovaný zvětšením objemu organel a celé buňky (onkózou), následným porušením integrity PM a rychlým uvolněním veškerého cytoplazmatického obsahu do extracelulárního prostoru. Nekróza není regulovaná, je to náhlá smrt způsobená vystavením buněk extrémním podmínkám či mechanickému poškození<sup>8</sup>.

#### **4.3. Ferroptóza**

Ferroptóza je regulovaná forma buněčné smrti charakterizovaná na železe závislou zvýšenou produkcí reaktivních kyslíkových radikálů („reactive oxygen species“ – ROS). ROS indukují vznik lipidových oxidů a peroxidů, které mají po akumulaci letální efekt. Buňky procházející ferroptózou mají nekrotický vzhled, pozorovat lze zmenšení mitochondrií a zvýšenou membránovou hustotu<sup>42</sup>. Ferroptóza je považovaná za nádorově supresivní typ smrti, protože dochází k eliminaci stresovaných a infikovaných buněk, či buněk postrádajících dostatek živin<sup>43</sup>.

#### 4.4. Nekroptóza

Nekroptóza je charakterizovaná granulací cytoplazmy a zvětšením objemu organel a celé buňky. Nejvíce prostudovaným induktorem tohoto typu smrti je prozánětlivý cytokin TNF („tumor necrosis factor“), který sice působí proapoptoticky po vazbě na specifický receptor TNFR1 (TNFRSF1A), který signalizuje přes adaptorové proteiny obsahující „death“ doménu, ale při vysoké koncentraci serin-threoninové RIP3 kinázy indukuje v buňce vytvoření takzvaného nekrosomu, který může obsahovat kromě RIP3 i RIP1. Pokud je aktivní apoptotická kaspáza 8, štěpí a inaktivuje tyto kinázy a k nekroptóze tedy nedochází<sup>44</sup>. Po autofosforylaci RIP3 kinázy fosforylují MLKL („mixed lineage kinase domain-like“) proteiny. Fosforylací aktivované MLKL oligomerizují a jsou translokované do PM, kde vytváří selektivní iontové kanály přispívající k finální lýze buňky zvýšením intracelulární osmolarity<sup>45</sup>. Konečným důsledkem vzniku těchto kanálů a následného poklesu intracelulární koncentrace K<sup>+</sup> iontů může být aktivace inflamazomu, kaspázy 1 a produkce IL-1 $\beta$ . Tato dráha však samotnou nekroptotickou smrt nepodmiňuje<sup>46</sup>.

#### 4.5. Pyroptóza

Pyroptóza je typ lytické programované buněčné smrti značně podobný nekroptóze. Dochází k ní především v profesionálních fagocytech, ale byla pozorovaná i u jiných typů buněk infikovaných intracelulárními patogeny. Je spojovaná s uvolňováním pyrogenů IL-1, IL-6 a TNF, které působením v hypotalamu indukují zvýšení tělesné teploty a spouští systémový zánětlivý proces<sup>47</sup>.

Pyroptóza je závislá na aktivaci kaspázy 1 či kaspázy 4 (CASP4) a 5 (CASP5), respektive kaspázy 11 (Casp4) v myších modelech<sup>48</sup>. Aktivovaná CASP4/5, respektive Casp4, štěpí pannexin 1 (PANX1), který následně tvoří kanály v PM sloužící k sekreci ATP. Vazba sekretovaného ATP na purinergní P2X7 receptory umírající buňky je pro pyroptózu zásadní<sup>49</sup>. PANX1 je štěpen i během apoptózy, u té se však jedná o následek aktivace kaspázy 3<sup>50</sup>. Kaspázy též proteolyticky štěpí gasdermin-D (GSDMD), který po oligomerizaci vytváří póry v PM<sup>51</sup>. Buňka se během pyroptózy nezvětšuje jako v případě nekroptózy, ale naopak dochází k jejímu zploštění, neboť póry nejsou selektivní jako MLKL kanály a nedochází tedy k výrazné změně intracelulární osmolarity<sup>51</sup>.

#### 4.6. Apoptóza a sekundární nekróza

Apoptóza je velmi komplexní a energeticky náročný proces závislý na aktivaci kaspáz – specifických cysteinových proteáz, a endonukleáz – enzymů štěpících DNA. Apoptóza iniciovaná vnitřní cestou je závislá na aktivaci apoptozomu v cytoplazmě po uvolnění

cytochromu C z mitochondrií. Apoptozom zahajuje kaskádovou reakci vedoucí k aktivaci efektorových kaspáz 3 a 7. To je krok, který nenávratně navede buňku do apoptózy<sup>52</sup>. Působením těchto enzymů dochází ke kondenzaci chromatinu a fragmentaci jádra (karyorrhexis), redukcii objemu cytoplazmy (pyknóze) a rozpadu buňky na membránou ohraničená apoptotická tělíska. Dalším znakem apoptotických buněk je ztráta asymetrického rozložení lipidů PM a vystavení fosfatidylserinu (PS) na extracelulární stranu PM, kde je rozeznávaný fagocyty jako jeden ze signálů pro pohlcení dané buňky fagocyty<sup>53</sup>. Konečnou fází apoptózy je rozpad buňky na takzvaná apoptotická tělíska ohraničená intaktní membránou. Tato membrána je stabilizovaná propojováním membránových proteinů transglutaminázou (TGM2)<sup>54</sup>, a proto nedochází k uvolnění intracelulárních DAMP. Apoptotická buňka tak vytváří tolerogenní prostředí a po jejím pohlcení DC stimuluje především produkci IL-10 a TGFβ podporujících vývoj supresorových Treg buněk<sup>55</sup>.

Pokud nejsou apoptotické buňky fagocytované, dochází k lytické prozánětlivé smrti, takzvané sekundární nekróze. Ta je pozorovatelná po 12-24 hodinách od iniciace apoptózy<sup>56</sup>. Přejít buňky do sekundární nekrózy je závislý na štěpení gasderminu E (GSDME) kaspázou 3 (CASP3) aktivovanou během apoptózy a na jeho následné translokaci do PM, kde tvoří póry. Sekundární nekróza je tedy typ programované nekrózy připomínající pyroptózu<sup>57</sup>. V jiné práci publikované o pár měsíců později však byla tato smrt určena přímo jako pyroptóza indukovaná apoptotickým stimulem<sup>58</sup>. Závěrem autorů této publikace je závislost typu smrti nádorových buněk indukované chemoterapeutiky na síle exprese GSDME. Pokud je jeho exprese vysoká, buňka umírá pyroptózou, zatímco při jeho nízké expresi buňka prochází apoptózou a následně sekundární nekrózou<sup>58</sup>.

#### **4.7. Imunogenní buněčná smrt (ICD)**

Dle definice jsou buňky procházející ICD schopné vyvolat po inokulaci do imunokompetentní, ale nikoliv do imunodeficitní myši cytotoxickou T buněčnou odpověď proti nádorovým Ag. Tato odpověď je zprostředkována uvolněním DAMP molekul z mrtvých buněk a jimi indukovanou maturací DC schopných zkříženou prezentací aktivovat Tc<sup>9,59</sup>.

ICD byla v souvislosti s nádorovou terapií poprvé popsána mezi lety 2005 a 2007<sup>59-61</sup>. Většina prací o tomto tématu pochází z laboratoří manželů Guido Kroemera a Laurence Zitvogel<sup>62,63</sup> a jejich studentů<sup>64,65</sup>. S jejich laboratořemi spolupracují vědci z pražské akciové společnosti SOTIO, a. s., která se věnuje nádorové terapii pomocí DC aktivovaných nádorovými buňkami, u kterých byla vyvolána ICD<sup>13,66,67</sup>. Další aktivní skupinou je belgická laboratoř Patrizie Agostinis<sup>68,69</sup>.

ICD je podmíněná časnou preapoptotickou externalizací chaperonu a „eat-me“ signálu CALR na PM, sekrecí ATP a uvolněním HMGB1 v pozdní fázi apoptózy. Doporučené způsoby jejich detekce a podmínky pro prohlášení buněčné smrti za ICD byly publikované výše zmíněnými laboratořemi v roce 2014<sup>9</sup>. V souvislosti s ICD jsou v literatuře zmiňované i další faktory, jako je například extracelulární přítomnost HSP70 a HSP90 či produkce IFN typu I, jejich detekce však není dle autorů tak zásadní a univerzální a v nastavených pravidlech jim tedy není věnována pozornost<sup>9</sup>.

ICD byla původně kvůli své závislosti na kaspázách prohlášena za typ apoptózy<sup>61</sup>. Již v prvním článku na toto téma je však uvedeno, že morfologie buněk zabitých apoptotickým induktorem doxorubicinem nevede k finální fragmentaci DNA, která je pro apoptotickou smrt typická<sup>60</sup>. Teorie ICD spoléhá v případě apoptotických buněk na jejich transformaci v sekundárně nekrotické neboť klíčový protein HMGB1 je z buněk uvolňován až po porušení integrity membrán<sup>9</sup>.

Původní práce byly prováděné převážně na myších nádorových liniích CT26 a MCA205, ve kterých nejsou exprimované RIP3 proteiny důležité pro nekroptotickou smrt<sup>70,71</sup>. V jiných buněčných liniích (TC-1 a EL4), které tyto proteiny exprimují<sup>72</sup>, nebo v CT26 linii po ektopické expresi těchto proteinů<sup>70</sup>, měla pozorovaná ICD právě nekroptotický charakter. V nedávné době tedy byla definice ICD upravená z imunogenní formy apoptózy na obecnější imunogenní programovanou buněčnou smrt<sup>8</sup>.

Vzhledem k charakteru testů pro detekci ICD je nutno poznamenat, že při inkubaci buněk vždy část z nich zemře nekrotickou smrtí<sup>61</sup> a její spoluúčast na aktivaci IS nebyla spolehlivě vyloučená. Za nekrotické jsou považované buňky s porušenou PM, tedy buňky pozitivní na značení DNA fluorochromy, například propidium jodidem či DAPI, které jsou z buněk s intaktní PM pumpované do vnějšího prostředí ABC transportéry. Možnost imunogenního efektu způsobeného samotnými nekrotickými buňkami byla považovaná za vyloučenou po pokusech, při kterých vyvolání nekrózy (rozmražením buněk po jejich smrti pomocí ICD induktoru) ničí imunogenní efekt ve vakcinačních testech<sup>60</sup>. Přestože nekróza je typ prozánětlivé smrti, nemá sama o sobě schopnost indukovat zkříženou prezentaci v DC a neslouží tedy jako zdroj Ag pro přímou aktivaci Tc<sup>73</sup>. Neschopnost nekrotických buněk indukovat aktivaci Tc byla též popsána ve studii věnující se přímo ICD<sup>70</sup> a dle autorů je právě toto důvodem závislosti ICD na iniciaci regulovaného programu buněčné smrti.

**Tabulka č. 1:** Základní charakteristiky vybraných typů buněčné smrti. PE = fosfatidylethanolamin, ER = endoplazmatické retikulum, SA β-Gal = β-galaktosidáza asociovaná se senescencí, PI3K = fosfatidylinositol-3-kináza, LDH = laktátdehydrogenáza, GPX4 = glutathion peroxidáza 4, SAS = sekretom asociovaný se senescencí

Typ smrti	Induktory	Morfologie	Molekulární dráhy	Diagnostika	Imunogenita
<b>Autofágie</b>	Nedostatek živin, poškození DNA nebo organel <sup>74</sup>	Váčky s dvojitou membránou (autofagozomy, autolyzozomy) <sup>74</sup>	Atg proteiny, PI3K, JNK <sup>74</sup>	LC3-II, p62 <sup>75</sup>	Ne
<b>Senescence</b>	Zkracování telomer, poškození DNA, stres, aktivace onkogenů <sup>76</sup>	Zvětšení buňky, granularizace cytoplazmy <sup>41</sup>	Zvýšená aktivita SA β-Gal <sup>41</sup>	Aktivní SA β-Gal, lipofuscin <sup>77</sup>	Ne, ale produkce prozánětlivých cytokinů (SAS)
<b>Nekróza</b>	Fyzické poškození, extrémní stresové podmínky	Zvětšení organel a buňky, ruptura membrán	Neregulovaný typ buněčné smrti	Uvolnění LDH z buňky <sup>78</sup> , porušená PM (značení DNA, proteinů) <sup>79</sup>	Ano, uvolnění DAMP
<b>Feroptóza</b>	Akumulace oxidovaných a peroxidovaných lipidů <sup>43</sup>	Zmenšení mitochondrií, zvýšená membránová hustota <sup>42</sup>	Oxidace a peroxidace lipidů, akumulace Fe, nefunkčnost GSH, GPX4, membránové estery polyenasycených MK <sup>43</sup>	Závislost na Fe	Ano (potenciální uvolnění DAMP, nebylo testováno <i>in vivo</i> ) <sup>8</sup>
<b>Nekroptóza</b>	TNF	Zvětšení organel a buňky, ruptura PM <sup>51</sup>	Indukce kináz RIP1, RIP3, MLK, inflamazomu a kaspázy 1 <sup>46</sup> , absence kaspázy 8 <sup>44</sup>	RIP1, RIP3, MLKL <sup>44</sup>	Ano, indukce zánětu
<b>Pyroptóza</b>	Infekce intracelulárními patogeny (cytosolický LPS) <sup>80</sup> , apoptotické induktory <sup>58</sup>	Zploštění cytoplazmy, pyroptotická tělíska, ruptura PM imunitních buněk <sup>51</sup>	Gasdermin D, inflamazom, kaspáza 1, kaspáza 4/5 <sup>48</sup> , pannexin-1 <sup>49</sup> , vylití pyrogenů (IL-1, TNF, IL-6)	Gasdermin D, kaspáza 1, kaspáza 4/5 <sup>48</sup>	Ano
<b>Apoptóza</b>	Vazba ligandu na receptory smrti (Fas, TRAILR), (granzym B), poškození DNA, stres ER, hypoxie, cytotoxické mediátory	Smrsknutí buňky, kondenzace chromatinu a cytoplazmy, fragmentace jádra, apoptotická tělíska, zabránění vylití DAMP <sup>81</sup>	Ztráta lipidové asymetrie (vystavení PS vně), ztráta membránového potenciálu <sup>8</sup> , uvolnění mitochondriálních proteinů (cytC), apoptozom, aktivace kaspáz (3,7,8) a DNáz <sup>82</sup> , aktivita transglutaminázy	Povrchová detekce PS, intaktní membrána, aktivní efektorové kaspázy <sup>79</sup>	Ne <sup>55,83,84</sup>
<b>ICD</b>	Chemoterapeutika, radioterapie, HHP, PDT, onkolytické viry <sup>12</sup>	Morfologie apoptotických <sup>9</sup> nebo nekroptotických buněk <sup>70</sup>	Fosforylace eIF2 $\alpha$ , sekrece ATP (skrže PANX1 kanály), pasivní uvolnění DAMP (HMGB1) <sup>40</sup>	Povrchová detekce CALR, extracelulární HMGB1, ATP, fosforylace eIF2 $\alpha$ <sup>9,85</sup>	Ano, uvolnění DAMP

## 5. Koncept ICD

Ukazuje se, že účinnost většiny konvenčních chemoterapeutik a cílených protinádorových léčiv nespočívá jen v přímých cytotoxických a cytostatických efektech, ale alespoň částečně spoléhá na reaktivaci protinádorové imunitní odpovědi. Chemoterapie může teoreticky vyvolat odpověď IS zvýšením imunogenity maligních buněk nebo inhibicí imunosupresivních podmínek v mikroprostředí nádoru<sup>86</sup>.

Teorie ICD je založena na tom, že po indukci smrti nádorových buněk určitými typy terapie dochází k povrchové externalizaci CALR z ER, k sekreci cytoplazmatického ATP a k pozdějšímu uvolnění jaderného HMGB1 z buněk. Tyto DAMP molekuly mohou aktivovat buňky přirozeného imunitního systému vazbou na příslušné receptory, které po signalizaci zvyšují membránovou expresi kostimulačních molekul a při současné produkci prozánětlivých cytokinů jsou schopné indukovat adaptivní protinádorovou odpověď zprostředkovanou přítomnými nádorově specifickými T lymfocyty<sup>59–61,87</sup>.

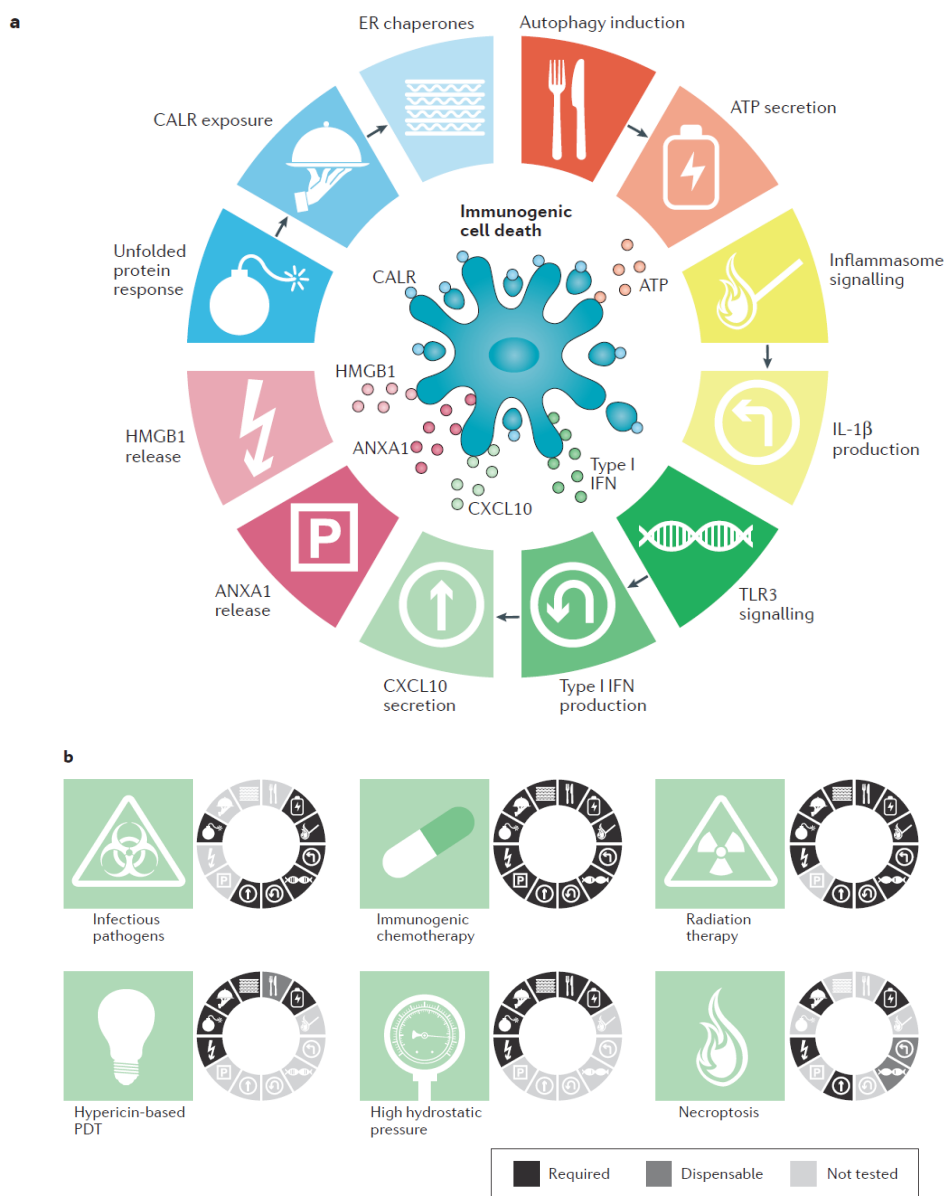
K ověření imunogenity buněčné smrti *in vitro* se využívá především detekce IFN $\gamma$  produkovaného Tc, která je považována za důkaz jejich aktivace. Není to však jediný znak a velmi záleží i na koprodukcí dalších cytokinů (IL-2 a TNF) a přítomnosti supresivních cytokinů IL-10 a TGF $\beta$ <sup>88</sup>, které jsou v některých pracích ověřované<sup>13</sup>, ale mnohdy se jimi další laboratoře vůbec nezabývají.

K funkčnímu ověřování ICD v *in vivo* podmínkách se využívají vakcinační testy s nádorovými buňkami aplikované na myší modely, které jsou podrobně popsány v kapitole 6. Za *in vivo* testování jsou též považované vakcíny DC aktivovaných *ex vivo* nádorovými buňkami a následně injikované do syngenních imunokompetentních myší. V klinických testech se sleduje pouze přítomnost ICD markerů a korelace jejich množství v nádoru po léčbě s vývojem klinického stavu pacienta.

### 5.1. Induktory ICD

Mezi induktory ICD patří klinicky využívaná chemoterapeutika bleomycin, bortezomib, cyklofosfamid<sup>89</sup>, doxorubicin, epirubicin, idarubicin, mitoxantron a oxaliplatin<sup>90</sup>. ICD je spojovaná i s radioterapií<sup>59</sup>, virovou terapií<sup>91–93</sup>, fotodynamickou terapií („photodynamic therapy“ – PDT)<sup>68,94,95</sup> či terapií HHP<sup>13</sup>, dále pak s rostlinným barvivem shikoninem<sup>96</sup>, heterocyklickým derivátem chinonu R2016<sup>97</sup> či EGFR-specifickou protilátkou cetuximabem<sup>98</sup>. Jedná se tedy o různé způsoby přípravy buněk od chemického působení přes

záření až po mechanické poškození buněk. Průběh ICD je charakteristický uvolněním konkrétních DAMP molekul, které se liší v závislosti na typu induktoru (viz obrázek č. 4).



**Obrázek č. 4:** a) Znaky nutné pro imunogenitu buněčné smrti při použití odlišných ICD induktorů. S imunogenitou buněčné smrti jsou spojené procesy jako UPR a následné vystavení CALR a jiných chaperonů na buněčný povrch, aktivace autofágie a následná sekrece ATP, nebo uvolnění HMGB1 a annexinu A1. Součástí odpovědi na ICD je uvolnění IL-1 $\beta$  po aktivaci inflamazomu a aktivace TLR3 vedoucí ke spuštění IFN-I odpovědi a následné produkci chemokinu CXCL10. b) Odlišné typy ICD jsou asociované s emisí odlišných DAMP z umírajících buněk. Černé – nepostradatelné děje; tmavě šedivé – postradatelné děje; světle šedé – netestované. Převzato z <sup>10</sup>

Vzhledem k tomu, že induktory nesdílejí strukturální podobnost, nelze účinnost těchto látek predikovat a prokázanou účinnost nelze zobecňovat, protože efekt jednoho induktoru se může lišit i v rámci odlišných buněčných linií<sup>98</sup>.

U všech popsaných apoptotických induktorů je s ICD spojený stres ER<sup>17</sup>. Většina induktorů necílí primárně na ER, ale působí spíše na jaderné či cytoplazmatické proteiny. Takové induktory řadíme mezi ICD induktory typu I, tedy látky, které způsobují s ICD asociovaný stres ER až sekundárně, například v rámci reakce na poškození DNA. Do této skupiny patří chemoterapeutika, terapie ozářením, či HHP. Naproti tomu ICD induktory typu II cílí přímo na ER a indukují apoptózu právě narušením jeho homeostázy a spuštěním stresové odpovědi – do této kategorie řadíme PDT<sup>68,94,95</sup> a onkolytické viry<sup>91–93</sup> (viz Tabulka č. 2). Induktory typu II indukují vystavení většího množství DAMP a jejich externalizace během preapoptické fáze probíhá rychleji právě z důvodu přímého působení na ER<sup>95</sup>.

**Tabulka č. 2:** Klinicky relevantní ICD induktory. Upraveno podle <sup>17</sup>

Typ ICD induktoru	Induktor	Efektorový mechanismus	Indukce stresu ER
Typ I	Bleomycin	Poškození DNA	není známo
	Bortezomib	Inhibitor proteazomu	porušení s ER asociované degradační dráhy
	Cyklofosfamid	Alkylační agens	není známo
	Doxorubicin	Interkalace do DNA	produkce ROS
	Epirubicin	Interkalace do DNA	produkce ROS
	Idarubicin	Interkalace do DNA	produkce ROS
	Mitoxantron	Interkalace do DNA	produkce ROS
	Oxaliplatin	Alkylační agens	produkce ROS
	Radioterapie	Poškození DNA	produkce ROS
Typ II	Hypericin-PDT	Indukce oxidativního stresu a poškození ER membrán	produkce ROS
	Onkolytické viry	Lýza maligních buněk	nadprodukce virových proteinů v ER

## 5.2. Proteiny asociované s membránami

ICD je asociovaná s externalizací chaperonů CALR, ERP57 (PDIA3), HSP70 (HSPA1A) a HSP90 (HSP90AA1). Chaperony jsou obecně přítomné ve všech kompartmentech buňky a jejich funkcí je kontrola správného sbalování proteinů po jejich syntéze a asistence při chybách v tomto procesu. Chaperony vystavené na povrch buněk nebo uvolněné do extracelulárního prostoru jsou často v komplexu s peptidy, protože se účastní vazby antigenních peptidů na MHC-I molekuly v ER, a zároveň mají funkci DAMP. Po vazbě chaperonů na CD91 dochází k receptorem zprostředkované endocytóze a případné prezentaci s nimi asociovaných peptidů na povrchu APC v komplexu s MHC-I a MHC-II<sup>99</sup>.

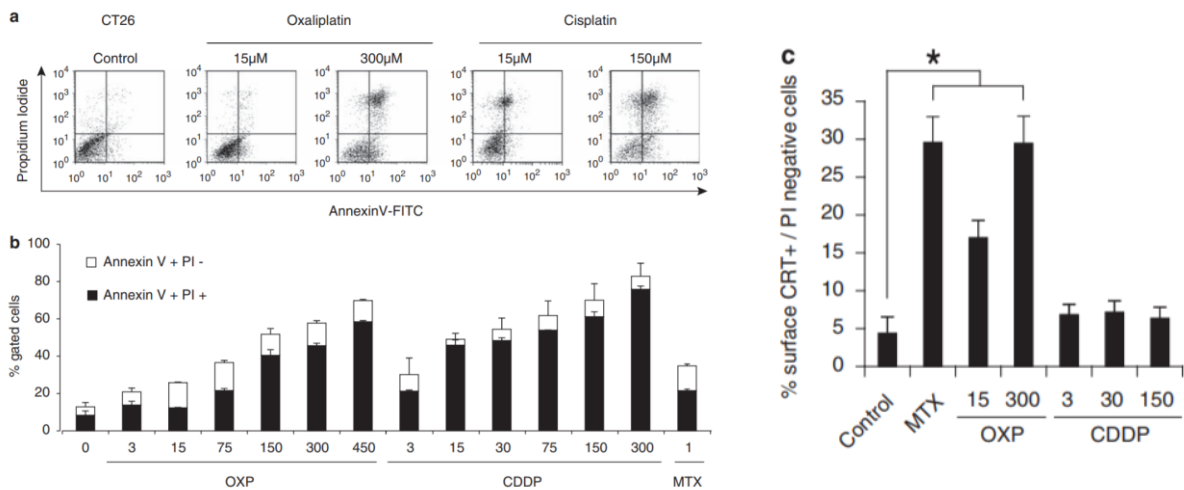
### 5.2.1. CALR a ERP57 (PDIA3)

CALR je za fyziologických podmínek přítomný v lumenu ER, kde plní funkci chaperonu a podílí se na pufovacím systému  $\text{Ca}^{2+}$  iontů<sup>100</sup>. Byl první na membránu vázanou molekulou, která byla identifikovaná jako rys odlišující imunogenní formu buněčné smrti od té tolerogenní<sup>61,63</sup>. CALR plní roli profagocytického („eat-me“) signálu a jeho výsledný efekt na pohlčení buňky je závislý na síle koexprese antifagocytických molekul, především CD47<sup>101</sup>.

Vazba CALR na membránu může být zprostředkovaná  $\text{Ca}^{2+}$  dependentní interakcí kyselé C-terminální domény s PS na povrchu apoptotických buněk<sup>102</sup>. Z dat naměřených při pokusech s ICD však vyplývá, že k vystavení CALR dochází v preapoptotické fázi, tedy ještě před extracelulárním objevením PS<sup>11</sup>. V této fázi apoptózy CALR též zprostředkovává opsonizaci buňky interakcí s komplementovým C1q proteinem<sup>103</sup>. Dominantní vazba CALR na membránu byla popsána skrze CD91 protein, při jehož depleci je CALR ve větší míře sekretovaný do prostředí<sup>68</sup>. Přítomnost CD91 na makrofázích ovlivňuje jejich schopnost efektivně pohlcovat apoptotické buňky a přítomnost na DC je zásadní pro jejich maturaci<sup>104</sup>. Interakce CD91 a CALR byla potvrzena například při testech na CD47<sup>-/-</sup> MOLM13 buňkách akutní myeloidní leukémie, jejichž robustní fagocytóza je inhibovatelná právě blokací interakce mezi těmito proteiny<sup>101</sup>.

CALR je po vystavení buněk antracyklinovým chemoterapeutikům nebo  $\gamma$ -záření transportovaný anterográdně z ER, přes GA až na PM<sup>105</sup> spolu s ERP57, kde je lze detekovat přibližně po jedné hodině od vystavení buněk ICD induktorům. Pokud je narušena translokace CALR, nedojde k vystavení ERp57 a *vice versa*<sup>106</sup>. Vystavení CALR je podmíněné fosforylací eIF2 $\alpha$  kinázou PERK a přítomností kaspázy-8<sup>65,68,85</sup>. Při PDT, tedy iniciaci ICD induktorem typu II, dochází k membránové translokaci CALR nezávisle na ERp57 a fosforylaci eIF2 $\alpha$ <sup>107</sup>. Dalším popsaným proteinem translokovaným spolu s CALR během ICD je lysyl-tRNA syntetáza (KARS)<sup>62</sup>.

Detekce CALR se provádí pomocí průtokové cytometrie (značení buněk specifickými protilátkami a vyloučení mrtvých buněk z analýzy), preapoptotickou biotinylací povrchových proteinů a následnou analýzou pomocí imunoblotu, nebo fluorescenčním mikroskopem<sup>9</sup>. I přes zásadní význam CALR pro ICD je při cytometrických analýzách v *in vitro* testech často detekovaný pouze na minoritní části buněk a zároveň i na části kontrolních buněk. Procento CALR-positivních buněk je popisované na škále 23-60 % a liší se v závislosti na koncentraci použitého terapeutika<sup>63</sup> (viz obrázek č. 5), na typu induktoru a na buněčné linii<sup>108</sup>.



**Obrázek číslo 5:** Porovnání účinku cisplatiny a oxaliplatiny na vystavení CALR na CT26 buňkách. a) Značení mrtvých (Propidium jodid) a apoptotických (Annexin V) buněk. b) Zastoupení apoptotických (Annexin V<sup>+</sup> PI<sup>-</sup>) a mrtvých (Annexin V<sup>+</sup> PI<sup>+</sup>) buněk po 4 hodinové inkubaci s oxaliplatinou (OXP), cisplatinou (CDDP) a mitoxantronem (MTX) v uvedených μM koncentracích. Z grafů a) a b) je vidět, že cisplatin je toxickejší a zabíjí tedy větší část buněk, což se projevuje nižším procentuálním zastoupením apoptotických buněk. Tento rozdíl se může projevit v nižších procentech kalretikulín (CRT)-pozitivních buněk v grafu c), který zobrazuje pouze živé a apoptotické buňky. Buňky byly před značením fixované 0,25% paraformaldehydem. Převzato z <sup>63</sup>

K posouzení vlivu ektopické povrchové exprese CALR na buňky IS bez přítomnosti dalších DAMP asociovaných s ICD byly vytvořené myší buňky akutní myeloidní leukémie („acute myeloid leukemia“ – AML) (C1489), které na svém povrchu silně exprimují CALR vázaný pomocí GPI kotvy. Tato pouhá konstitutivní exprese CALR zajistila ochranu při podkožní (s.c.) nebo intravenózní (i.v.) aplikaci AML buněk u 70-90 % myší a u přeživších jedinců zajistila 100% paměť. Tento efekt byl závislý na přítomnosti T buněk a produkci IFN typu I. Bez indukce buněčné smrti bylo na tomto modelu prokázáno, že CALR nemá v *in vivo* experimentu přímý vliv na maturaci DC ani na zkříženou prezentaci Ag *in vitro*, ačkoli výrazně prodlužuje dobu přežití myší po inokulaci CALR-silně pozitivních buněk. Fagocytóza AML buněk byla zprostředkována CD11c<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> DC více než CD11b<sup>+</sup> makrofágy, ale rozdíl v jejich pohlcování oproti kontrolním CALR<sup>-</sup> buňkám nebyl výrazný. Navíc zde nebyl provedený kontrolní experiment s ablací makrofágů. V *in vivo* modelu je složité tak komplexní proces, jaký ICD představuje, popsat bez všech kontrol. Vysoká imunogenita CALR<sup>+</sup> buněk v *in vivo* myším modelu je tedy podmíněná přítomností CD8α<sup>+</sup> CD11<sup>+</sup> DC a Ag-specifického T buněčného klonu a zároveň indukcí produkce IFN typu I, ovšem v *in vitro* experimentech nebyla patrná žádná závislost na úrovni exprese CALR při indukci T buněčné odpovědi – ta je závislá pouze na přítomnosti Ag v kultuře<sup>109</sup>. Ve svém komentáři G. Kroemer říká, že samotná přítomnost CALR na buňkách nedokáže vysvětlit rozdíly v progresi nádorů a

přežívání pozorované v předchozích experimentech. Poukazuje na nutnost identifikace molekulárních mechanismů vedoucích k produkci IFN typu I a ověření, zda se další DAMP molekuly podílejí na zde získaných výsledcích<sup>110</sup>.

CALR může sloužit jako potenciální biomarker v některých nádorech (v této studii se jednalo o nemalobuněčný karcinom plic). Vzorky z pacientů vykazují vysokou heterogenitu v expresi CALR, jehož úroveň však koreluje s délkou přežití pacienta<sup>66</sup>.

### 5.2.2. HSP

Přesto, že HSP nejsou přímo klasifikované jako DAMP molekuly, které obecně podmiňují ICD<sup>9</sup>, byl v souvislosti s ICD terapií popsán efekt HSP60, HSP70 a HSP90 v několika *in vitro* experimentech<sup>13,67,107,111,112</sup>. Kromě CD91 receptoru, který se však neřadí mezi PRR, ale takzvané „scavenger“ receptory, mohou HSP60 a HSP70 interagovat i s PRR, takzvanými „toll-like“ receptory TLR2 (HSP60) a TLR4 (HSP60, HSP70). Tato pozorování však musíme brát s rezervou, neboť HSP mohou vázat i PAMP, například LPS, a může jít tedy o nepřímou interakci<sup>113</sup>.

Bortezomib, chemoterapeutikum inhibující 26S podjednotku proteazomu, indukuje apoptózu a mírné zvýšení povrchové exprese HSP90 na nádorových buňkách v *in vitro* pokusech s liniemi U266<sup>67</sup> a HM-1<sup>112</sup>. HSP90 byl detekovaný na membráně buněk i při použití induktoru nekrózy Rose Bengal<sup>111</sup>. Při inhibici HSP90 protilátkami na povrchu ICD-indukovaných buněk nedochází v *in vitro* testech k maturaci DC a následné aktivaci protinádorových T lymfocytů ověřované detekcí produkce IFN- $\gamma$ <sup>67</sup>. U PDT indukce byla přítomnost HSP70 prokázána na T24 buňkách<sup>107</sup> a následně spolu s HSP90 i na OV90 buňkách vystavených HHP<sup>13</sup>. Pro aktivaci DC je důležitý přímý kontakt s nádorovou buňkou<sup>13</sup> a HSP tedy musí být asociované s PM.

Při detekci HSP v souvislosti s ICD byly získané i negativní výsledky. Při použití doxorubicinu (linie CT26) a radioterapie (linie EG7) nebyl HSP70 detekován na membráně buněk ani v supernatantu<sup>59</sup>. Vystavení konkrétních HSP se tedy liší v závislosti na buněčné linii a použitém induktoru, ne vždy jejich přítomnost podmiňuje imunogenitu buněčné smrti.

### 5.3. Solubilní molekuly a proteiny

Nejen povrchová exprese DAMP, ale i jejich uvolnění do extracelulárního prostředí může vést k aktivaci buněk přirozeného imunitního systému. Během ICD byla popsána role ATP, HMGB1, ANXA1 a IFN typu I.

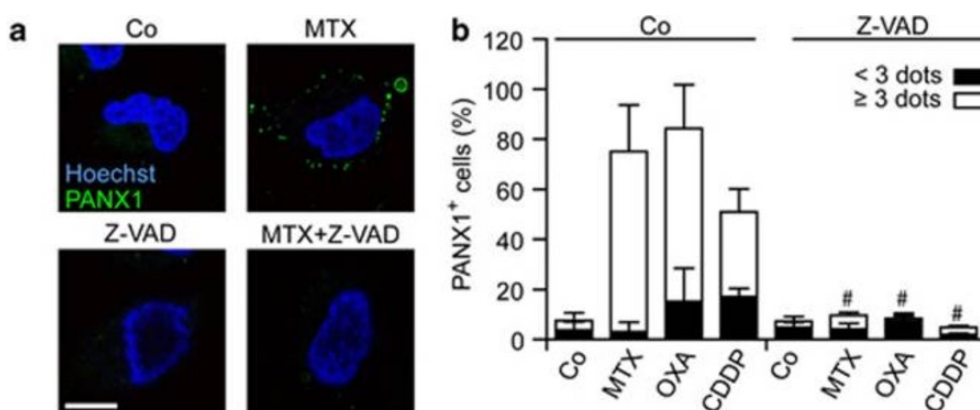
### 5.3.1. ATP

Mezi intracelulární (mM) a extracelulární (nM) koncentrací ATP je rozdíl 6 řádů a při jeho uvolnění z buňky tedy dochází k rychlé a výrazné změně. ATP se může vázat na dva typy takzvaných purinergních receptorů: P2X7 a P2Y2. P2X7R jsou iontové kanály, které následkem vazby ATP ztrácejí selektivitu pro kationty ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) a zvyšují svou vodivost, a tedy i celkovou permeabilitu membrány. P2Y2R jsou receptory spřažené s G proteiny, které iniciují uvolnění  $\text{Ca}^{2+}$  do cytoplazmy<sup>114</sup>.

Vazba extracelulárního ATP na metabotropní P2Y2 receptory fagocytů zprostředkovává jejich atrakci k apoptotickým buňkám<sup>115</sup>. P2X7 receptory na DC a makrofázích spouští po vazbě ATP signalizaci vedoucí k aktivaci NLRP3 inflamazomu, kaspázy 1 a tvorbě prozánětlivého  $\text{IL-1}\beta$ <sup>64,116</sup>. Deplece ATP nebo přítomnost apyrázy štěpící ATP na AMP a pyrofosfát ničí v experimentech schopnost umírajících buněk vyvolat lokální imunitní odpověď při léčbě oxaliplatinou<sup>64</sup> a při léčbě mitoxantronem brání infiltraci nádoru lymfocyty<sup>117</sup>. Stejný efekt má absence purinergních receptorů v „knock-out“ C57BL/6 myším modelu<sup>64,117</sup>.

Sekrece ATP během smrti vyvolané ICD induktory typu I je závislá na aktivaci kaspáz a autofágii. Aktivace kaspázy 3 podmiňuje translokaci pannexinu-1 (PANX1) do PM, kde tvoří selektivní kanály pro ATP po vystavení buněk chemoterapeutikům<sup>50</sup>. Tento způsob sekrece byl pozorovaný u apoptotických<sup>118</sup> i pyroptotických<sup>49</sup> buněk. PANX1 kanály byly detekované pomocí imunoblotu<sup>118</sup>. Jejich přítomnost v membráně byla po inkubaci buněk s mitoxantronem pozorovaná i mikroskopicky (viz obrázek č. 6)<sup>50</sup>.

Autofágie je důležitá pro udržení zásob ATP v  $\text{LAMP1}^+$  („lysosomal-associated membrane protein 1“) lyzozomech, autolyzozomech a autofagolyzozomech. Jejich exocytózou dochází během ICD k sekreci ATP a tedy k vystavení lyzozomálního LAMP1 proteinu na povrch buněk<sup>50,119</sup>. PANX1 kanály zprostředkovávají uvolnění ATP i nezávisle na autofágii, ale samy o sobě pro efektivní sekreci nestačí a akumulace ATP v lyzozomech a jejich exocytóza je tedy z pohledu ICD zásadní<sup>50</sup>.



**Obrázek č. 6:** Detekce PANX1 kanálů. a) Povrchová exprese PANX1 kanálů (zeleně) po inkubaci buněk s mitoxantronem (MTX), inhibitorem kaspáz (Z-VAD) a mitoxantronem spolu s inhibitorem kaspáz (MTX+Z-VAD). Buňky byly nejprve povrchově označeny protilátkou, poté fixovány 3,7% formaldehydem a následně byla označena DNA – 1 $\mu$ g/ml Hoechst 33342. Analýza provedená konfokálním mikroskopem nerozlišuje značení živých a mrtvých buněk, kterých je po působení chemoterapeutik většina, a které mohou být obarvené protilátkou i intracelulárně. Z-VAD je inhibitorem apoptózy, a proto bude procento mrtvých buněk po jeho působení zásadně nižší. Kontrola životnosti buněk nebyla v práci dokumentována. Tímto testem proto nelze jednoznačně prokázat povrchovou expresi. Navíc v tomto testu induktory ICD MTX a oxaliplatin (OXA) působí podobně jako cisplatin (CDDP), která ICD neindukuje. b) Procento PANX1 pozitivních buněk po inkubaci s MTX, OXA a CDDP, bez chemoterapeutik (Co) a s inhibitorem kaspáz (Z-VAD), který blokuje apoptózu. Převzato z<sup>50</sup>

U Hypericin-PDT byla popsána závislost sekrece ATP na kaspáze-8<sup>120</sup>, která však byla v dřívější studii určena jako postradatelná pro tento typ indukce ICD *in vivo*<sup>68</sup>. I přes zablokování efektu ATP použitím apyrázy nebo inhibicí funkce P2X7 receptoru oxidovaným derivátem ATP byly vakcinační testy úspěšné v 70 % případů, což naznačuje, že sekrece ATP neurčuje imunogenitu tohoto typu buněčné smrti. K významné redukci imunogenity došlo pouze při použití kombinace apyrázy a současné inhibici receptoru oxidovaným ATP, nejspíše tedy existuje jistá úroveň redundance na úrovni purinergních receptorů i samotného ATP<sup>120</sup>.

Na PM Treg buněk<sup>121</sup>, nádorových buněk a jimi produkovaných exosomech<sup>122</sup> jsou exprimované difosfohydroláza CD39 a 5'-nukleotidáza CD73. CD39 hydrolyzuje ATP i ADP na AMP a CD73 následně hydrolyzuje AMP na adenosin. Adenosin má na rozdíl od ATP imunopresivní účinky. Hromadí se v nádorovém mikroprostředí, kde účinně inhibuje proliferaci protinádorových Tc a vazbou na A2 adenosinové receptory indukuje jejich apoptózu<sup>122,123</sup>. Při expresi CD39 na MCA205 buňkách jsou vakcinační testy neúspěšné,

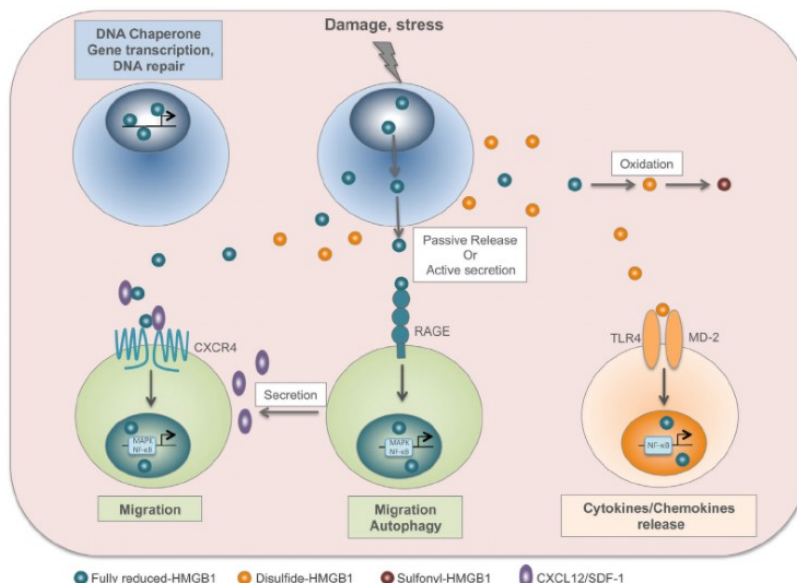
přítomnost CD39 je tedy dostačující pro inhibici imunogenního efektu buněčné smrti při léčbě mitoxantronem, což potvrzuje význam ATP pro ICD<sup>124</sup>. Zvýšená exprese CD73 nemá vliv na léčbu v myších bez adaptivního IS (Rag1<sup>-/-</sup>), ale v imunokompetentních modelech (C57BL/6) je spojená s vývojem chemorezistence. V klinických testech je vysoká exprese CD73 asociovaná s horší prognózou při léčbě antracyklinovými chemoterapeutiky (například doxorubicinem)<sup>125</sup>.

### 5.3.2. HMGB1

HMGB1 je jaderný nehistonový protein patřící mezi DAMP molekuly, který se váže na DNA, přispívá k její organizaci a účastní se regulace genové exprese. HMGB1 může být v dlouhodobě stresovaných buňkách aktivně translokovaný do cytoplazmy, kde působí proautofagicky<sup>126</sup>. Pasivně je HMGB1 uvolňovaný z buněk procházejících nekrotózou<sup>127</sup>, nekroptózou<sup>128</sup> a pyroptózou<sup>129</sup> nebo z buněk v pozdní fázi apoptózy<sup>130</sup>. Uvolnění HMGB1 z buněk během ICD vyžaduje permeabilizaci jaderné membrány i PM, ke které dochází například během sekundární nekrotózy<sup>9,59</sup>.

HMGB1 protein obsahuje cysteiny na pozicích 23, 45 a 106 a vliv na buňky IS je závislý na stavu jeho oxidace. Plně redukováná forma (rHMGB1) se váže na prozánětlivý receptor RAGE, nebo tvoří komplexy s chemokinem CXCL12, které mají po interakci s CXCR4 receptorem monocytů funkci chemoatraktantu. Pokud je Cys106 redukováný a zároveň Cys23 tvoří disulfidickou vazbu s Cys45 (dHMGB1), dochází k jeho vazbě na TLR4, stimulaci NF- $\kappa$ B dráhy a k následné sekreci prozánětlivých cytokinů TNF, interleukinu-6 (IL-6) a chemokinu CXCL8 (IL-8) (viz obrázek č. 7)<sup>131</sup>. U plně oxidovaného HMGB1 (oHMGB1) byl popsán proapoptotický efekt<sup>132</sup>.

Přestože v pozdní fázi apoptózy dochází v důsledku sekundární nekrotózy k uvolňování HMGB1 z buněk, produkované ROS oxidují Cys106 a inhibují tak imunostimulační účinky proteinu<sup>130</sup>. Naopak HMGB1 uvolněný z buněk procházejících imunogenními formami smrti tuto vlastnost má. V práci popisující kinetiku oxidace HMGB1 bylo ukázáno, že poločas života rHMGB1 je v lidském séru pouhých 17 minut, v kultivačním médiu s 10% sérem je to 25 minut, zatímco v kultivačním médiu bez séra při 95% konfluenci buněk je to 201 minut. Platí, že čím větší konfluenci kultivovaných buněk, tím pomalejší je proces oxidace v důsledku narůstající míry hypoxie<sup>133</sup>. Uvolněný rHMGB1 během inkubace nádorových buněčných linií s chemoterapeutiky je tedy v extracelulárním prostředí relativně rychle oxidovaný a jeho imunostimulační efekt je inhibovaný.



**Obrázek č. 7:** Redox-citlivá DAMP molekula HMGB1: V jádře má plně redukovaná forma HMGB1 (rHMGB1) funkci chaperonu a přispívá k transkripci genů a opravě DNA. Migrace buněk, sekrece CXCL12 a autofágie jsou indukované přítomností právě této formy. Aktivní sekrecí nebo oxidací rHMGB1 se do extracelulárního prostoru dostává dHMGB1, který interakcí s TLR4/MD-2 komplexem indukuje uvolnění cytokinů a chemokinů. Po terminální oxidaci cysteinů na sulfonáty HMGB1 ztrácí funkci chemoatraktantu i induktoru produkce cytokinů. Převzato z <sup>5</sup>

Přestože dHMGB1 je schopný interagovat s TLR2 i TLR4, jako relevantní pro ICD-dependentní adaptivní imunitní odpověď byla popsána pouze signalizace přes TLR4 na povrchu DC, která v těchto buňkách reguluje zpracování a prezentaci Ag nádorových buněk inhibicí jejich destrukce v lyzozomech<sup>59</sup>.

Přítomnost celkového HMGB1 je v pracích zabývajících se ICD detekovaná v supernatantu buněk pomocí imunoblotu<sup>59</sup> či ELISA testu<sup>59,63,111,134,135</sup>. HMGB1 je uvolňovaný i z kontrolních buněk, pouze v menším množství, a je detekovatelný i v supernatantu buněk vystavených cisplatině, která ICD neindukuje<sup>59</sup>.

Přestože HMGB1 je DAMP molekula přispívající k indukci imunitní odpovědi, v kontextu chronicky zánětlivého mikroprostředí nádoru může mít i opačný efekt. Množství HMGB1 korelující s růstem nádoru a tvorbou metastáz bylo například potvrzeno v práci, která, na rozdíl od ostatních, identifikuje doxorubicin nikoli jako induktor ICD, ale induktor imunogenní nekrózy v CT26 buňkách<sup>136</sup>. Autoři zde popisují proautofagické působení rHMGB1 na nádorové buňky vedoucí k jejich dlouhodobějšímu přežívání, naopak oHMGB1 indukuje v buňkách apoptózu. Oxidoredukční stav HMGB1 tedy určuje nejen efektivitu protinádorové terapie, ale také typ buněčné smrti. Nicméně tento stav není v studiích

zohledňován, používané HMGB1 specifické protilátky nejsou prokazatelně selektivní jen pro jednu formu a nelze je tedy spolehlivě rozlišit. Autoři ve svých závěrech vycházejí z toho, že pro ICD je zásadní interakce HMGB1 s TLR4, na který se váže pouze ve formě dHMGB1<sup>59,137</sup>.

### 5.3.3. Annexin A1 (ANXA1)

Annexin A1 (ANXA1) je cytoplazmatický protein, který je schopen po vazbě Ca<sup>2+</sup> iontů interagovat s fosfolipidy v membráně. ANXA1 byl detekovaný na povrchu časně apoptotických buněk, kde byla popsána jeho role v kontaktní supresi aktivace DC při pohlcování apoptotických tělísek<sup>138</sup>.

ANXA1 však může interakcí s fMLP receptorem (FPR1) na DC indukovat expresi genů důležitých pro produkci IFN typu I, maturaci DC a zpracování a prezentaci Ag. Terapeutický efekt mitoxantronu, doxorubicinu a oxaliplatinu je v myších modelech závislý na sekreci ANXA1 z nádorových buněk a na přítomnosti FPR1 na APC. Při použití Fpr1<sup>-/-</sup> DC nedochází k iniciaci adaptivní imunitní odpovědi, neboť takové DC nemigrují směrem k umírajícím nádorovým buňkám nevytváří s nimi stabilní kontakty a nejsou tedy schopné pohltit nádorové Ag a prezentovat je T lymfocytům<sup>139</sup>. Relevance ANXA1 v kontextu ICD nebyla ověřena v žádné jiné práci a tyto výsledky tak zůstávají nepotvrzené a kontroverzní vzhledem k jeho možnému imunosupresivnímu efektu.

## 6. Experimentální průkaz ICD v *in vivo* transplantačních modelech

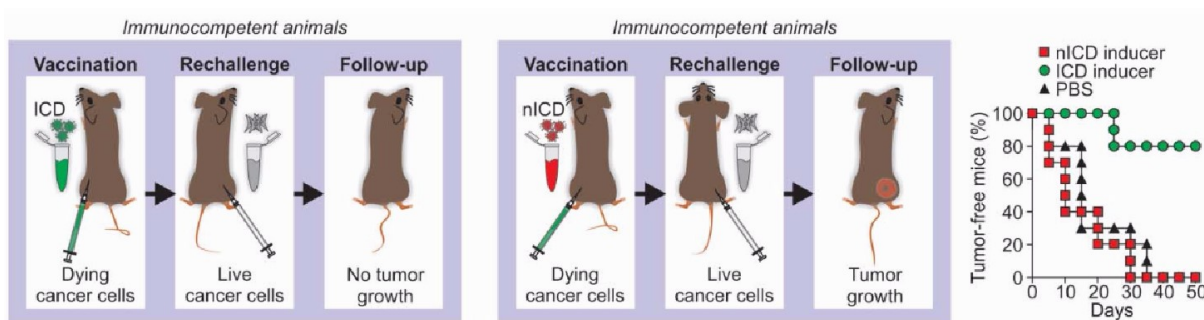
### 6.1. Indukce ICD v myších nádorových liniích aplikovaných do syngenních imunokompetentních modelů

Výzkum ICD se provádí především na transplantačních myších modelech s použitím různě ovlivněných nádorových buněk. Nádorové linie jsou relativně homogenní populace, které jsou sice schopné vytvořit nádor, nicméně neodrážejí heterogenitu charakteristickou pro spontánní nádory vyvíjející se dlouhodobě pod dohledem IS, která vede k vytvoření komplexního nádorového mikroprostředí<sup>140</sup>.

Vznik imunitní reakce proti nádorovým buňkám je při použití nádorových linií ověřovaný pomocí ICD vakcinačních testů na modelech imunokompetentních kmenů myši. Nádorové buňky jsou *in vitro* vystavené terapeutické látce, která vyvolá ICD. Po 6-24 hodinové inkubaci jsou buňky promyté, resuspendované v PBS a následně jsou jako již mrtvé inokulované bez adjuvantních látek subkutánně (s.c.) do boku imunokompetentní syngenní myši. Ne vždy jsou v experimentech provedené kontroly stavu inokulované buněčné suspenze. Po týdnu jsou do druhého boku (opět s.c.) téže myši vpraveny živé buňky stejné

buněčné linie a sleduje se, zda jsou schopny vytvořit v daném jedinci neoplastickou lézi (viz obrázek č. 8). Vznik lézí je doporučeno monitorovat po dobu 1-2 měsíců<sup>9</sup>, v některých starších pracích jsou zobrazovaná data v rozmezí až 4 měsíců<sup>60,61</sup>. Ve většině případů se ovšem jedná o rychle rostoucí klony nádorových linií, které neodpovídají pomalu vznikajícím spontánním nádorům. Pokud se léze v místě vpichu nevyvine, je experiment interpretovaný tak, že došlo k imunitní reakci proti nádorovým buňkám použitým ve vakcíně a jejich smrt způsobená danou terapií je na tomto základě považovaná za imunogenní. Navíc dochází k vytvoření imunitní paměti při následných testech stejnou buněčnou linií, a to indukce zúčastnění adaptivního IS. Procento myši, u kterých se nádor nevyvine, určuje míru imunogenity příslušné buněčné smrti. U typických ICD induktorů, například u doxorubicinu nebo mitoxantronu, dosahuje míra ochrany po vakcinaci kolem 80 %. U myši s defektem adaptivního IS není tato ochrana pozorovaná<sup>9</sup>.

Odlišný postup byl použit například u studie, kde autoři testovali schopnost barviva Rose Bengal vyvolat ICD nádorových buněk *in situ*. Kvůli obavám o ztrátu sekretovaného ATP a HMGB1 při omývání buněk v rámci přípravy na jejich vakcinaci aplikovali Rose Bengal přímo do neoplastické léze v myši. Po týdnu injikovali do myši živé buňky stejné buněčné linie, která dala vznik původnímu nádoru<sup>111</sup>. Tento postup více odpovídá terapeutickému použití ICD induktoru při léčbě již vyvinutého podkožního nádoru.



**Obrázek č. 8:** Vakcinační testy. Myši nádorové buňky jsou *in vitro* vystaveny induktoru ICD (1 $\mu$ M mitoxantron) a kontrolnímu induktoru (50 $\mu$ M cisplatinu), který ICD nevyvolává. Po omytí a resuspendování v PBS jsou buňky injikované do syngenní imunokompetentní myši. Po týdnu jsou do téže myši injikované živé nádorové buňky ze stejné linie. Vývoj neoplastické léze v místě vakcinace indikuje neschopnost induktoru vyvolat ICD. Převzato z<sup>9</sup>

Další nepřímou variantou ICD vakcinačních testů je inokulace buněk vystavených induktoru do myši, následná izolace T lymfocytů z uzlin nebo sleziny, kde dojde k jejich aktivaci kontaktem s aktivovanými DC, a měření jejich schopnosti produkovat IFN $\gamma$  po restimulaci nádorovými buňkami *ex vivo*<sup>112,134</sup>. Tyto testy však nejsou v publikovaných

doporučeních popsané<sup>9</sup>. Byly též provedené pokusy s inokulací živých buněk do myši, kde následně došlo k vytvoření nádoru. Poté byla aplikovaná terapeutika a sledovala se rychlost růstu nádoru v porovnání s neléčenými myšmi, či myšmi s určitým defektem imunitního systému. Byl tak potvrzený význam TLR4 pro efektivitu systémové léčby oxaliplatinou nebo lokální léčby doxorubicinem a  $\gamma$ -zářením<sup>59</sup>, nebo vyšší efektivita ve zpoždění růstu nádoru léčby oxaliplatinou oproti cisplatině<sup>63</sup>.

ICD byla testována pomocí vakcinačních experimentů na modelech imunokompetentních C57BL/6<sup>50,59,87,139</sup>, BALB/c<sup>50,59–61,63,65,98,111,134,135</sup> a imunodeficitních athymických nu/nu BALB/c myši<sup>61</sup>. Vakcinační testy byly prováděny s C57BL/6 syngenními liniemi fibrosarkomu (MCA205)<sup>50,59,87,139</sup>, melanomu (B16-F1)<sup>65,141</sup>, karcinomu plic (TC-1)<sup>72</sup> a thymomu (EL4)<sup>59,72</sup> a BALB/c syngenními liniemi kolorektálního karcinomu (CT26)<sup>50,59–61,63,65,98,111,134,135,142</sup>, hepatocelulárního karcinomu (H22)<sup>65,141</sup> a nádoru mléčné žlázy (67NR)<sup>143</sup> (viz Tabulka č. 3). Na základě dat z těchto experimentů bylo identifikováno několik induktorů ICD a jejich efektů na uvolňování DAMP z buněk během buněčné smrti (viz Tabulka č. 4).

**Tabulka č. 3:** Myší modely a jejich syngenní buněčné linie využívané při výzkumu ICD.

Myší modely	Syngenní buněčné linie
C57BL/6	MCA205, B16-F1, TC-1, EL4
BALB/c	CT26, H22, 67NR

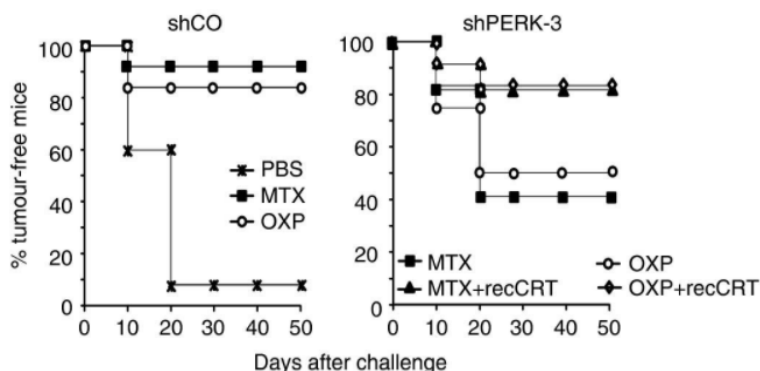
K dokazování důležitosti solubilních DAMP molekul i po inokulaci do myši se využívá jejich deplece v buňkách, jejich inhibice protilátkami, nebo inhibice jejich receptorů a následně se testuje účinnost takto ovlivněných buněk ve vakcinačních testech. Byl tak potvrzený význam sekrece ATP<sup>50</sup> i HMGB1<sup>59,63,137</sup>. Nezbytnost aktivity PERK a následného vystavení CALR byla potvrzená po snížení jejich exprese například při léčbě mitoxantronem a oxaliplatinou na CT26 a HeLa buňkách (viz obrázek č. 10)<sup>65</sup>.

**Tabulka č. 4:** Studie prokazující přítomnost DAMP molekul asociovaných s ICD na povrchu buněk (CALR, HSP) a uvolněných z buněk (ATP, HMGB1) *in vitro* testech, po kterých následovaly vakcinační testy s uvedenými ICD induktory.

ICD induktory	Dávkování induktoru	Vystavení CALR/ERP57	Sekrece ATP	Uvolnění HMGB1	Citace
nekroptické buňky (doxycyklin) mitoxantron	doxycyklin: 18-24 h; 1 µg/ml mitoxantron: 24 h; 2µM	neurčeno	Ano	Ano	70
doxorubicin, oxaliplatina, γ-záření	doxorubicin 24h; 20 µM (CT26), 1 µM (MCA205) oxaliplatina 24 h; 5 µg/ml γ-záření: 10 Gy	neurčeno	neurčeno	Ano	59
bleomycin	24 h; 15 µg/ml	Ano/Ano	Ano	Ano	134
mitoxantron	12 h; 1 µg/ml	Ano/neurčeno	neurčeno	neurčeno	141
doxorubicin	24 h; 25 µM	neurčeno	neurčeno	neurčeno	60
bortezomib	48 h; 0,1 µM	neurčeno	neurčeno	neurčeno	143
mitoxantron	CT26: 24 h; 2 µM MCA205: 24 h; 1 µM	neurčeno	Ano	neurčeno	50
mitoxantron	CT26: 24 h; 2 µM MCA205: 24 h; 1 µM	neurčeno	Ano	Ano	135
doxorubicin, idarubicin, mitoxantron	doxorubicin 24 h, 25 µM idarubicin 24 h, 1 µM, mitoxantron 24 h, 1 µM	Ano/Ano	neurčeno	neurčeno	61
γ-záření UVC	γ-záření. 75 Gy UVC: 100 J/cm <sup>2</sup>	Ano/neurčeno	neurčeno	neurčeno	11
mitoxantron, oxaliplatina	mitoxantron 4 h; 1 µM oxaliplatina 4 h; 30 µM	Ano/Ano	neurčeno	neurčeno	65
cetuximab	10 µg/ml (66 nM)	Ano/Ano	neurčeno	neurčeno	98
rose bengal	24 h; 300 µM	Ano/neurčeno	Ano	Ano	111
doxorubicin	24 h; 25 µM	neurčeno	neurčeno	neurčeno	87
oxaliplatina, mitoxantron	oxaliplatina 4 h; 150 µM a 300 µM mitoxantron 4 h; 1 µM	Ano/Ano	neurčeno	Ano	63
adenovirus Ad884		neurčeno	Ano	Ano	142
mitoxantron	1 µM	Ano/neurčeno	Ano	Ano	72
mitoxantron, doxorubicin	12 h, 2 µM 12 h, 25 µM	Ne	Ne	Ne	139
živé buňky		Ano	neurčeno	neurčeno	109

Z tabulky č. 4 je zřejmé, že naprostá většina prací nedetekuje všechny DAMP molekuly charakteristické pro ICD, a to ani po publikování doporučení v roce 2014<sup>9</sup>. Během přípravy buněk pro vakcinační testy dochází k jejich promývání, a tedy ke ztrátám sekretovaných DAMP (ATP a HMGB1). Detekce uvolňování HMGB1 i po inokulaci byla testovaná na nekroptických buňkách tak, že po promytí buněk v PBS, stejně jako během přípravy na

inokulaci, byly buňky po přeočkování do nového média schopné uvolňovat HMGB1 ještě dalších 24 hodin<sup>70</sup>. Na membránu vázaný CALR není při promývání ztracen, ale často je detekovaný jen na minoritní části buněk<sup>63,65,72</sup>. Exprese HSP proteinů je významná jen u některých induktorů a linií a data ukazují jen slabě zvýšenou expresi<sup>67</sup> anebo úplnou absenci s membránou asociovaných HSP<sup>59,60,98</sup>.



**Obrázek č. 10:** Ztráta efektu vakcinace po depleci PERK. Na levém panelu jsou vakcinační testy provedené s mitoxantronem (MTX) a oxaliplatinou (OXP) s kontrolním PBS. Na levém panelu je kontrolní skupina (shCO) a na pravém panelu je vakcinace provedena s shPERK-3 (inhibice exprese PERK mechanismem RNA interference) buňkami inkubovanými s mitoxantronem (MTX) a oxaliplatinou (OXP) a to bez přidání rekombinantního CALR (recCRT) anebo s jeho adsorpcí na buněčný povrch. Převzato z<sup>65</sup>

Adsorpce rekombinantního CALR (rCALR) na povrch nádorových buněk dokáže přeměnit neimunogenní smrt vyvolanou například mitomycinem C (non-ICD induktor) na formu smrti schopnou *in vitro* stimulovat maturaci DC a vyvolat imunitní odpověď proti daným buňkám *in vivo*<sup>61</sup> a dokáže obnovit imunogenitu po depleci CALR pomocí siRNA („small interfering RNA“)<sup>63</sup>. Podobné testy byly úspěšně provedeny i s redukovanou formou rekombinantního HMGB1 proteinu<sup>63</sup>.

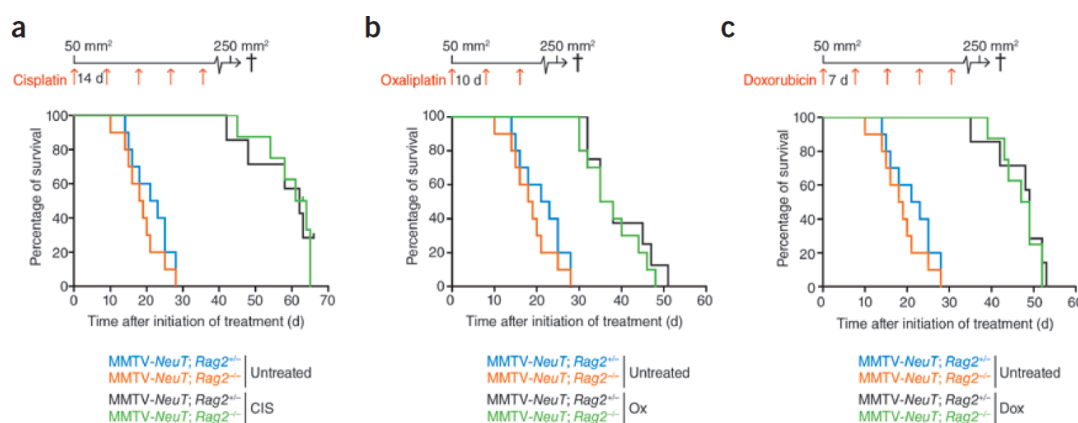
Účinnost vakcinace se liší mezi liniemi i v rámci jedné linie v závislosti na typu použitého induktoru. Například vakcinační testy s CT26 buňkami jsou až od 40 % efektivnější při indukci ICD doxorubicinem oproti indukci oxaliplatinou<sup>59</sup>. Výsledky se liší i mezi studii<sup>59,63</sup>. Též je nutné poznamenat, že MCA250 linie je imunogenní sama o sobě, neboť vykazuje 20 % úspěšnost v testech bez použití jakéhokoliv ICD induktoru<sup>59</sup>.

Vznik akutní zánětlivé odpovědi v místě s.c. vpichu a přítomnost malého kontaminujícího množství nekrotických buněk v místě inokulace mohou být důvodem nadhodnocení úspěšnosti eradikace nádorových buněk ve vakcinačních experimentech. Tyto podmínky přetrvávají v místě podkožní inokulace po dobu 10-14 dní, kdy může též snadněji docházet ke zkřížené prezentaci<sup>144</sup>.

Úspěšnost chemoterapeutika při eradikaci nádorových buněk v transplantačních modelech nemusí znamenat jeho účinnost i při léčbě spontánních nádorových modelů<sup>145</sup> a je tedy nezbytné ověřit výsledky získané během experimentů s transplantačními modely i na modelech spontánních nádorů. Ty totiž věrněji odpovídají podmínkám existujícím v mikroprostředí *de novo* vzniklých nádorů, a to především imunosupresivním charakterem, který při vakcinaci chybí.

## 6.2. Spontánní nádorové modely

Při pokusech na dvou myších modelech (K14cre; Cdh1<sup>flox/flox</sup>; Trp53<sup>flox/flox</sup> a MMTV-NeuT) onkogenem indukovaného HER2<sup>+</sup> nádoru mléčné žlázy byla pozorovaná postradatelnost adaptivního IS pro efektivitu terapie při léčbě cisplatinou, oxaliplatinou a doxorubicinem (viz obrázek č. 11) – efektivita léčby se tedy nelišila mezi induktorem a neinduktorem ICD<sup>146</sup>. Toto zjištění odporuje teorii ICD, podle které je účinnost léčby oxaliplatinou a doxorubicinem přítomností adaptivního IS podmíněná a je efektivnější než léčba cisplatinou<sup>59–61,63,87</sup>. Výsledky byly autory interpretované tak, že ve spontánních epiteliálních nádorech chemoterapie buď neindukuje ICD, nebo indukovaná ICD nedokáže překonat imunosupresivní podmínky vytvořeného nádorového mikroprostředí, které je pro spontánní nádory charakteristické<sup>146</sup>. G. Kroemer ve svém komentáři k tomuto článku<sup>147</sup> poukazuje na to, že tři cykly chemoterapie použité v dané studii mohly navodit silnou imunosupresi a navrhuje použití modelu, ve kterém T lymfocyty hrají pozitivní a rozhodující roli – ne jako v tomto případě, kde jejich přítomnost neovlivňuje rychlost růstu ani tendenci tvořit metastázy<sup>148</sup>.



**Obrázek č. 11:** Nezávislost efektivity chemoterapie na přítomnosti adaptivního IS v MMTV-NeuT myších. Kaplan-Meierova křivka přežití neléčených a léčených a) cisplatinou (CIS) b) oxaliplatinou (Ox) c) doxorubicinem (Dox) v myších s funkčním adaptivním IS (Rag<sup>+/+</sup>) nebo bez něj (Rag<sup>-/-</sup>). Převzato z <sup>146</sup>

## 7. Závěr

Od roku 2007 byla ICD v literatuře definovaná především jako imunogenní forma apoptózy následovaná sekundární nekrózou. V posledních letech byly však jako formy ICD popsány i další typy buněčné smrti, například nekroptóza, pyroptóza a nekróza. Vyloučené nebyly ani kombinace programovaných typů smrti s neprogramovanou nekrózou. Na základě experimentálních dat se však zdá, že programovaný typ smrti je zásadní pro zkříženou prezentaci cytotoxickým Tc buňkám a že pro aktivaci a maturaci DC je nezbytný přímý kontakt s nádorovou buňkou, která prošla ICD. Iniciací programované buněčné smrti po vyvolání smrti ICD induktory alespoň v části umírajících buněk je tedy nezbytná pro jejich schopnost indukovat T buněčnou protinádorovou imunitní odpověď.

ICD je obecně asociovaná se stresem ER, především aktivitou PERK kinázy a fosforylací eIF2 $\alpha$  a je doprovázená produkcí IFN typu I. ICD je ověřovaná detekcí CALR a případně dalších HSP na povrchu nádorových buněk a ATP a HMGB1 v extracelulárním prostoru. DAMP podporují funkci ICD, ale jejich efekt se v *in vivo* podmínkách těžko potvrzuje, ať už je důvodem promiskuitní TLR4 receptor, různé funkce oxidovaných a redukovaných forem HMGB1, které nebyly detekované specifickými protilátkami, či nepřímá aktivace receptorů zprostředkovaná interakcí DAMP s jinými molekulami (například LPS, či DNA v případě HMGB1).

V *in vivo* podmínkách je schopnost buněk procházejících ICD indukovat imunitní odpověď testovaná vakcinačním postupem na myších modelech. Obecným problémem vakcinačních experimentů je především homogenita nádorových linií, která neodráží vysokou heterogenitu nádorů vzniklých *de novo* v pacientech a stav imunosuprese, který se u spontánních nádorů běžně vyskytuje. Dalším problematickým faktorem je vlastní inokulace umírajících buněk do myši, během které dochází k dočasnému vytvoření prozánětlivého prostředí.

Z tabulky č. 4 je zřejmé, že naprostá většina prací nedetekuje před *in vivo* testy všechny DAMP molekuly charakterizující ICD, ani samotnou kvalitu inokulovaných buněk. Expresí DAMP je ve velké většině případů nízká anebo není spolehlivě prokázána jejich asociace s vnějším listem PM. Během příprav buněk pro vakcinační testy dochází k jejich promývání, a tedy ke ztrátám sekretovaných DAMP zahrnujících HMGB1 a ATP. Až na jednu výjimku<sup>70</sup> zde zmíněné práce neprokazují jejich sekreci z buněk i po tomto procesu těsně před inokulací do myši. CALR je sice vázaný na membránu, nicméně často je jeho zvýšená povrchová

exprese detekovaná pouze na minoritní části buněk. Membránová lokalizace ostatních HSP proteinů není pro ICD univerzálním znakem.

Množství studií ICD na spontánních nádorových modelech je neuspokojivě nízké a od roku 2012 se této oblasti výzkumu věnovala pouze jedna laboratoř. Přesto, že neustále dochází k popisování nových ICD induktorů a probíhají četné klinické studie, ověřování výsledků ze zvířecích transplantačních modelů na spontánních nádorech a s tím spojené plné porozumění specifickým mechanismům ICD induktorů, nám dle mého názoru dosud chybí.

Bude nezbytné aplikovat všechna publikovaná doporučení v *in vivo* experimentech a objasnit příslušné molekulární a buněčné mechanismy za účelem potvrzení významu ICD jako specifického typu buněčné smrti kritické pro obranu proti nádorům. Vzhledem k velkému potenciálu aplikace těchto znalostí do klinické praxe, především co se týče kombinované léčby více léčivy najednou, lze očekávat detailní studie zaměřené na poznání role ICD v protinádorové imunitě.

## 8. Použitá literatura

1. Burnet, F. M. (Frank M. *The clonal selection theory of acquired immunity*. (Nashville, Vanderbilt University Press, 1959).
2. Matzinger, P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* **296**, 301–305 (2002).
3. Janeway, C. A. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **54 Pt 1**, 1–13 (1989).
4. Matzinger, P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 991–1045 (1994).
5. Vénéreau, E., Ceriotti, C. & Bianchi, M. E. DAMPs from Cell Death to New Life. *Front. Immunol.* **6**, (2015).
6. Chen, G. Y. & Nuñez, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 826–837 (2010).
7. Pollard, T. D., Earnshaw, W. C., Lippincott-Schwartz, J. & Johnson, G. *Cell Biology*. (Elsevier Health Sciences, 2016).
8. Galluzzi, L. *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* (2018).
9. Kepp, O. *et al.* Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death. *Oncoimmunology* **3**, e955691 (2014).
10. Galluzzi, L., Buqué, A., Kepp, O., Zitvogel, L. & Kroemer, G. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. *Nat. Rev. Immunol.* (2016).
11. Obeid, M. *et al.* Calreticulin exposure is required for the immunogenicity of  $\gamma$ -irradiation and UVC light-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* **14**, 1848–1850 (2007).
12. Bezu, L. *et al.* Combinatorial strategies for the induction of immunogenic cell death. *Front. Immunol.* **6**, 187 (2015).
13. Fucikova, J. *et al.* High hydrostatic pressure induces immunogenic cell death in human tumor cells. *Int. J. Cancer* **135**, 1165–1177 (2014).
14. Rabouille, C. Pathways of Unconventional Protein Secretion. *Trends Cell Biol.* **27**, 230–240 (2017).
15. Heilig, R. *et al.* The Gasdermin-D pore acts as a conduit for IL-1 $\beta$  secretion in mice. *Eur. J. Immunol.* (2018).
16. Iula, L. *et al.* Autophagy mediates Interleukin-1 $\beta$  secretion in human neutrophils. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
17. Rufo, N., Garg, A. D. & Agostinis, P. The Unfolded Protein Response in Immunogenic Cell Death and Cancer Immunotherapy. *Trends Cancer* **3**, 643–658 (2017).
18. Starck, S. R. *et al.* Translation from the 5' untranslated region shapes the integrated stress response. *Science* **351**, aad3867 (2016).
19. Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T. & Mori, K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* **107**, 881–891 (2001).
20. Reis e Sousa, C. Dendritic cells in a mature age. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 476–483 (2006).
21. Kono, H. & Rock, K. L. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 279–289 (2008).
22. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
23. Vesely, M. D., Kershaw, M. H., Schreiber, R. D. & Smyth, M. J. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 235–271 (2011).
24. Muenst, S. *et al.* The immune system and cancer evasion strategies: therapeutic concepts. *J. Intern. Med.* **279**, 541–562 (2016).
25. Pesic, M. & Greten, F. R. Inflammation and cancer: tissue regeneration gone awry. *Curr. Opin. Cell Biol.* **43**, 55–61 (2016).
26. Jaiswal, S., Chao, M. P., Majeti, R. & Weissman, I. L. Macrophages as mediators of tumor immunosurveillance. *Trends Immunol.* **31**, 212–219 (2010).

27. Cruz, F. M., Colbert, J. D., Merino, E., Kriegsman, B. A. & Rock, K. L. The Biology and Underlying Mechanisms of Cross-Presentation of Exogenous Antigens on MHC-I Molecules. *Annu. Rev. Immunol.* **35**, 149–176 (2017).
28. Barkal, A. A. *et al.* Engagement of MHC class I by the inhibitory receptor LILRB1 suppresses macrophages and is a target of cancer immunotherapy. *Nat. Immunol.* **19**, 76–84 (2018).
29. Pahl, J. & Cerwenka, A. Tricking the balance: NK cells in anti-cancer immunity. *Immunobiology* **222**, 11–20 (2017).
30. Motz, G. T. & Coukos, G. Deciphering and Reversing Tumor Immune Suppression. *Immunity* **39**, 61–73 (2013).
31. Martínez-Lostao, L., Anel, A. & Pardo, J. How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells? *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **21**, 5047–5056 (2015).
32. Chen, D. S. & Mellman, I. Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity* **39**, 1–10 (2013).
33. Tsou, P., Katayama, H., Ostrin, E. J. & Hanash, S. M. The Emerging Role of B Cells in Tumor Immunity. *Cancer Res.* **76**, 5597–5601 (2016).
34. Munn, D. H. & Bronte, V. Immune suppressive mechanisms in the tumor microenvironment. *Curr. Opin. Immunol.* **39**, 1–6 (2016).
35. Gordon, S. Phagocytosis: An Immunobiologic Process. *Immunity* **44**, 463–475 (2016).
36. Galluzzi, L. *et al.* Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death Differ.* **22**, 58–73 (2015).
37. Fink, S. L. & Cookson, B. T. Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cell. Microbiol.* **8**, 1812–1825 (2006).
38. Fink, S. L., Bergsbaken, T. & Cookson, B. T. Anthrax lethal toxin and Salmonella elicit the common cell death pathway of caspase-1-dependent pyroptosis via distinct mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 4312–4317 (2008).
39. Bonnet, M. C. *et al.* The adaptor protein FADD protects epidermal keratinocytes from necroptosis in vivo and prevents skin inflammation. *Immunity* **35**, 572–582 (2011).
40. Garg, A. D. *et al.* Molecular and Translational Classifications of DAMPs in Immunogenic Cell Death. *Front. Immunol.* **6**, 588 (2015).
41. Sikora, E., Mosieniak, G. & Sliwinska, M. A. Morphological and Functional Characteristic of Senescent Cancer Cells. *Curr. Drug Targets* **17**, 377–387 (2016).
42. Dixon, S. J. *et al.* Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* **149**, 1060–1072 (2012).
43. Stockwell, B. R. *et al.* Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. *Cell* **171**, 273–285 (2017).
44. Sun, L. *et al.* Mixed Lineage Kinase Domain-like Protein Mediates Necrosis Signaling Downstream of RIP3 Kinase. *Cell* **148**, 213–227 (2012).
45. Xia, B. *et al.* MLKL forms cation channels. *Cell Res.* **26**, 517 (2016).
46. Gutierrez, K. D. *et al.* MLKL Activation Triggers NLRP3-Mediated Processing and Release of IL-1 $\beta$  Independently of Gasdermin-D. *J. Immunol.* **198**, 2156–2164 (2017).
47. Lamkanfi, M. Emerging inflammasome effector mechanisms. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 213–220 (2011).
48. Shi, J. *et al.* Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature* **526**, 660–665 (2015).
49. Yang, D., He, Y., Muñoz-Planillo, R., Liu, Q. & Núñez, G. Caspase-11 Requires the Pannexin-1 Channel and the Purinergic P2X7 Pore to Mediate Pyroptosis and Endotoxic Shock. *Immunity* **43**, 923–932 (2015).
50. Martins, I. *et al.* Molecular mechanisms of ATP secretion during immunogenic cell death. *Cell Death Differ.* **21**, 79–91 (2014).
51. Chen, X. *et al.* Pyroptosis is driven by non-selective gasdermin-D pore and its morphology is different from MLKL channel-mediated necroptosis. *Cell Res.* **26**, 1007–1020 (2016).
52. Würstle, M. L. & Rehm, M. A Systems Biology Analysis of Apoptosome Formation and Apoptosis Execution Supports Allosteric Procaspase-9 Activation. *J. Biol. Chem.* **289**, 26277–26289 (2014).
53. Verhoven, B., Schlegel, R. A. & Williamson, P. Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **182**, 1597–1601 (1995).

54. Park, D., Choi, S. S. & Ha, K.-S. Transglutaminase 2: a multi-functional protein in multiple subcellular compartments. *Amino Acids* **39**, 619–631 (2010).
55. Trahtenberg, U. & Mevorach, D. Apoptotic Cells Induced Signaling for Immune Homeostasis in Macrophages and Dendritic Cells. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
56. Elliott, M. R. & Ravichandran, K. S. The Dynamics of Apoptotic Cell Clearance. *Dev. Cell* **38**, 147–160 (2016).
57. Rogers, C. *et al.* Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death. *Nat. Commun.* **8**, 14128 (2017).
58. Wang, Y. *et al.* Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin. *Nature* **547**, 99 (2017).
59. Apetoh, L. *et al.* Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat. Med.* **13**, 1050–1059 (2007).
60. Casares, N. *et al.* Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *J. Exp. Med.* **202**, 1691–1701 (2005).
61. Obeid, M. *et al.* Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat. Med.* **13**, 54–61 (2007).
62. Kepp, O. *et al.* Lysyl tRNA synthetase is required for the translocation of calreticulin to the cell surface in immunogenic death. *Cell Cycle Georget. Tex* **9**, 3072–3077 (2010).
63. Tesniere, A. *et al.* Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin. *Oncogene* **29**, 482–491 (2009).
64. Ghiringhelli, F. *et al.* Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nat. Med.* **15**, 1170–1178 (2009).
65. Panaretakis, T. *et al.* Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *EMBO J.* **28**, 578–590 (2009).
66. Fucikova, J. *et al.* Calreticulin exposure by malignant blasts correlates with robust anticancer immunity and improved clinical outcome in AML patients. *Blood* **128**, 3113–3124 (2016).
67. Spisek, R. *et al.* Bortezomib enhances dendritic cell (DC)-mediated induction of immunity to human myeloma via exposure of cell surface heat shock protein 90 on dying tumor cells: therapeutic implications. *Blood* **109**, 4839–4845 (2007).
68. Garg, A. D. *et al.* A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death. *EMBO J.* **31**, 1062–1079 (2012).
69. Garg, A. D., Krysko, D. V., Vandenabeele, P. & Agostinis, P. Extracellular ATP and P2X7 receptor exert context-specific immunogenic effects after immunogenic cancer cell death. *Cell Death Dis.* **7**, e2097 (2016).
70. Aaes, T. L. *et al.* Vaccination with Necroptotic Cancer Cells Induces Efficient Anti-tumor Immunity. *Cell Rep.* **15**, 274–287 (2016).
71. Kaiser, W. J. *et al.* RIP3 mediates the embryonic lethality of caspase-8-deficient mice. *Nature* **471**, 368–372 (2011).
72. Yang, H. *et al.* Contribution of RIP3 and MLKL to immunogenic cell death signaling in cancer chemotherapy. *OncolImmunology* **5**, e1149673 (2016).
73. Gamrekelashvili, J. *et al.* Peptidases released by necrotic cells control CD8+ T cell cross-priming. *J. Clin. Invest.* **123**, 4755–4768 (2013).
74. Shimizu, S., Yoshida, T., Tsujioka, M. & Arakawa, S. Autophagic Cell Death and Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 3145–3153 (2014).
75. Zhang, Z., Singh, R. & Aschner, M. Methods for the Detection of Autophagy in Mammalian Cells. *Curr. Protoc. Toxicol. Editor. Board Mahin Maines Ed.--Chief Al* **69**, 20.12.1-20.12.26 (2016).
76. Schosserer, M., Grillari, J. & Breitenbach, M. The Dual Role of Cellular Senescence in Developing Tumors and Their Response to Cancer Therapy. *Front. Oncol.* **7**, (2017).
77. Evangelou, K. *et al.* Robust, universal biomarker assay to detect senescent cells in biological specimens. *Aging Cell* **16**, 192–197 (2017).
78. Chan, F. K.-M., Moriwaki, K. & Rosa, M. J. D. Detection of Necrosis by Release of Lactate Dehydrogenase Activity. in *Immune Homeostasis* 65–70 (Humana Press, Totowa, NJ, 2013).

79. Vanden Berghe, T. *et al.* Determination of apoptotic and necrotic cell death in vitro and in vivo. *Methods San Diego Calif* **61**, 117–129 (2013).
80. Bortoluci, K. R. & Medzhitov, R. Control of infection by pyroptosis and autophagy: role of TLR and NLR. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 1643–1651 (2010).
81. Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239–257 (1972).
82. Lalaoui, N., Lindqvist, L. M., Sandow, J. J. & Ekert, P. G. The molecular relationships between apoptosis, autophagy and necroptosis. *Semin. Cell Dev. Biol.* **39**, 63–69 (2015).
83. Gallucci, S., Lolkema, M. & Matzinger, P. Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat. Med.* **5**, 1249–1255 (1999).
84. Steinman, R. M., Turley, S., Mellman, I. & Inaba, K. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J. Exp. Med.* **191**, 411–416 (2000).
85. Kepp, O. *et al.* eIF2 $\alpha$  phosphorylation as a biomarker of immunogenic cell death. *Semin. Cancer Biol.* **33**, 86–92 (2015).
86. Galluzzi, L., Buqué, A., Kepp, O., Zitvogel, L. & Kroemer, G. Immunological Effects of Conventional Chemotherapy and Targeted Anticancer Agents. *Cancer Cell* **28**, 690–714 (2015).
87. Sistigu, A. *et al.* Cancer cell-autonomous contribution of type I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy. *Nat. Med.* **20**, 1301–1309 (2014).
88. Showalter, A. *et al.* Cytokines in immunogenic cell death: Applications for cancer immunotherapy. *Cytokine* **97**, 123–132 (2017).
89. Schiavoni, G. *et al.* Cyclophosphamide synergizes with type I interferons through systemic dendritic cell reactivation and induction of immunogenic tumor apoptosis. *Cancer Res.* **71**, 768–778 (2011).
90. Pol, J. *et al.* Trial Watch: Immunogenic cell death inducers for anticancer chemotherapy. *Oncoimmunology* **4**, e1008866 (2015).
91. Angelova, A. L. *et al.* Complementary Induction of Immunogenic Cell Death by Oncolytic Parvovirus H-1PV and Gemcitabine in Pancreatic Cancer. *J. Virol.* **88**, 5263–5276 (2014).
92. Koks, C. A. *et al.* Newcastle disease virotherapy induces long-term survival and tumor-specific immune memory in orthotopic glioma through the induction of immunogenic cell death. *Int. J. Cancer* **136**, E313–325 (2015).
93. Takasu, A. *et al.* Immunogenic cell death by oncolytic herpes simplex virus type 1 in squamous cell carcinoma cells. *Cancer Gene Ther.* **23**, 107–113 (2016).
94. Korbelik, M., Banáth, J., Saw, K. M., Zhang, W. & Čiplys, E. Calreticulin as Cancer Treatment Adjuvant: Combination with Photodynamic Therapy and Photodynamic Therapy-Generated Vaccines. *Front. Oncol.* **5**, (2015).
95. Krysko, D. V. *et al.* Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 860–875 (2012).
96. Chen, H.-M. *et al.* Shikonin induces immunogenic cell death in tumor cells and enhances dendritic cell-based cancer vaccine. *Cancer Immunol. Immunother.* **61**, 1989–2002 (2012).
97. Son, K. *et al.* Induction of immunogenic cell death of tumors by newly synthesized heterocyclic quinone derivative. *PLOS ONE* **12**, e0173121 (2017).
98. Pozzi, C. *et al.* The EGFR-specific antibody cetuximab combined with chemotherapy triggers immunogenic cell death. *Nat. Med.* **22**, 624–631 (2016).
99. Wiersma, V. R., Michalak, M., Abdullah, T. M., Bremer, E. & Eggleton, P. Mechanisms of Translocation of ER Chaperones to the Cell Surface and Immunomodulatory Roles in Cancer and Autoimmunity. *Front. Oncol.* **5**, 7 (2015).
100. Eggleton, P., Bremer, E., Dudek, E. & Michalak, M. Calreticulin, a therapeutic target? *Expert Opin. Ther. Targets* **20**, 1137–1147 (2016).
101. Chao, M. P. *et al.* Calreticulin is the dominant pro-phagocytic signal on multiple human cancers and is counterbalanced by CD47. *Sci. Transl. Med.* **2**, 63ra94 (2010).
102. Wijeyesakere, S. J., Bedi, S. K., Huynh, D. & Raghavan, M. The C-Terminal Acidic Region of Calreticulin Mediates Phosphatidylserine Binding and Apoptotic Cell Phagocytosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **196**, 3896–3909 (2016).

103. Osman, R., Tacnet-Delorme, P., Kleman, J.-P., Millet, A. & Frchet, P. Calreticulin Release at an Early Stage of Death Modulates the Clearance by Macrophages of Apoptotic Cells. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
104. Cirone, M. *et al.* Primary effusion lymphoma cell death induced by bortezomib and AG 490 activates dendritic cells through CD91. *PLoS One* **7**, e31732 (2012).
105. Tufi, R. *et al.* Reduction of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> levels favors plasma membrane surface exposure of calreticulin. *Cell Death Differ.* **15**, 274–282 (2008).
106. Obeid, M. ERP57 membrane translocation dictates the immunogenicity of tumor cell death by controlling the membrane translocation of calreticulin. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **181**, 2533–2543 (2008).
107. Garg, A. D., Krysko, D. V., Vandenabeele, P. & Agostinis, P. Hypericin-based photodynamic therapy induces surface exposure of damage-associated molecular patterns like HSP70 and calreticulin. *Cancer Immunol. Immunother. CII* **61**, 215–221 (2012).
108. Yamamura, Y. *et al.* The key role of calreticulin in immunomodulation induced by chemotherapeutic agents. *Int. J. Clin. Oncol.* **20**, 386–394 (2015).
109. Chen, X., Fosco, D., Kline, D. E. & Kline, J. Calreticulin promotes immunity and type I interferon-dependent survival in mice with acute myeloid leukemia. *Oncoimmunology* **6**, e1278332 (2017).
110. Galluzzi, L. & Kroemer, G. Calreticulin and type I interferon: An unsuspected connection. *Oncoimmunology* **6**, (2017).
111. Qin, J. *et al.* Colon cancer cell treatment with rose bengal generates a protective immune response via immunogenic cell death. *Cell Death Dis.* **8**, e2584 (2017).
112. Chang, C.-L. *et al.* Immune Mechanism of the Antitumor Effects Generated by Bortezomib. *J. Immunol.* **189**, 3209–3220 (2012).
113. Murshid, A., Theriault, J., Gong, J. & Calderwood, S. K. Receptors for extracellular heat shock proteins. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **787**, 289–302 (2011).
114. Di Virgilio, F. & Adinolfi, E. Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. *Oncogene* **36**, 293–303 (2017).
115. Elliott, M. R. *et al.* Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* **461**, 282–286 (2009).
116. Ayna, G. *et al.* ATP Release from Dying Autophagic Cells and Their Phagocytosis Are Crucial for Inflammasome Activation in Macrophages. *PLoS ONE* **7**, (2012).
117. Ma, Y. *et al.* Anticancer chemotherapy-induced intratumoral recruitment and differentiation of antigen-presenting cells. *Immunity* **38**, 729–741 (2013).
118. Chekeni, F. B. *et al.* Pannexin 1 channels mediate ‘find-me’ signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature* **467**, 863–867 (2010).
119. Wang, Y. *et al.* Autophagy-dependent ATP release from dying cells via lysosomal exocytosis. *Autophagy* **9**, 1624–1625 (2013).
120. Garg, A. D., Dv, K., P, V. & P, A. Extracellular ATP and P<sub>2</sub>X<sub>7</sub> receptor exert context-specific immunogenic effects after immunogenic cancer cell death., Extracellular ATP and P2X7 receptor exert context-specific immunogenic effects after immunogenic cancer cell death. *Cell Death Dis. Cell Death Dis.* **7**, **7**, e2097, e2097–e2097 (2016).
121. Deaglio, S. *et al.* Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.* **204**, 1257–1265 (2007).
122. Clayton, A., Al-Taei, S., Webber, J., Mason, M. D. & Tabi, Z. Cancer exosomes express CD39 and CD73, which suppress T cells through adenosine production. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **187**, 676–683 (2011).
123. Jin, D. *et al.* CD73 on Tumor Cells Impairs Antitumor T-Cell Responses: A Novel Mechanism of Tumor-Induced Immune Suppression. *Cancer Res.* **70**, 2245–2255 (2010).
124. Michaud, M. *et al.* Subversion of the chemotherapy-induced anticancer immune response by the ecto-ATPase CD39. *Oncoimmunology* **1**, 393–395 (2012).
125. Loi, S. *et al.* CD73 promotes anthracycline resistance and poor prognosis in triple negative breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 11091–11096 (2013).
126. Tang, D. *et al.* Endogenous HMGB1 regulates autophagy. *J. Cell Biol.* **190**, 881–892 (2010).
127. Scaffidi, P., Misteli, T. & Bianchi, M. E. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* **418**, 191–195 (2002).

128. Qing, D. Y. *et al.* Red Blood Cells Induce Necroptosis of Lung Endothelial Cells and Increase Susceptibility to Lung Inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **190**, 1243–1254 (2014).
129. Nyström, S. *et al.* TLR activation regulates damage-associated molecular pattern isoforms released during pyroptosis. *EMBO J.* **32**, 86–99 (2013).
130. Kazama, H. *et al.* Induction of immunological tolerance by apoptotic cells requires caspase-dependent oxidation of high-mobility group box-1 protein. *Immunity* **29**, 21–32 (2008).
131. Venereau, E. *et al.* Mutually exclusive redox forms of HMGB1 promote cell recruitment or proinflammatory cytokine release. *J. Exp. Med.* **209**, 1519–1528 (2012).
132. Tang, D. *et al.* HMGB1 Release and Redox Regulates Autophagy and Apoptosis in Cancer Cells. *Oncogene* **29**, 5299–5310 (2010).
133. Zandarashvili, L. *et al.* Real-time Kinetics of High-mobility Group Box 1 (HMGB1) Oxidation in Extracellular Fluids Studied by in Situ Protein NMR Spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **288**, 11621–11627 (2013).
134. Bugaut, H. *et al.* Bleomycin Exerts Ambivalent Antitumor Immune Effect by Triggering Both Immunogenic Cell Death and Proliferation of Regulatory T Cells. *PLOS ONE* **8**, e65181 (2013).
135. Michaud, M. *et al.* Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science* **334**, 1573–1577 (2011).
136. Luo, Y. *et al.* High mobility group box 1 released from necrotic cells enhances regrowth and metastasis of cancer cells that have survived chemotherapy. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990* **49**, 741–751 (2013).
137. Yamazaki, T. *et al.* Defective immunogenic cell death of HMGB1-deficient tumors: compensatory therapy with TLR4 agonists. *Cell Death Differ.* **21**, 69–78 (2014).
138. Weyd, H. *et al.* Annexin A1 on the Surface of Early Apoptotic Cells Suppresses CD8+ T Cell Immunity. *PLOS ONE* **8**, e62449 (2013).
139. Vacchelli, E. *et al.* Chemotherapy-induced antitumor immunity requires formyl peptide receptor 1. *Science* **350**, 972–978 (2015).
140. Kersten, K., Visser, K. E. de, Miltenburg, M. H. van & Jonkers, J. Genetically engineered mouse models in oncology research and cancer medicine. *EMBO Mol. Med.* e201606857 (2016).
141. Cao, C., Han, Y., Ren, Y. & Wang, Y. Mitoxantrone-Mediated Apoptotic B16-F1 Cells Induce Specific Anti-tumor Immune Response. *Cell. Mol. Immunol.* **6**, 469–475 (2009).
142. Yamano, T. *et al.* Whole cell vaccination using immunogenic cell death by an oncolytic adenovirus is effective against a colorectal cancer model. *Mol. Ther. Oncolytics* **3**, 16031 (2016).
143. Demaria, S. *et al.* Select forms of tumor cell apoptosis induce dendritic cell maturation. *J. Leukoc. Biol.* **77**, 361–368 (2005).
144. Schreiber, K., Rowley, D. A., Riethmüller, G. & Schreiber, H. Cancer immunotherapy and preclinical studies: why we are not wasting our time with animal experiments. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **20**, 567–584 (2006).
145. Olive, K. P. *et al.* Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science* **324**, 1457–1461 (2009).
146. Ciampricotti, M., Hau, C.-S., Doornebal, C. W., Jonkers, J. & de Visser, K. E. Chemotherapy response of spontaneous mammary tumors is independent of the adaptive immune system. *Nat. Med.* **18**, 344–346; author reply 346 (2012).
147. Kroemer, G., Galluzzi, L. & Zitvogel, L. Immunological effects of chemotherapy in spontaneous breast cancers. *Oncoimmunology* **2**, (2013).
148. Ciampricotti, M. *et al.* Development of metastatic HER2(+) breast cancer is independent of the adaptive immune system. *J. Pathol.* **224**, 56–66 (2011).