

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

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



**Adéla Fejfarová**

Imunogenní buněčná smrt v klinických vzorcích nádorů  
Immunogenic cell death in tumor specimens in the clinics

Bakalářská práce

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

Praha, 2022

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Karlu Drbalovi, Ph.D. za odborné vedení této bakalářské práce, trpělivost během jejího zpracování a za cenné připomínky.

## **Prohlášení**

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, 6. 1. 2022

.....

Adéla Fejfarová

## **Abstrakt**

Růst a vývoj nádoru je v lidském organismu pod kontrolou imunitního systému. Za spuštění protinádorové imunitní odpovědi jsou zodpovědné molekuly DAMP („danger-associated molecular pattern“), které se váží na PRR („pattern recognition receptors“) receptory buněk přirozené imunity, což následně vede k aktivaci imunity adaptivní. K uvolnění DAMP molekul z nádorových buněk dochází během imunogenní buněčné smrti (ICD, „immunogenic cell death“). ICD je jedním z typů regulované buněčné smrti (RCD, „regulated cell death“). V experimentálních podmínkách je ICD vyvolaná řadou terapeutických postupů běžně používaných pro léčbu pacientů s nádorovými onemocněními. Charakteristickým znakem ICD je DAMP molekula proteinu kalretikulin, který se přesouvá z endoplazmatického retikula na povrch buněk, kde je ukotvený pomocí receptoru CD91. Mezi další znaky patří jaderný protein HMGB1, který se v pozdní fázi ICD uvolňuje z buněk do nádorového prostředí.

Tato bakalářská práce popisuje metody využívané pro detekci externalizace těchto DAMP molekul, a to jak v experimentech s buněčnými liniemi, tak především u vzorků nádorů z pacientů. Dále popisuje vliv těchto DAMP molekul na dobu přežití pacientů. Shrnuje také aktuální stav klinických studií zabývajících se tématem ICD.

## **Klíčová slova**

nádor, protinádorová imunita, buněčná smrt, adjuvantní molekuly, DAMP, chemoterapeutika, imunogenní buněčná smrt, klinické studie

## **Abstract**

Tumor development and growth are under the control of the immune system in the human body. Danger-associated molecular pattern (DAMP) molecules trigger the anti-tumor response by binding to pattern recognition receptor (PRR) on myeloid cells which in turn activate an adaptive immune system. DAMP molecules are released from cancer cells during a process of immunogenic cell death (ICD) which is a form of regulated cell death (RCD). ICD is induced by a variety of treatments in experimental settings as well as by therapeutic modalities commonly used in medicine. A typical DAMP marker of ICD is calreticulin which is translocated from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane attached to the CD91 receptor. Another marker is the nuclear protein HMGB1 which is released into the tumor environment at the later stage of ICD.

This bachelor thesis describes a variety of detection methods and the results of DAMP externalization after ICD induction in vitro in cancer cell lines and in tumor specimens from cancer patients. Moreover, the link between DAMP molecules and cancer patient survival is discussed. Last, it also summarizes the current status of clinical trials concerning ICD.

## **Keywords**

tumor, antitumor immunity, cell death, adjuvans, DAMP, chemotherapeutics, immunogenic cell death, clinical trials

## Seznam zkratek

<b>Zkratka</b>	<b>Anglický význam</b>	<b>Český ekvivalent</b>
AACR	American Association for Cancer Research	Americká asociace pro výzkum rakoviny
ACD	accidental cell death	náhodná buněčná smrt
Ag	antigen	antigen
APC	antigen-presenting cell	antigen-prezentující buňka
ASCO	American Society for Clinical Oncology	Americká společnost pro klinickou onkologii
ATP	adenosine triphosphate	adenosintrifosfát
BRCA	breast cancer	rakovina prsu
CP	cyclophosphamid	cyklofosfamid
CTL	cytotoxic T lymphocyte	cytotoxický T lymfocyt
DAMP	danger-associated molecular pattern	molekulární vzor asociovaný s nebezpečím
DC	dendritic cell	dendritická buňka
DFMS	distant metastasis free survival	přežití bez vzdálených metastáz
DFS	disease-free survival	přežití bez nemoci
DLT	dose limiting toxicity	dávku limitující toxicita
DOX	doxorubicin	doxorubicin
eATP	extracellular ATP	extracelulární ATP
ecto-CALR	plasma membrane surface calreticulin	kalretikulin na povrchu plazmatické membrány
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	enzymová imunoabsorpční analýza
EPI	epirubicin	epirubicin
ER	endoplasmatic reticulum	endoplazmatické retikulum
ESCC	esophageal squamous cell carcinoma	karcinom dlaždicového epitelu jícnu
ESMO	European Society for Medical Oncology	Evropská společnost pro klinickou onkologii
FCM	flow cytometry	průtoková cytometrie
FFPE	formalin-fixed paraffin-embeded (tissue)	vzorky fixované formalínem, zalité v parafínu
GA	Golgi apparatus	Golgiho aparát
GBM	glioblastoma multiforme	multiformní glioblastom
HD	healthy donor	zdravý dárc
HGSC	high-grade serous carcinoma	high-grade serózní karcinom
HSP	heat shock protein	protein teplotního šoku
Hyp-PDT	hypericin-based photodynamic therapy	fotodynamická terapie založená na hypericinu
ICD	immunogenic cell death	imunogenní buněčná smrt
ICB	immune checkpoint blockade	blokace imunitních kontrolních bodů
ICI	immune checkpoint inhibitor	inhibice imunitních kontrolních bodů
IDA	idarubicin	idarubicin
IHC	immunohistochemistry	imunohistochemie
IS	immune system	imunitní systém

ISR	integrated stress response	integrovaná stresová odpověď
LAML	acute myeloid leukemia	akutní myeloidní leukemie
LLSP	leaderless secretory protein	protein sekretovaný bez klasické signální sekvence
LUAD	lung adenocarcinoma	adenokarcinom plic
LUSC	lung squamous cell carcinoma	karcinoma dlaždicového epitelu plic
mCRC	metastatic colorectal cancer	metastatická rakovina tlustého střeva a rekta
MDT	maximal tolerated dose	maximální tolerovaná dávka
MFI	median fluorescence intensity	medián intenzity fluorescence
MFS	metastasis free survival	přežití bez metastáz
miRNA	microRNA	mikroRNA
MMC	mitomycin C	mitomycin C
MTX	mitoxantrone	mitoxantron
NCCD	The Nomenclature Committee on Cell Death	Komise pro názvosloví buněčné smrti
NCI	National Cancer Institute	Národní institut pro výzkum rakoviny
NKC	natural killer cell	NK buňka
NLR	Nod-like receptor	Nod-like receptor
NMIBC	non-muscle-invasive bladder cancer	neinvazivní karcinom močového měchýře
NSCLC	non-small cell lung cancer	nemalobuněčný karcinom plic
ORR	overall response rate	celková četnost odpovědi
OS	overall survival	celkové přežití
OXP	oxaliplatin	oxaliplatina
PAMP	pathogen-associated molecular pattern	molekulární vzor asociovaný s patogenem
PD-L1	programmed cell death ligand 1	ligand 1 receptoru programované buněčné smrti
PBMC	peripheral blood mononuclear cell	periferní krevní jednojaderné buňky
PCD	programmed cell death	programovaná buněčná smrt
p-eIF2 $\alpha$	phosphorylated eIF2 $\alpha$	fosforylovaný eIF2 $\alpha$
PFS	progression free survival	přežití bez progresu
PLC	peptide loading complex	komplex pro vystavení peptidu
PM	plasma membrane	plazmatická membrána
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate	
PRR	pattern recognition receptor	receptor rozeznávající molekulární vzory
PS	phosphatidylserin	fosfatidylserin
RCD	regulated cell death	regulovaná buněčná smrt
RFS	recurrence free survival	přežití bez relapsu
ROS	reactive oxygen species	reaktivní formy kyslíku
SCCAC	squamous cell anal carcinoma	karcinom dlaždicového epitelu anu
SCLC	small cell lung cancer	malobuněčný karcinom plic
TAA	tumor-associated antigen	antigen asociovaný s nádorem

TC	T cell	T buňka
TCGA	The Cancer Genome Atlas	Atlas genomu rakoviny
TCR	T-cell receptor	T-buněčný receptor
Th	T helper cell	pomocné T buňky
TLR	Toll-like receptor	Toll-like receptor
TME	tumor microenvironment	nádorové mikroprostředí
T <sub>REG</sub>	regulatory T cells	regulační T buňka
TNA	tumor neoantigen	nádorový neoantigen
TURBT	transurethral resection of bladder tumour	transuretrální resekce nádoru močového měchýře
UPR	unfolded protein response	odpověď na nesbalené proteiny
UVC	ultraviolet C light	ultrafialové světlo C
WHO	World Health Organization	Světová zdravotnická organizace

## Obsah

1	Úvod.....	1
2	Imunogenní buněčná smrt nádorových buněk.....	2
2.1	Imunitní systém a nádor .....	2
2.1.1	Spuštění imunitní odpovědi.....	3
2.1.2	Kostimulace adaptivní části IS .....	3
2.2	Princip ICD.....	4
2.2.1	Induktory ICD .....	5
2.3	DAMP molekuly asociované s ICD .....	6
2.3.1	Ecto-CALR.....	6
2.3.2	Extracelulární ATP.....	9
2.3.3	Extracelulární HMGB1 .....	11
2.3.4	Další molekuly asociované s ICD .....	13
3	Detekce DAMP molekul v klinických vzorcích.....	14
3.1	Metody detekce DAMP molekul.....	14
3.1.1	IHC .....	15
3.1.2	ELISA.....	16
3.1.3	FCM.....	16
3.2	Změna hladiny DAMP během léčby .....	18
3.3	Korelace DAMP s imunitními buňkami.....	20
3.4	Korelace DAMP s dobou přežití pacientů.....	21
3.4.1	Retrospektivní analýza .....	22
3.4.2	Prospektivní analýza.....	22
4	Klinické studie v databázi .....	23
4.1	Zveřejněné výsledky klinických studií.....	24
4.1.1	Klinické studie s detekcí DAMP a ICD.....	25
4.1.2	Klinické studie s detekcí DAMP .....	25
4.1.3	Klinické studie zmiňující ICD.....	26
5	Závěr .....	31
6	Použitá literatura .....	33
6.1	Internetové zdroje.....	39

# 1 Úvod

Nádor je heterogenní tkáň, kterou tvoří nádorové buňky, fibroblasty a další stromální buňky, dále endoteliální buňky a pericyty tvořící cévy a leukocyty – buňky imunitního systému (IS). Vlastní neoplastické buňky, které se nekontrolovatelně dělí, se u pevných nádorů označují jako parenchym. Ostatní buňky tvoří podpůrné stroma. Buňky vyvíjejícího se nádoru nabývají charakteristických a v čase se měnících vlastností, které jsou nutné pro ustanovení a růst v organismu. Mezi tyto vlastnosti patří nestabilní genom a omezená opravná kapacita DNA, soběstačnost v produkci růstových signálů, necitlivost k signálům zastavujícím růst, ochrana proti apoptóze, neomezený replikační potenciál, posílení angiogeneze, změny v energetickém metabolismu a únik z imunitní odpovědi<sup>1</sup>. Protinádorová imunitní odpověď závisí na přítomnosti konkrétní populace leukocytů v nádorovém mikroprostředí (TME, „tumor microenvironment“). Cytotoxická odpověď v podobě CD8<sup>+</sup>, ale i CD4<sup>+</sup> Th1 T lymfocytů nebo NK buněk je negativně vyvážená imunopresivními leukocyty, tedy některými subpopulacemi makrofágů a dalších myeloidních buněk nebo T supresorovými regulačními lymfocyty (T<sub>REG</sub>)<sup>2</sup>.

Za spuštěním imunitní odpovědi obecně, tedy nejen proti nádorovým buňkám, stojí adjuvantní molekuly, které se váží na receptory buněk IS (PRR, „pattern-recognition receptors“). Adjuvantní molekuly pocházejí buď z vnějšího prostředí a jsou to molekulární vzory společné pro skupiny patogenů (PAMP, „pathogen-associated molecular pattern“), nebo jsou to molekulární vzory asociované s nebezpečím původem z lidského těla (DAMP, „danger-associated molecular patterns“). Jejich vazba na PRR aktivuje buňky přirozeného IS, které pomocí kostimulačních molekul spouští následně adaptivní část IS<sup>3</sup>. Za fyziologických podmínek plní DAMP molekuly uvnitř buněk různé funkce, a primárně nejsou určené k sekreci do vnějšího prostředí. Při vystavení buněk stresovým podmínkám, které mohou vést až k buněčné smrti, jsou některé DAMP aktivně uvolňované do extracelulárního prostředí, kde plní roli výstražného signálu pro aktivaci IS<sup>3</sup>.

Podle komise NCCD („Nomenclature Committee on Cell Death“) se buněčná smrt rozděluje na náhodnou (ACD, „accidental cell death“) a regulovanou (RCD, „regulated cell death“)<sup>4</sup>. Podtypem RCD je programovaná buněčná smrt (PCD, „programmed cell death“), která nevyvolává imunitní odpověď, naopak působí tolerogenně, a je zásadní během vývoje i dospělého života organismu. Druhý podtyp RCD je tzv. imunogenní buněčná smrt (ICD, „immunogenic cell death“), během které buňka v daném časovém i prostorovém uspořádání vypouští DAMP molekuly do vnějšího prostředí<sup>5</sup>. Jedná se o kalretikulin (*CALR*) vystavený na povrchu buňky v brzké fázi smrti<sup>6</sup>, během apoptózy sekretovaný adenosintrifosfát (ATP)<sup>7</sup> a v pozdní fázi pasivně uvolněný protein HMGB1 („high mobility group box 1“, *HMGB1*)<sup>8</sup>. Vazbou na příslušné PRR stimulují buňky přirozené imunity, čímž je v důsledku aktivovaná i protinádorová adaptivní imunitní odpověď.

Termín ICD byl poprvé použitý v roce 2005<sup>9</sup>. V posledních letech je literatura zabývající se tímto tématem omezená především na souhrnné články, které citují ~10 let staré publikace a zároveň

uvádí, že přesné mechanismy spjaté s tímto typem buněčné smrti nebyly od té doby dostatečně objasněné<sup>5,10</sup>. Neustále jsou popisované nové induktory ICD, mezi které patří různé chemické látky, včetně běžně používaných chemoterapeutik, nebo některé fyzikální léčebné metody<sup>11</sup>. Vyhodnocení vlivu ICD na léčbu nádorových buněk probíhá většinou v *in vivo* experimentech na myších modelech, nebo *in vitro* detekcí externalizace DAMP molekul<sup>5</sup>.

Brzy po ustanovení konceptu ICD byl zdůrazňovaný jeho potenciál pro léčbu pacientů v klinické praxi<sup>12,13</sup>. Detekce ICD v odebraných vzorcích nádorových pacientů je omezená především na detekci CALR a HMGB1. Nejčastěji využívanými metodami pro detekci těchto DAMP jsou imunohistochemické metody spojené s mikroskopií (IHC, „immunohistochemistry“), enzymová imunoabsorpční esej (ELISA, „enzyme-linked immunosorbent assay“) a průtoková cytometrie (FCM, „flow cytometry“)<sup>14</sup>. Následuje prospektivní nebo retrospektivní vyhodnocení korelace mezi naměřenou hladinou DAMP a dobou přežití pacienta. V posledních 10 letech byla ICD, respektive s ní asociovaná externalizace DAMP, nebo použití experimentálně ověřených induktorů ICD, součástí klinických studií<sup>15</sup>. Většinu prováděných klinických studií včetně jejich popisu, stavu a výsledků shromažďuje databáze [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov).

Tato bakalářská práce si klade za cíl popsat změnu lokalizace DAMP molekul během ICD v experimentech s nádorovými buněčnými liniemi. Dále je jejím předmětem porovnání detekčních metod používaných v experimentech s metodami používanými pro vzorky nádorových onemocnění pacientů. Popsané budou výsledky korelace mezi přítomností DAMP a imunitní odpovědí nebo dobou přežití pacientů. Součástí práce je také vyhledání klinických studií zabývajících se ICD, jejich výčet, klasifikace a zhodnocení dostupnosti výsledků.

## 2 Imunogenní buněčná smrt nádorových buněk

Princip léčby nádorových onemocnění se původně opíral především o cytostatické vlastnosti léčebných přípravků. Nyní je pozornost upřena směrem k interakci mezi imunitním systémem a nádorem, a jak ji protinádorové zásahy ovlivňují<sup>5</sup>. Imunitní systém je komplexní mechanismus ochrany těla a na jeho základních principech je postavená teorie ICD nádorových buněk, která po aktivaci adaptivního IS vede k likvidaci nádoru.

### 2.1 Imunitní systém a nádor

Hlavní funkcí IS je zachování homeostázy organismu, tedy stabilního vnitřního prostředí. IS se dělí na dvě vzájemně propojené složky – přirozenou a adaptivní. Buňky obou složek, tedy leukocyty neboli bílé krvinky, spolu komunikují pomocí cytokinů, chemokinů a dalších rozpustných látek, dále také pomocí buněčných povrchových molekul, a společně tak vytváří IS. Mezi buňky přirozené imunity patří antigen-prezentující buňky (APC, „antigen-presenting cell“), NK buňky („natural killer cells“) a granulární leukocyty (bazofilní, neutrofilní a eozinofilní granulocyty). Do skupiny APC se řadí

dendritické buňky (DC, „dendritic cell“), tedy profesionální APC, a makrofágy. PRR receptory na buňkách přirozené imunity jsou geneticky určené v zárodečné linii a rozeznávají vzory společné pro skupiny patogenů (PAMP)<sup>16</sup>. Během imunitní odpovědi je přirozená část spuštěná jako první a jedním z jejích úkolů je stimulace části adaptivní. Buňkami adaptivní imunity jsou lymfocyty – T buňky (TC, „T cell“) a B buňky. Adaptivní imunita je schopná specificky rozpoznat téměř jakoukoli strukturu, tzv. antigen (Ag), a to díky somatické rekombinaci v genech pro receptory T buněk (TCR, „T-cell receptor“) a receptory B buněk, které jsou následně sekretované ve formě protilátek (Ab, „antibody“)<sup>17</sup>.

### 2.1.1 Spuštění imunitní odpovědi

Na počátku spuštění imunitní odpovědi je stimulace buněk přirozené imunity adjuvantními molekulami. Adjuvantní molekuly, jako jsou exogenní PAMP a endogenní DAMP, se vážou na PRR na APC. Nejdůležitějšími PRR jsou TLR („Toll-like receptors“) a NLR („Nod-like receptors“). Vazba ligandu na PRR a následné signalizační dráhy vedou k produkci cytokinů, které v důsledku určují imunitní odpověď zacílenou proti tělu škodlivým subjektům, nebo naopak toleranci vůči neškodným<sup>3</sup>. Pro indukci protinádorové imunitní odpovědi jsou důležité především DAMP molekuly. Jejich sekrece do extracelulárního prostředí se původně vztahovala pouze k náhlé smrti buňky<sup>3</sup>, ale k jejich uvolnění mimo buňku dochází i během řízené buněčné smrti v závislosti na molekulárních mechanismech odpovědi buňky na stres<sup>18</sup>.

Pro přenos informace o aktivaci imunitní odpovědi od APC směrem k adaptivní imunitě je nezbytná aktivace multiproteinového komplexu označovaného jako inflamazom. Jeden z typů inflamazomu je tvořený proteinem NLRP3 (*NLRP3*, syn. NALP3, cryopyrin) a efektorovým enzymem kaspáza 1 (*CASP1*). Aktivace komplexu vede ke štěpení prekurzoru prozánětlivého cytokinu pro-IL-1 $\beta$  na IL-1 $\beta$  (*IL1B*)<sup>19,20</sup>. Za štěpení prekurzorů na aktivní cytokiny jsou v imunitním systému zodpovědné právě cysteinové proteázy kaspázy, které mají ve svém aktivním centru aminokyselinu cystein a štěpí specificky za kyselinou asparagovou<sup>21</sup>.

### 2.1.2 Kostimulace adaptivní části IS

Účinná adaptivní protinádorová odpověď je daná hlavně TC, a to především cytotoxickým typem imunitní odpovědi, tedy Th1-polarizovanou odpovědí. TCR rozeznávají antigenní peptid (Ag-peptid) prezentovaný v komplexu s glykoproteiny MHC-I v případě CD4<sup>+</sup> TC (Th buňky, „T helper cells“) nebo MHC-II v případě CD8<sup>+</sup> TC (CTL, „cytotoxic T lymphocyte“). Za Th1 typ imunitní odpovědi jsou zodpovědné efektorové CTL, ale také pomocné Th buňky. Vedle rozpoznání Ag je pro plnou aktivaci nezkušených TC nutná exprese kostimulačních molekul *CD80*, *CD86* na povrchu plazmatické membrány (PM, „plasma membrane“) DC<sup>22</sup>.

Před prezentací Ag-peptidu na MHC je nutné jeho zpracování a v případě prezentace na MHC-II i jeho pohlcení z extracelulárního prostoru. APC, především pak DC, pohlcují zbytky umírajících buněk mechanismem konstitutivní (neustálé) makropinocytózy<sup>23</sup>. Tyto profesionální APC

následně vystaví pohlcené exogenní antigeny na MHC-II, který je rozeznávaný Th buňkami. Na MHC-I jsou přirozeně vystavované Ag-peptidy vlastní každé buňce a ty jsou rozeznávané CTL. Některé profesionální APC jsou schopné tzv. zkřížené prezentace, kdy je na MHC-I vystavený Ag-peptid, který byl pohlcený z extracelulárního prostoru. Tím dochází ke stimulaci nezkušených CTL specifických pro Ag pocházející z mrtvých nádorových buněk. Aktivované CTL navodí smrt zbylých nádorových buněk, které mají stejný Ag vystavený na MHC-I<sup>22</sup>.

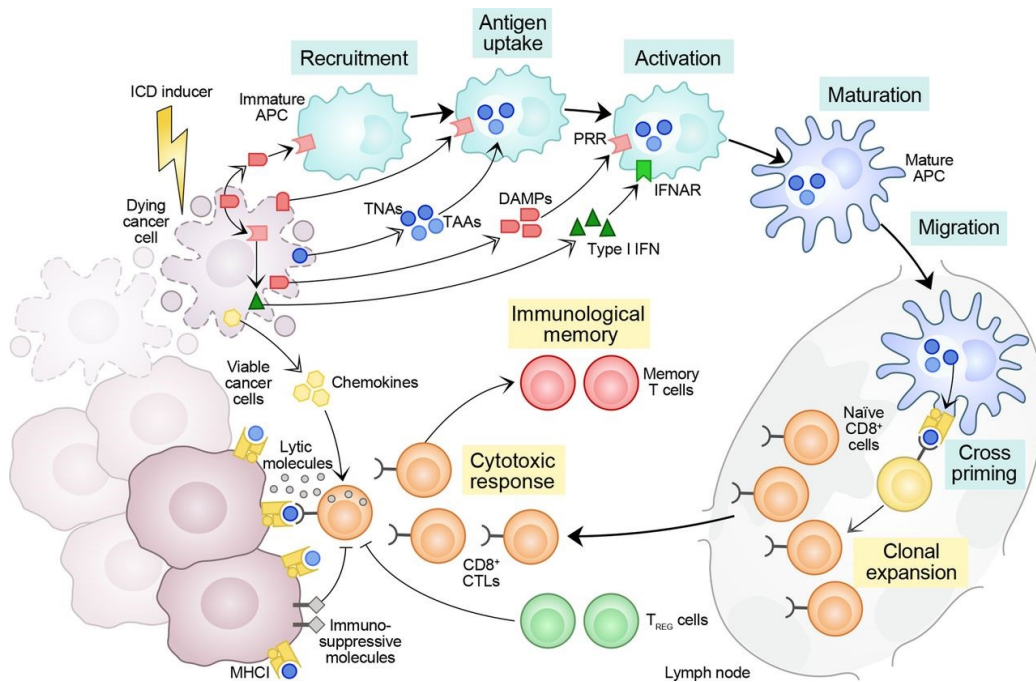
Aby byl Ag z nádorové buňky specificky rozpoznán TC, nesmí se zúčastnit procesu centrální tolerance probíhající v brzlíku, kde se TC učí rozpoznávat tělu vlastní antigeny<sup>24</sup>. Nádorové neoantigeny (TNA, „tumor neoantigen“), které vznikají náhodnými somatickými mutacemi v nádorových buňkách, nemohly být prezentované TC v rámci centrální tolerance<sup>25</sup>. Alternativou TNA jsou antigeny asociované s nádorem (TAA, „tumor-associated antigen“), které sice jsou pro buňky organismu vlastní a vyskytují se tedy v procesu centrální tolerance, nicméně ten není stoprocentní. TAA jsou nádorovými buňkami exprimované ve zvýšené míře a v přítomnosti adjuvantních molekul mohou být cílem imunitní odpovědi<sup>26</sup>.

Nádorové buňky náhodným způsobem mutují a vytváří tak klony, které se brání protinádorové imunitní odpovědi expresí molekul tlumících imunitní odpověď. Příkladem negativních regulátorů, tzv. kontrolních bodů IS („immune checkpoints“) je exprese PD-L1 („programmed cell death ligand 1“, [CD274](#)), který vazbou na PD-1 ([PDCDI](#)) na TC vede k inhibici cytotoxické imunitní odpovědi. K zastavení této odpovědi vede také vazba CTLA-4 ([CTLA4](#)) na CD80 nebo CD86 na povrchu DC. CTLA-4 na TC má k těmto kostimulačním receptorům vyšší afinitu než aktivační CD28 ([CD28](#)) a negativní zpětnou vazbou tak potlačuje aktivaci TC. Proti těmto proteinům je namířená imunoterapie v podobě inhibičních monoklonálních protilátek (ICB, „immune checkpoint blockade“, syn. ICI, „immune checkpoint inhibitors“). Nejčastěji používané ICB blokuje CTLA-4 (ipilimumab), PD-L1 (atezolizumab, avelumab, durvalumab) nebo PD-1 (pembrolizumab, nivolumab). Tato terapie blokuje inhibici TC, posiluje celkovou adaptivní imunitní odpověď, včetně té protinádorové, jelikož nedochází k potlačení TC odpovědi na základě vysoké exprese inhibičních molekul nádorovými buňkami<sup>27</sup>.

## 2.2 Princip ICD

Původní autoři konceptu ICD tento typ buněčné smrti aktuálně definují jako specifický typ RCD, který je schopný aktivovat adaptivní imunitní odpověď. ICD propojuje výše popsané mechanismy protinádorové imunitní odpovědi, kdy umírající nádorová buňka uvolňuje adjuvantní molekuly (zde výhradně DAMP) schopné stimulovat přirozenou část IS. Ta následně aktivuje adaptivní CTL specifické pro TAA nebo TNA<sup>4,5</sup>. Všechny složky konceptu ICD jsou zobrazené na schématu, viz Obrázek 1, str. 5. Jiná definice pohlíží na ICD spíše jako na komplexní souhru interakcí mezi umírající buňkou a IS než jako speciální příklad RCD<sup>28</sup>. Z hlediska dělení buněčné smrti na základě morfologie a signálních proteinů spadají pod ICD různé typy. Jedná se o apoptotickou smrt podmíněnou kaspázami a

následovanou sekundární nekrotózou<sup>8,9</sup>, nekroptózu – regulovaný typ nekrózy závislý na proteinech RIPK3 (*RIPK3*) a MLKL (*MLKL*)<sup>29,30</sup> a pyroptózu – další regulovaný typ nekrózy spojený s kaspázovým štěpením gasderminu D (*GSDMD*)<sup>31</sup>.



Obrázek 1: Schéma imunogenní buněčné smrti a jejích hlavních složek. ICD induktory vyvolávají stres v buňce vedoucí až k její smrti. Během své smrti buňka vypouští DAMP molekuly, které spouští imunitní odpověď. Solubilní DAMP zajišťují přilákání („recruitment“) profesionálních APC, DAMP vystavené na PM pohlcení Ag (TNA nebo TAA) profesionálními APC, a společně s IFN I aktivaci těchto buněk přirozené imunity. APC dozrávají a přesouvají se do lymfatické uzliny, kde zkříženou prezentací antigenu stimulují klonální expanzi CD8<sup>+</sup> TC (CTL) specifických pro nádorový Ag. Tyto CTL se vrací do prostředí nádoru, kde vyvolávají cytotoxickou odpověď vedoucí ke smrti zbylých nádorových buněk, které na svém MHC-I prezentují specifický Ag. Z části CTL se stávají paměťové buňky zajišťující imunologickou paměť. Cytotoxická odpověď je potlačována regulačními TC a imunosupresivními molekulami na povrchu nádorových buněk. Převzato z Galluzzi et al.<sup>5</sup>

### 2.2.1 Induktory ICD

Mezi induktory ICD patří velké množství chemických látek různého původu a některé fyzikální léčebné metody. Seznam induktorů ICD neustále roste a jejich aktuální výčet lze nalézt v souhrnném článku<sup>11</sup>. Pro tuto bakalářskou práci není nutné vyjmenování veškerých induktorů, ale především těch, které jsou rutinně používány v klinické praxi pro léčbu pacientů s nádorovým onemocněním. Jedná se antracyklínovou chemoterapii, konkrétně doxorubicin (DOX)<sup>6,7,9,32,33</sup>, mitoxantron (MTX)<sup>6,32,34</sup>, idarubicin (IDA)<sup>6,35</sup> a epirubicin (EPI)<sup>i</sup>, dále také o oxaliplatinu (OXP)<sup>7,33,34,38,39</sup>, cyklofosfamid (CP)<sup>40</sup> či bortezomib<sup>41</sup>. Léčba založená na fyzikálních metodách probíhá ve formě radioterapie<sup>42-44</sup>, ultrafialového světla C (UVC)<sup>43</sup> a fotodynamické terapie pomocí hypericinu (Hyp-PDT)<sup>45,46</sup>.

<sup>i</sup> Primární publikace neobsahují potvrzení EPI jako induktoru ICD, přesto je jako induktor označován v souhrnných člancích původních autorů ICD Galluzzi *et al.*<sup>5,11,36,37</sup>.

Induktory ICD ovlivňují především adjuvantní složku imunitní reakce, tedy uvolnění DAMP molekul z buňky<sup>11,47</sup>. Nádorové buňky vystavené induktorům ICD jsou preferenčně pohlcované buňkami přirozené imunity. A to v porovnání s jinými cytostatickými přípravky<sup>35</sup>, nebo neléčenými kontrolami. Pohlcení buněk vystavených induktorům ICD zároveň vede k maturaci DC a zvýšené expresi MHC-II, CD80 a CD86 molekul<sup>9,45,48</sup>. Antigenní složkou imunitní odpovědi se experimenty ani klinické studie v rámci ICD prakticky nezabývají<sup>26</sup>. V *in vitro* podmínkách je ICD určené detekcí externalizace DAMP, případně kvantifikace produkce IFN- $\gamma$  (*IFNG*), který indikuje aktivaci TC<sup>7,8,35,38,39,49,50</sup>. Komplexní vyhodnocení ICD včetně navození adaptivní imunitní odpovědi a imunologické paměti se provádí *in vivo* vakcinačními testy na syngenních myších modelech, protože je nutné použití imunokompetentního organismu. Nejčastěji se jedná o buněčnou linii CT26 a myši BABL/c, případně linii EL4 a kmen C57BL/6<sup>5-8,45,51</sup>. V myších modelech byl také popsán význam kombinace induktorů ICD s imunoterapeutickými přístupy ICB popsanými v kapitole 2.1.2, str. 3<sup>52,53</sup>. Účinek této kombinované léčby je u lidských pacientů zkoumaný v rámci klinických studií<sup>11</sup>, dále popsaných v kapitole 4, str. 23.

## 2.3 DAMP molekuly asociované s ICD

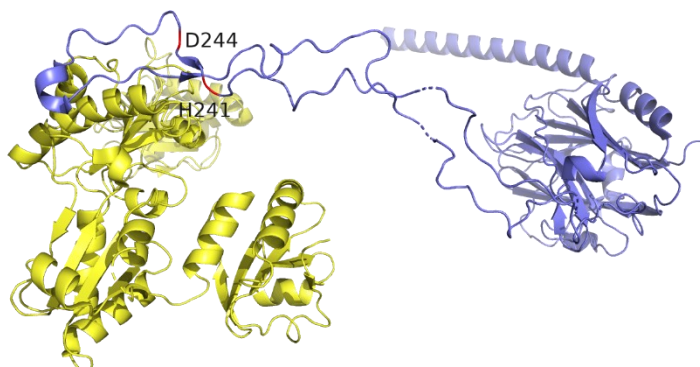
Zásadním rozdílem mezi ICD a tolerogenní apoptózou jsou uvolněné DAMP molekuly schopné spustit imunitní odpověď. Nejdůležitější a nejvíce prozkoumaný je preapopticky na povrch vystavený CALR, během apoptózy sekretované ATP a postapopticky uvolněný HMGB1. Dalšími, výrazně méně studovanými, jsou annexin A1 (*ANXA1*), proteiny teplotního šoku (HSP, „heat shock protein“) a některé z cytokinů a chemokinů. Tato kapitola obsahuje doklady o roli DAMP molekul získané *in vitro* experimenty s myšimi nebo lidskými buněčnými liniemi.

### 2.3.1 Ecto-CALR

CALR patří mezi chaperony v lumen endoplazmatického retikula (ER), tedy proteiny, které se podílejí na kontrole správného sbalení proteinů. Zároveň patří do skupiny lektinových proteinů, které jsou schopné rozpoznat glykosylované proteiny. Právě tak rozeznává špatně sbalené proteiny v rámci takzvaného „calnexin/calreticulin cycle“, kde zprostředkovává vazbu výkonných chaperonů ERp57 (*PDIA3*), CYPB (*PPIB*) a ERp29 (*ERP29*)<sup>54</sup>. Jak už jeho název napovídá, CALR je schopný vazby Ca<sup>2+</sup> a podílí se tak na udržení iontové homeostázy v ER<sup>55</sup>. Další fyziologickou funkcí CALR uvnitř ER je tvorba „lešení“ v tzv. PLC („peptide loading complex“), kde propojuje proteiny tohoto komplexu (MHC-I, ERp57, *TAPBP*, *TAP1* a *TAP2*), při správném vystavení Ag-peptidu na MHC-I (viz kapitola 2.1.2, str. 3)<sup>56</sup>.

Po vystavení buněk induktorům ICD jako je MTX<sup>6,34,45,50,57-61</sup>, OXP<sup>34,39,48,50,57,62</sup>, DOX<sup>6,35,45,57,61-63</sup>, IDA<sup>6,35</sup>, UVC<sup>34,43,58</sup>, Hyp-PDT<sup>45</sup> a radioterapie pomocí gama záření<sup>43</sup>, dochází k přesunu CALR z ER na povrch buňky (ecto-CALR). Společně s CALR se na povrch přesouvá i disulfid izomeráza ERp57<sup>6,57,58,61,62</sup>. Pro tento přesun není klíčová její enzymatická funkce, ale fyzický kontakt mezi CALR a ERp57, který je narušený bodovou mutací v CALR H241D / D244W<sup>58</sup>, viz Obrázek 2, str. 7.

V původních publikacích je popsána výlučná vzájemná role ecto-CALR a ecto-ERp57<sup>58,64</sup>. Jinde však uvádí, že jde pouze o jednostranný vztah, kdy je ERp57 nutný pro ecto-CALR, nikoliv naopak<sup>62</sup>, či úplně vylučují potřebu ERp57 pro ecto-CALR<sup>61</sup>.



Obrázek 2: Vizualizace fyzické interakce mezi CALR (modrý) a ERp57 (žlutý), včetně dvou aminokyselin, jejichž mutace (H241D, D244W) inhibuje přesun proteinů na povrch během ICD<sup>58</sup>. Vytvořeno v softwaru [PyMOL](#), na základě pdb souboru [6ENY](#).

Ecto-CALR není na povrchu buňky rozmístěn rovnoměrně, ale tvoří shluky<sup>34,45,50,57,65</sup>, a je součástí lipidových raftů bohatých na cholesterol<sup>45,65</sup>. K jeho přesunu na povrch dochází v preapoptické fázi<sup>6,34,39</sup>, ještě před vystavením fosfatidylserinu (PS, „phosphatidylserin“) na PM<sup>45</sup>, což je typickým znakem apoptotické smrti. Během ICD vyvolané MTX byl popsán přesun CALR na povrch ve dvou fázích. První nastává po 4 hod., hodnoty ecto-CALR (% povrchová exprese) prudce stoupají na ~400 % a následně klesají na kontrolní hodnotu 100 %. Druhá fáze je pozvolná, od 12. hodiny po 48. hodinu hodnota postupně narůstá až k ~400 %<sup>59</sup>. Umístění na povrchu bylo původně detekované hmotnostní spektrometrií<sup>6</sup>. Obvykle se ale v experimentu používá metoda průtokové cytometrie<sup>34,35,57,59–62</sup>, biotinylace povrchových proteinů následované imunoblotem<sup>6,45,50,58,62</sup> nebo imunofluorescenční mikroskopie<sup>6,34,46,50</sup>.

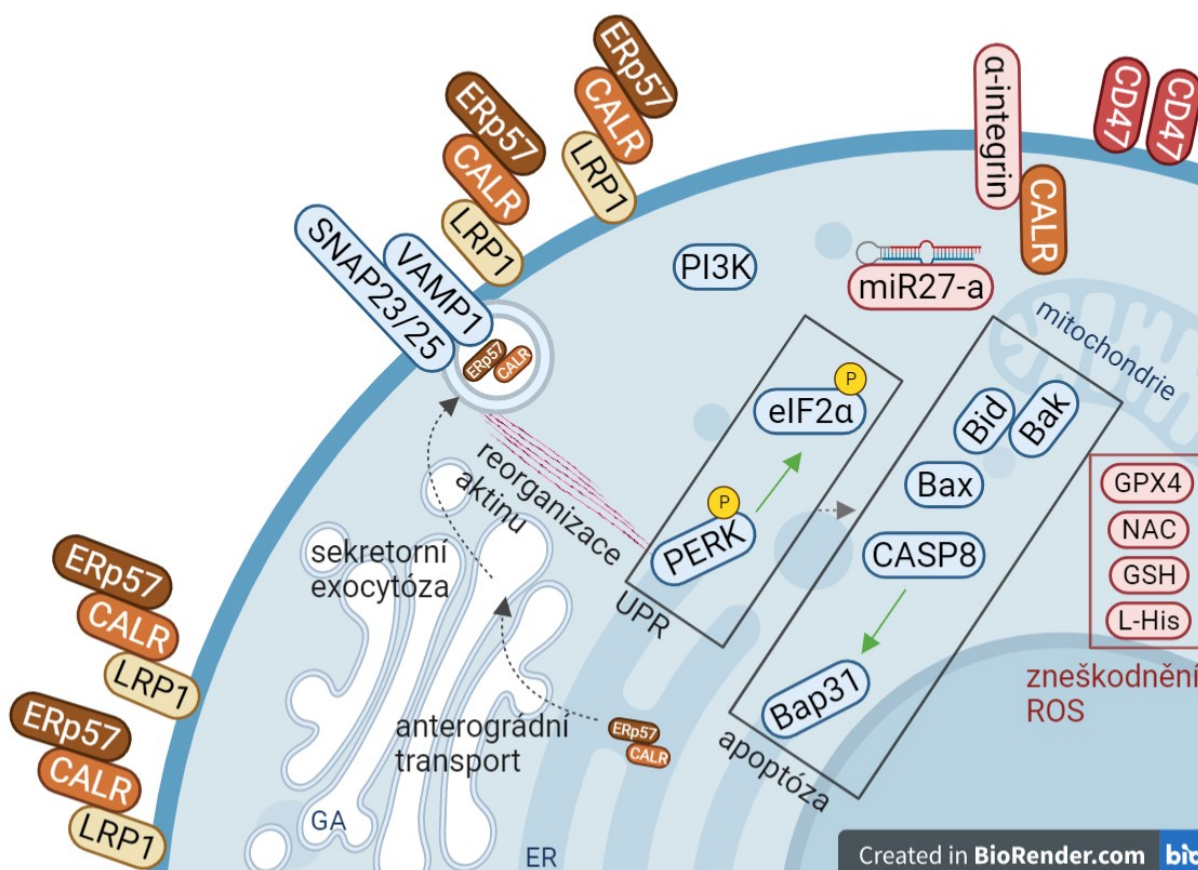
Při kvantifikaci buněk nádorových linií pozitivních pro ecto-CALR (ecto-CALR<sup>+</sup>) je 5-10 % pozitivních bez léčby induktorem ICD<sup>57,58</sup>. Obecně je navýšení povrchové přítomnosti po léčbě nádorových buněk závislé na kaspázách, jak dokazuje snížení ecto-CALR při použití nespecifického inhibitoru kaspáz z-VAD-fmk<sup>6,45</sup>. Transport je charakterizovaný anterográdním přesunem z ER do Golgiho aparátu (GA) a váčkovou exocytózou pomocí aktinového cytoskeletu<sup>6,34,45</sup>. Konkrétní proteiny zodpovědné za přesun byly stanovené farmakologickou nebo genetickou (shRNA / siRNA) inhibicí. Při takové inhibici dochází ke snížení ecto-CALR, což je při použití FCM kvantitativně vyhodnocené jako pokles ecto-CALR<sup>+</sup> buněk (v %) <sup>34,50,57</sup>, při imunoblotu kvantitativně jako hladina proteinu, avšak někdy pouze kvalitativně zobrazené<sup>45,49,50,61</sup>.

K přesunu CALR po léčbě antracyklíny dochází na základě aktivace jedné ze signalizačních drah spojených se stresem ER (UPR, „unfolded protein response“, obecněji ISR, „integrated stress response“). Jedná se o fosforylaci, a tedy aktivaci kinázy PERK ([EIF2AK3](#)), která fosforyluje translační

faktor eIF2 $\alpha$  ([EIF2A](#))<sup>6,34,57,60,61</sup>. Mezi mechanismy UPR patří také aktivace proteinů IRE1 $\alpha$  a ATF6, ty ale neovlivňují přesun CALR během ICD<sup>57</sup>. Pro ecto-CALR je tedy zásadní fosforylovaný eIF2 $\alpha$  (p-eIF2 $\alpha$ ). Při mutaci aminokyseliny serin na alanin (S51A), nelze eIF2 $\alpha$  fosforylovat a % ecto-CALR<sup>+</sup> buněk odpovídá neléčené kontrole (5 %)<sup>34</sup>. Vedle kinázy PERK jsou za p-eIF2 $\alpha$  zodpovědné i kinázy PKR ([EIF2AK2](#)) a GCN2 ([EIF2AK4](#))<sup>60,61</sup>. Dalším funkčním systémem podílejícím se na ecto-CALR jsou proteiny apoptózy, jako je kaspáza 8 ([CASP8](#)), Bap31 ([BCAP31](#)), Bax ([BAX](#)) a Bak ([BAK](#))<sup>34,45</sup>. Za poslední krok translokace jsou zodpovědné proteiny rodiny SNARE, které zajišťují splynutí vaku ([VAMP1](#)) s PM ([SNAP25](#))<sup>34</sup>.

Pokud jsou nádorové buňky vystavené Hyp-PDT, ecto-CALR není na povrchu společně s ERp57, není zapotřebí ani p-eIF2 $\alpha$ , avšak nutné jsou kinázy PERK a PI3K<sup>45</sup>. Jak v případě chemoterapeutické léčby, tak Hyp-PDT je ecto-CALR závislý na vazbě na receptor CD91 ([LRPI](#)), jelikož samotný nemá transmembránovou doménu, která by zajistila jeho vystavení na PM<sup>45</sup>. Jako negativní regulátory translokace CALR se ukázaly antioxidanty zneškodňující volné reaktivní formy kyslíku (ROS, „reactive oxygen species,“) (L-histidin, GPX4, NAC, GSH)<sup>34,49</sup>. Dále také mikroRNA miR27-a, která snižuje fosforylaci PERK, tedy i eIF2 $\alpha$ , a přesun CALR na povrch<sup>50</sup>. Tato miR27-a je ve zvýšené míře exprimovaná v některých nádorových buňkách (př. adenokarcinom, kolorektální karcinom) a přímou interakcí brání syntéze proteinu CALR<sup>50,66</sup>. Negativní vliv na ecto-CALR mají také různé  $\alpha$ -integriny. CALR se váže na aminokyselinový motiv GFFKR v cytosolické doméně těchto membránových proteinů, což znemožňuje jeho přesun na povrch<sup>62,63</sup>. Podle autorů Liu *et al.* by k této interakci mělo docházet v cytosolu – vnitřním tekutém prostředí buňky mimo vaku. Avšak podle výše popsaných mechanismů se CALR dostává na povrch váčkovým transportem. Mechanismy translokace CALR z ER na povrch buňky včetně příslušných molekul jsou zobrazené na schématu, viz Obrázek 3, str. 9.

Výše zmíněný receptor CD91 je zároveň receptorem na DC, díky kterému dochází na základě ecto-CALR k pohlcení umírajících nádorových buněk<sup>48,65</sup>. Pro efektivnější pohlcení dochází na PM umírajících buněk k segregaci proteinu CD47 ([CD47](#)), který procesu pohlcení zabraňuje<sup>65,67</sup>. V konceptu ICD je ecto-CALR zodpovědný za iniciaci procesu fagocytózy<sup>6,62,64,67</sup>. Základním předpokladem ale je, že pohlcené Ag z nádorových buněk budou prezentované na molekulách MHC-I / MHC-II na povrchu DC. DC jsou ale mnohem menší než buňky nádorové, a tak nemohou nádorovou buňku fagocytovat celou jako makrofágy, ale pohlcují pouze malé fragmenty buněk makropinocytózou, která následně vede k prezentaci Ag<sup>23,48,65</sup>. Každopádně ecto-CALR je nezbytný pro imunitní odpověď sledovanou při vakcinačních experimentech na myších modelech<sup>6,45,58</sup>.



Obrázek 3: Schéma mechanismů spojených s přesunem CALR z ER během ICD. Molekuly, které hrají roli v translokaci CALR jsou zobrazené včetně jejich reálné lokalizace v buňce. Modře značené jsou molekuly s pozitivním vlivem na ecto-CALR, červeně pak molekuly s negativním vlivem. Vytvořeno pomocí [BioRender.com](https://www.biorender.com)

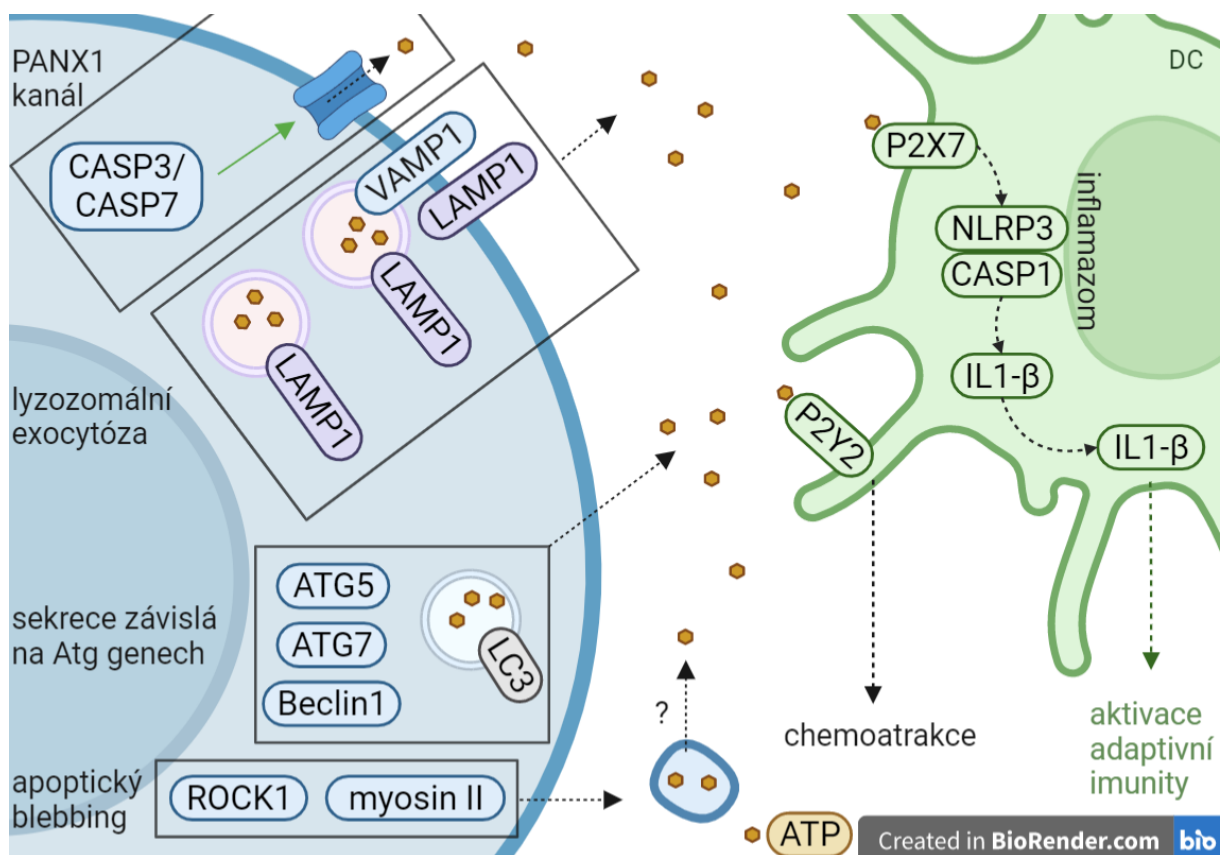
### 2.3.2 Extracelulární ATP

ATP je purinový nukleotid, který je za homeostatických podmínek umístěn výhradně uvnitř buňky. Jeho hlavní intracelulární rolí je přenos energie v biochemických drahách metabolismu buňky<sup>68</sup>. Během ICD dochází k sekreci ATP ven z umírající buňky, a to v důsledku působení induktorů DOX<sup>7,61,69,70</sup>, OXP<sup>7,38,51</sup>, MTX<sup>38,51,61,69</sup>, Hyp-PDT<sup>45,49</sup>, UVC<sup>71,72</sup>. Takto sekretované ATP (eATP) je nejčastěji detekované v supernatantu buněk pomocí komerčních kitů založených na luciferin-luciferázové reakci, která probíhá pouze v přítomnosti ATP<sup>7,49–51,61,72</sup>. Výjimečně pak pomocí FCM nebo imunofluorescenční mikroskopie po značení fluorochromem citlivým na ATP (quinacrine)<sup>51</sup>.

K vypuštění ATP dochází během apoptózy kombinací několika mechanismů<sup>51</sup>, jejich přesná role ale není plně objasněná<sup>61</sup>. Prvním objeveným mechanismem je uvolnění kanálem pannexin 1 (*PANX1*), který je aktivovaný kaspázou 3 (*CASP3*) nebo kaspázou 7 (*CASP7*)<sup>51,70,72</sup>. Tyto kaspázy proteolyticky odštěpí autoinhibiční C-koncovou doménu kanálu, čímž ho aktivují<sup>72,73</sup>. Tato sekrece však není pro imunogenní vlastnosti během ICD vyvolané antracyklíny dostatečná, a tak je doplněná lyzozomální exocytózou a sekrecí závislou na genech *ATG*<sup>38,51,70</sup>. Konkrétně se jedná o *ATG5*, *ATG7*<sup>38</sup> a Beclin1 (*BECN1*)<sup>61</sup>. Po Hyp-PDT není signifikantní rozdíl mezi sekrecí ATP bez funkčního *ATG5* a kontrolou<sup>49</sup>.

ATP se v buňce před léčbou nachází v lyzozomech ( $LAMP1^+$ ), následuje přesun do autolyzozomů nebo autofagozomů ( $LC3^+$ )<sup>51,61</sup>. Exocytóza těchto váčků je závislá na VAMP1 proteinu, a zároveň se během ní dostává na povrch LAMP1 (*LAMP1*)<sup>51</sup>. Posledním mechanismem je apoptický *blebbing* závislý na kináze ROCK1 (*ROCK1*) a proteinech rodiny myosin II<sup>51</sup>. Vzniklé apoptické váčky jsou vůči extracelulárnímu prostředí uzavřené, příspěvek tohoto procesu pro eATP tedy není přesně vysvětlený.

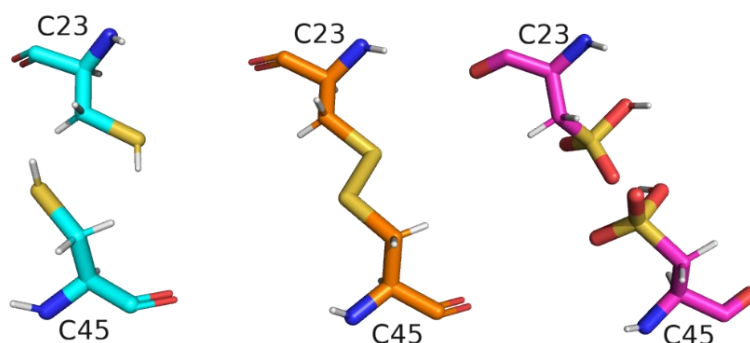
Extracelulární ATP má v rámci ICD dvě hlavní funkce. První z nich je chemoatrakce monocytů a DC ( $CD11c^+$ ), ověřená jak *in vitro*, tak v *in vivo* v myších modelech. K migraci buněk přirozené imunity dochází v důsledku vazby ATP na purinergní receptor P2Y2 (*P2RY2*)<sup>69,71</sup>. Druhou funkcí je aktivace inflamazomu v DC, což následnou produkcí cytokinu IL-1 $\beta$  vede ke stimulaci adaptivních TC a produkci IFN $\gamma$ , opět jak *in vitro*, tak *in vivo*<sup>7,38</sup>. V tomto případě se ATP váže na receptor P2X7 (*P2RX7*), následuje NLRP3 kaskáda, tvorba inflamazomu a aktivace CASP1, která naštěpením aktivuje IL-1 $\beta$ <sup>7</sup>. Tyto imunogenní vlastnosti eATP jsou negativně ovlivňované ektonukleotidázami CD39 (*ENTPDI*) a CD73 (*NTSE*), které rozkládají ATP na imunosupresivní formy adenosindifosfát a adenosinmonofosfát<sup>68</sup>. Kvůli této aktivitě dochází ke snížení schopnosti přilákání buněk IS nebo jejich aktivace<sup>38,69,71</sup>. Funkce eATP v TME tedy závisí na přítomnosti různých povrchových receptorů a může být jak protinádorová, tak pronádorová<sup>68</sup>. Různé mechanismy sekrece a funkce eATP v rámci ICD shrnuje schéma, viz Obrázek 4 níže.



Obrázek 4: Schéma mechanismů sekrece ATP a funkce v extracelulárním prostoru během ICD. Vytvořeno pomocí [BioRender.com](https://www.biorender.com)

### 2.3.3 Extracelulární HMGB1

Dalším proteinem, který patří mezi DAMP uvolňované z buňky během ICD, je HMGB1. Ve zdravých buňkách se tento protein nachází v jádře. Jedná se o nehistonový protein ze dvou domén (boxA, boxB). Každá z těchto domén je tvořena třemi alfa-helixy, které jsou vůči sobě postavené do písmene „L“, a tvoří tak specifickou doménu (HMG-box). Díky ní se HMGB1 váže na DNA, způsobuje její ohyb a umožňuje tak vazbu dalších proteinů, například transkripčních faktorů<sup>74</sup>. V sekvenci tohoto proteinu se nachází tři cysteiny, tedy aminokyseliny, jejichž postranní řetězec je zakončený atomem síry (C23, C46, C106). Atomy síry se podle redoxních vlastností prostředí vyskytují v různých oxidoredukčních stavech – v redukujícím je postranní řetězec zakončený sírou a vodíkem (-SH), v oxidujícím disulfidickým můstkem (S-S), a v silně oxidujícím sulfonovou kyselinou (SO<sub>3</sub>H), viz Obrázek 5 níže. Díky tomu může HMGB1 nabývat tří forem – frHMGB1 („fully reduced“), dsHMGB1 („disulfide“, S-S mezi C23-C45), foHMGB1 („fully oxidized“, cysteiny s SO<sub>3</sub>H).



Obrázek 5: Detailní zobrazení konkrétních stavů síry v postranním řetězci aminokyselinových zbytků cysteinu C23 a C45 v proteinu HMGB1. V redukujícím prostředí je cystein zakončený atomem síry a vodíku (modrá struktura), v oxidujícím prostředí dva atomy síry tvoří disulfidický můstek (oranžová struktura) a v silně oxidujícím jsou cysteiny zakončené kyselinou sulfonovou (fialová struktura). Barevné rozlišení atomů: uhlík (barva příslušné struktury), síra (žlutá), kyslík (červený), dusík (tmavě modrý), vodík (bílý). Struktury jsou zobrazené pomocí softwaru [PyMOL](#), na základě dat predikovaných v Panneerselvam et al.<sup>75</sup>

Do extracelulárního prostoru se HMGB1 dostává dvěma způsoby. Prvním způsobem je aktivní proces neklasické sekrece proteinů LLSP („leaderless secretory protein“), kterým je uvolňovaný z buněk IS<sup>76</sup>. Naopak nádorové buňky vystavené DX<sup>8,35,61</sup>, MTX<sup>39,61</sup>, IDA<sup>35</sup>, OXP<sup>8,39</sup>, CP<sup>40</sup> a radiaci<sup>77</sup> uvolňují HMGB1 pasivně. Přesný mechanismus není vyjasněný<sup>5</sup>, nicméně po MTX / OXP / DX dochází k přesunu HMGB1 do cytoplazmy<sup>39,57</sup>. Odtud se do okolí dostává v pozdní fázi apoptózy, respektive během sekundární nekrozy, kdy dochází k ruptuře PM (nejméně po 6 hod., s maximem po 24 hod.)<sup>8,35,39,61,77,78</sup>. Přítomnost HMGB1 v okolí buněk (supernatantu) je detekovaná metodou ELISA<sup>8,35,39</sup> nebo imunoblotem<sup>40,50,61</sup>.

Funkce HMGB1 v extracelulárním prostředí a vazba na příslušné receptory závisí na formě, ve které se protein nachází. Ve stavu frHMGB1 se dostává z redukujícího prostředí buňky, v oxidujícím extracelulárním okolí se mění na dsHMGB1, který může být působením ROS oxidovaný až na foHMGB1<sup>79</sup>. FrHMGB1 tvoří heterodimer s chemokinem CXCL12 ([CXCL12](#)) a společně se vážou

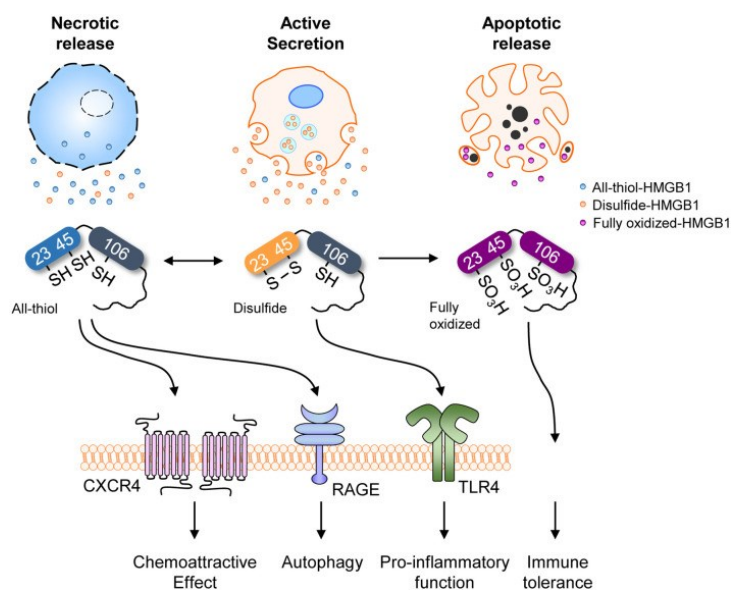
na CXCR4 ([CXCR4](#)) receptor buněk přirozené imunity a tím stimulují migraci těchto buněk<sup>79,80</sup>. Interakci mezi frHMGB1 a dvěma molekulami CXCL12 lze vizualizovat bioinformatickými metodami („protein-protein docking“)<sup>81</sup>. DsHMGB1 s redukovaným C106<sup>82</sup> a disulfidickým můstkem C23-C45 se přes adaptorový protein MD2 ([LY96](#)) váže na TLR4 ([TLR4](#))<sup>83</sup> a tím spouští signalizační kaskádu vedoucí k aktivaci transkripčního faktoru NFκB a produkci prozánětlivých cytokinů (TNF, IL-1β)<sup>79</sup>.<sup>ii</sup> Stejně jako v předchozím případě byla vazba dsHMGB1 na TLR4 na základě predikovaných struktur zobrazená v bioinformatické studii<sup>75</sup>. Chemoatrakční i imunostimulační vlastnosti extracelulárního HMGB1 se ztrácí, pokud dojde k jeho plné oxidaci díky ROS uvolňovaných během tolerogenní apoptózy<sup>78</sup>.

Vazba na receptor TLR4 bez určení přesné formy HMGB1 je zásadní pro ICD. Signalizace spuštěná HMGB1 na TLR4 vede přes adaptorový protein MYD88 ([MYD88](#)) k prezentaci Ag na MHC-I a MHC-II DC. Tato signalizace nemá vliv přímo na pohlcení Ag nebo umírajících buněk, ale zajišťuje, že pohlcený materiál není degradován v lyzozomu<sup>8</sup>. Zároveň je HMGB1 zodpovědné za stimulaci TC stanovenou produkcí IFN-γ *in vitro*<sup>39</sup>. Imunogenní vlastnosti HMGB1 byly potvrzené také v *in vivo* myším vakcinačním modelu<sup>8,39</sup>. Pozitivní vliv HMGB1 na prezentaci Ag byl popsán také vazbou na receptor TLR2 ([TLR2](#))<sup>77</sup>. Dalším receptorem proteinu HMGB1 je RAGE ([AGER](#)). Pokud se na něj váže boxA, vzniklý naštěpením kaspázou 1, následná signalizace vede k aktivaci NLRP3 inflamazomu a aktivaci IS<sup>85</sup>. V případě, že se na RAGE váže frHMGB1, dochází díky autofágii k rezistenci nádorových buněk vůči OXP<sup>86</sup>.

Literatura ohledně konkrétní oxidoredukční formy HMGB1 v rámci ICD chybí. I v obecném měřítku je funkce specifické formy HMGB1 jako DAMP molekuly nekonzistentní a nedostatečná. Konkrétní forma proteinu a vazba na receptory je popisovaná v poměrně starých publikacích, někdy značně problematických, nicméně dodnes citovaných v souhrnných člancích<sup>5,87</sup>. Pro představu je dosavadní poznání ohledně role extracelulárního HMGB1 shrnuté na schématu, viz Obrázek 6, str. 13.

---

<sup>ii</sup> Ráda bych poukázala na problematiku falsifikace dat u skupiny autorů publikací ohledně konkrétní formy HMGB1 a vazby na specifický receptor<sup>79,80,82,83</sup>. V rámci této skupiny a tématu byl v roce 2011 publikovaný článek, který byl k 20. 12. 2020 stažený z důvodu podvodného nakládání s daty z hmotnostní spektrometrie<sup>84</sup>. Tento článek byl do té doby podle [Google Scholar](#) 440x citovaný. V [interním vyšetřování na Univerzitě v Liverpoolu](#) byl již v roce 2018 z pochybení ve výzkumu a falsifikace dat obviněn jeden z autorů článku (Daniel J. Antoine) (publikováno 17. 8. 2020). Na základě tohoto auditu byly některé jeho další články staženy, případně podrobené kontrole. Nicméně u dvou hojně citovaných (609x, 257x k 21. 12. 2021) publikací není na stránkách odborného časopisu *Journal of Experimental Medicine* ani zmínka o pochybení, přestože je Antoine jedním z autorů<sup>79,83</sup>.



Obrázek 6: Schéma uvolnění, specifické formy HMGB1 a vazby na příslušné receptory včetně jejich následné funkce. Převzato z Kwak et al.<sup>87</sup>

### 2.3.4 Další molekuly asociované s ICD

Kromě výše popsanych DAMP, které jsou charakteristické pro ICD, jsou s tímto typem buněčné smrti asociované i další molekuly. V literatuře se popis jejich přesné funkce často opírá pouze o jeden článek nebo několiknásobné citace v souhrnných člancích<sup>5,18</sup>.

Jednou z takových molekul je protein ANXA1, který se v rámci buňky vyskytuje jak v cytosolu, tak asociovaný s PM. Podle původní publikace v rámci ICD je jeho funkcí zajištění přesného postavení umírající nádorové buňky vůči DC, a to vazbou na receptor FPR1 (*FPR1*). Tato úloha byla stanovená na základě experimentů s buňkami deficientními pro tento protein (*Anxa1*<sup>-/-</sup>). Zároveň ale byla metodou ELISA detekovaná jeho sekrece do prostředí v důsledku léčby MTX / DOX<sup>32</sup>. Těžko tedy soudit, zda jako DAMP funguje membránově vázaný, nebo sekretovaný ANXA1. Podle nedávné publikace se tento protein podílí na přesunu CALR na povrch, jelikož *Anxa1*<sup>-/-</sup> buňky vystavené MTX / DOX nebyly pozitivní pro ecto-CALR<sup>88</sup>. Přesná úloha během ICD zůstává neobjasněná, ale obecně má ANXA1 v imunitním systému různé funkce<sup>89</sup>.

Vedle ecto-CALR se na povrchu buňky objevují i další dva chaperony ER – HSP70 a HSP90. Jejich přesun na povrch byl detekovaný po DOX, IDA<sup>90</sup>, a bortezomibu<sup>41</sup>. V případě léčby Hyp-PDT dochází pouze k přesunu HSP70<sup>45,46</sup>. Stejně jako pro CALR je receptorem těchto proteinů CD91<sup>91</sup>, což by naznačovalo jejich funkci v pohlcení fragmentů umírající buňky. Nicméně jejich vliv na tento proces je menší v porovnání s ecto-CALR<sup>90</sup>.

Komunikace buněk IS je obecně založená na cytokinech a chemokinech. Buňky podléhající ICD vypouští v důsledku radioterapie<sup>42,92</sup>, OXP<sup>33</sup>, MTX<sup>61,92</sup> a DOX<sup>33,61</sup> molekuly, které jsou obdobné

imunitní odpovědi při napadení patogenem. Jedná se o chemokiny CXCL10 ([CXCL10](#))<sup>33,42,61</sup>, CCL2 ([CCL2](#)) a CXCL1 ([CXCL1](#))<sup>92</sup>, které jsou zodpovědné za chemoatrakci imunitních buněk. Transkripce a vypuštění těchto chemokinů je pod vlivem cytokinů, především IFN typu I (IFN $\alpha$  a IFN $\beta$ )<sup>33,61</sup>. IFN typu I jsou produkovány také DC, a to díky signální kaskádě spuštěné DNA pocházející z nádorových buněk. DNA se váže na receptor cGAS ([CGAS](#)) a signalizací přes protein STING ([STING1](#)) vede k produkci IFN $\beta$ , díky čemuž opět dochází ke stimulaci adaptivních CTL a sekreci IFN $\gamma$ <sup>42,44</sup>.

### 3 Detekce DAMP molekul v klinických vzorcích

U pacientů s nádorovým onemocněním jsou DAMP molekuly detekované v čerstvě odebraných vzorcích<sup>93,94</sup>, v kultivovaných *ex vivo* vzorcích<sup>95,96</sup>, v krevní plazmě<sup>97–100</sup> či séru<sup>101–107</sup> a v tkáních fixovaných formalínem a zalitých v parafínu (FFPE, „formalin-fixed paraffin-embedded“)<sup>93,94,102,108–112</sup>. Jedná se o pacienty s pevnými nádory orgánů trávicího traktu<sup>99,102,105,110,112</sup>, hlavy, krku a mozku<sup>100,103,109</sup>, s rakovinou prsu<sup>97,98,111</sup>, plic<sup>93,107</sup> a vaječníků<sup>94</sup>. Leukemickými nádory v kontextu ICD se zabývá především pražská laboratoř Sotio<sup>101,106,113</sup>, ale i jiné laboratoře<sup>95</sup>.

Konkrétní typy nádorů se označují zkratkami, jejich použití se ale v publikacích liší, a neodpovídá zkratkám stanoveným v databázi [TCGA](#) („The Cancer Genome Atlas“). Pro příklad, v případě leukemických nádorů je akutní myeloidní leukémie označovaná v publikacích zkratkou AML a podle [TCGA](#) LAML („acute myeloid leukemia“). V této bakalářské práci jsou uvedené zkratky [TCGA](#), s výjimkou nádorových typů, kde si zkratky v publikaci a databázi vzájemně neodpovídají, př. pod zkratkou NSCLC („non-small cell lung cancer“) používanou v klinice pro nemalobuněčný karcinom plic lze podle [TCGA](#) zařadit dva podtypy (LUAD „lung adenocarcinoma“ a LUSC „lung squamous cell carcinoma“).

Pacienti trpící rakovinou jsou běžně léčeni induktory ICD, především antracyklíny<sup>95,97,101,104,106,111,113</sup>, OXP<sup>99</sup>, nebo kombinací chemoradioterapie<sup>100,102,110</sup>. Detekce DAMP spojených s ICD probíhá i u pacientů, kteří chemoterapeutickou léčbu nepodstoupili<sup>94,106,110</sup>. Při prospektivním sběru vzorků je možné sledovat změnu hladiny DAMP během léčby<sup>93,94,97–100,102,104–107,110,111</sup>. V klinických vzorcích je detekovaný CALR<sup>93–95,101,102,106,109–113</sup> a HMGB1<sup>97–100,102–108,111</sup>, ve velmi omezené míře i HSP70<sup>95,106,109,110</sup> a HSP90<sup>106</sup>.

#### 3.1 Metody detekce DAMP molekul

Volba použité metody detekce DAMP závisí na typu odebraného vzorku. FFPE vzorky nádorové tkáně jsou nejčastěji barvené imunohistochemickou metodou a vyhodnocené světelnou mikroskopií<sup>114</sup>. Při sběru krevních vzorků jsou hladiny DAMP kvantifikované pomocí metody ELISA. A to buď v plazmě, tedy tekuté složce krve bez buněk, s proteiny a minerálními látkami, nebo v séru, které na rozdíl od plazmy neobsahuje faktory pro srážení krve. Třetí hlavní metodou je FCM, která se využívá pro čerstvou disociovanou nádorovou tkáň nebo PBMC („peripheral blood mononuclear cell“),

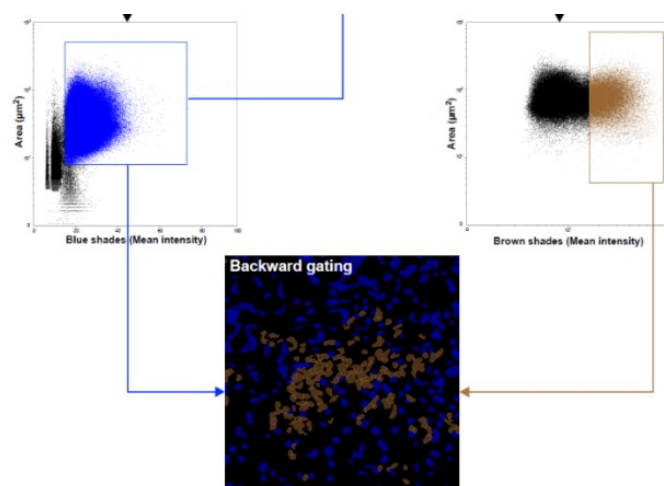
tedy mononukleární buňky krve (lymfocyty, monocyty) pacientů s nádory krve<sup>115</sup>. Doplňující metodou v malém množství publikací je imunofluorescenční mikroskopie vzorků FFPE<sup>116</sup>, PBMC<sup>101</sup> nebo čerstvé tkáně<sup>93</sup>. Jednotlivé metody použité pro detekci CALR, HMGB1 a HSP70/HSP90 v různých typech vzorků shrnuje Tabulka 1, str. 18.

### 3.1.1 IHC

Nádorová tkáň odebraná během operace je fixovaná FFPE a následně retrospektivně vyhodnocená IHC, kdy dochází k detekci antigenu v imobilizovaném vzorku. Antigen, v případě ICD konkrétní DAMP, je rozeznávaný specifickou protilátkou. Princip detekce spočívá ve vazbě sekundární protilátky a enzymatické reakci (nejčastěji peroxidáza), která způsobí žluté až hnědé zbarvení buněk v částech pozitivních pro Ag<sup>114</sup>. Následnou světelnou mikroskopií je určená exprese CALR<sup>93,94,102,109–112</sup>, HMGB1<sup>102,108,111</sup> a HSP70<sup>109,110</sup>. Pomocí IHC nelze určit přesnou lokalizaci DAMP. Jedná se o obecnou přítomnost uvnitř buněk a v různých vnitrobuněčných kompartmentech včetně jadra<sup>114</sup>. V různých částech buňky mají ale jak CALR, tak HMGB1 naprosto odlišné biologické funkce (viz kapitola 2.3). Například u CALR je pro ICD nutná lokalizace na vnější straně PM. V jedné z publikací autoři uvádí rozlišení mezi vnitrobuněčným a ecto-CALR při 400násobném zvětšení ve světelném mikroskopu<sup>93</sup>, nicméně o přesnou lokalizaci na vnější straně PM se nejedná.

Další nevýhodou IHC je nejčastěji používaná semikvantitativní analýza<sup>93,94,102,108–111</sup>, která podléhá subjektivnímu úsudku pozorovatele a je těžko reprodukovatelná<sup>114</sup>. Při takovém vyhodnocení jsou spočítané pozitivně značené buňky v 5-10 náhodně vybraných oblastech. Podle jejich procentuálního zastoupení vůči celkovému počtu buněk jsou vzorky rozdělené do čtyř<sup>110,111,117</sup>, nebo pěti<sup>93,94</sup> skupin. Na základě těchto skupin jsou pacienti rozděleni do skupin CALR<sup>Hi</sup> a CALR<sup>Lo</sup>, respektive HMGB1<sup>Hi</sup> a HMGB1<sup>Lo</sup>. Konkrétní označení se v publikacích liší, ale principiálně jde o rozdělení na dvě skupiny – s vyšší, nebo nižší expresí. S takovým rozdělením se dále pracuje pro retrospektivní korelaci s dobou přežití.

Alternativou k subjektivní interpretaci a nepřesné kvantifikaci je počítačová analýza obrazu. Tímto způsobem, konkrétně softwarem StrataQuest, byla vyhodnocená exprese CALR u pacientů s metastazujícím typem rakoviny trávicího traktu<sup>112</sup>. Během takové analýzy dochází k rozlišení všech jednotlivých buněk (modré), buněk pozitivních pro specifickou protilátku (hnědé) a výpočtu pozitivní populace v procentech, viz Obrázek 7, str. 16<sup>112</sup>.



Obrázek 7: Automatická analýza obrazu pro vyhodnocení IHC. Stanovení % populace pozitivních buněk je přesné díky rozlišení jednotlivých buněk (modré) a buněk pozitivních pro specifickou protilátku (hnědé). Analýza obrazu je dostupná na Fig. S3 (str. 11) v souboru [Supplementary material](#) příslušné publikace. Upraveno podle Laengle et al.<sup>112</sup>

### 3.1.2 ELISA

Metodou ELISA je přesně kvantifikovaná hladina hlavně HMGB1, a to jak v séru<sup>102,104–107,116</sup>, tak v plazmě<sup>97–100</sup>. HMGB1 tedy není detekovaný v přímo v TME, ale v periferní krvi. Nutné podotknout, že situace v periferní krvi nemusí odpovídat stavu nádorových buněk, respektive nádorovému mikroprostředí<sup>101,106</sup>. Výhodou této metody je přesná kvantifikace koncentrace molekuly. Pro funkci HMGB1 je ale zásadní nejenom množství, ale také konkrétní oxidační stav, který určuje vazbu na receptory. Ke stanovení oxidačního stavu v klinických vzorcích nedochází. V některých případech je detekovaný receptor HMGB1 RAGE, ale opět pouze metodou ELISA, tedy solubilní RAGE<sup>97,98,105</sup>, což nepřináší žádnou informaci o jeho roli v buněčné signalizaci.

Rozdílným přístupem využívajícím stejnou metodu je kvantifikace HMGB1 v *ex vivo* kultivovaném vzorku. Jedná se o tkáň nádoru močového měchýře odebranou během TURBT („transurethral resection of bladder tumour“). Část tkáně je přenesena do misky pro kultivaci orgánů, kde je po dobu jedné hodiny vystavená 240 $\mu$ M MMC, což odpovídá běžné intravezikální léčbě pacientů následující ihned po provedení TURBT. K detekci HMGB1 dochází po 16 hodinách kultivace bez chemoterapeutika v supernatantu kultivovaných buněk<sup>96</sup>.

ELISA se v omezeném množství publikací využívá i pro detekci CALR, HSP70 a HSP90<sup>101,106</sup>. I zde se jedná o detekci solubilních proteinů neasociovaných s buněčným povrchem, avšak tyto proteiny jsou v během ICD lokalizované právě na membráně (viz kapitola 2.3.1 a 2.3.3, str. 6 a 13).

### 3.1.3 FCM

Pomocí FCM lze určit lokalizaci na PM u buněk s intaktní PM a přesně kvantifikovat populace pozitivních buněk pro ecto-CALR, případně ecto-HSP70 nebo ecto-HSP90. Překonává tedy nevýhody výše popsaných metod. FCM se využívá pro vzorky PBMC u LAML<sup>95,101,106,113</sup> a čerstvou tkáň získanou z pevných nádorů<sup>93,94</sup>. Tkáň pevných nádorů je nutné před FCM disociovat, a to pouze mechanicky<sup>93</sup>,

nebo v kombinaci s enzymatickou homogenizací kolagenázou D (1 mg/ml) a DNázou I (0,2 mg/ml) po dobu 30 minut<sup>94</sup>.

U obou typů vzorků se nejprve určí zastoupení živých a mrtvých buněk. K tomu slouží kombinace fluorescenčně obarveného rekombinantního Annexinu V ([ANXA5](#)), který se váže na PS, a DNA-interkalačního barviva DAPI<sup>93,94,106,113</sup>, jindy pouze DAPI<sup>106</sup>, 7AAD<sup>101</sup>, nebo Live/Death Yellow<sup>93,95</sup>. Analýza ecto-CALR probíhá pouze na živých (AnnV<sup>-</sup>DAPI<sup>-</sup>) nebo časně apoptických umírajících buňkách (AnnV<sup>+</sup>DAPI<sup>-</sup>), nikoliv na mrtvých (DAPI<sup>+</sup>, 7AAD<sup>+</sup>, Live/Death<sup>+</sup>). K označení mrtvých buněk dochází po narušení PM. Vyloučení mrtvých buněk během tzv. *gatingu* v rámci analýzy tedy eliminuje falešně pozitivní výsledky a zpřesňuje identifikaci membránové lokalizace ecto-CALR. Ve vzorcích disociovaných pevných nádorů tvoří mrtvé buňky až 46,6 %<sup>94</sup>, což naznačuje vysokou míru poškození buněk během přípravy vzorku.

Diskriminace různých populací živých buněk probíhá značením Ag protilátkami. Specifickou populaci buněk lze při analýze dat určit pozitivně – buňky jsou pozitivní (Ag<sup>+</sup>), negativně – buňky jsou negativní (Ag<sup>-</sup>), nebo na základě nižší fluorescence v porovnání s pozitivní populací (Ag<sup>dim</sup>). Například v populaci PBMC jsou nádorové maligní blasty (nezralé myeloidní prekurzory) určené jako populace buněk CD34<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD14<sup>-95</sup>, CD45<sup>dim</sup>CD47<sup>+101</sup>, CD33<sup>+</sup>CD45<sup>+106,113</sup>. Nádorové buňky v disociované tkáni jsou stanovené jako pozitivní pro pancytokeratin (klon protilátky AE1/AE3 specifický pro cytokeratiny 1-8, 10, 14-16 a 19), lidský epiteliální antigen ([EPCAM](#)) a CD277 ([BTN3A2](#))<sup>93,94</sup>.

Na takto vybraných buňkách je sledovaná fluorescence odpovídající ecto-CALR. Pro detekci ecto-CALR jsou se používají polyklonální protilátky firmy Enzo Life Sciences<sup>93,94,106,113</sup> nebo Ozyme<sup>101</sup>. Zásadní nevýhodou polyklonálních protilátek je vyšší pozadí detekce, způsobené většinou zkříženou reaktivitou nebo přítomností menšinových specifit v séru, které mohou do výsledků vnášet falešnou pozitivitu. Stejně tak k falešné pozitivitě vede endocytóza značící protilátky, proto jsou buňky vystavené podmínkám, které inhibují jejich metabolismus. Toho se dá dosáhnout inkubací, respektive prací na ledu (při 4 °C), nebo preinkubací s azidem sodným (NaN<sub>3</sub>), který je součástí barvicího pufru<sup>115</sup>. Dalším faktorem, na který je třeba brát zřetel, je vlastní analýza, tedy manuální ohraničení cílových populací buněk. FCM umožňuje oproti předchozím metodám přesnější kvantifikaci a její vyhodnocení probíhá softwarově (FlowJo). Nicméně i tato analýza z části podléhá osobnímu úsudku, jelikož se jedná o manuální vyhodnocení<sup>118</sup>.

Tabulka 1: Metody detekce DAMP v klinických vzorcích nádorových pacientů.

Metoda	Vzorek	DAMP	Citace
IHC	FFPE	HMGB1	102,108,109,111
		CALR	93,94,102,109–112
		HSP70	109,110
ELISA	plazma	HMGB1	97–100
	sérum	CALR	101,106
		HSP70/90	106
FCM	PBMC	CALR	94,95,101,106,113
	čerstvá tkáň		93,94
	PBMC	HSP70/90	95,106
Imunofluorescenční mikroskopie	čerstvá tkáň	CALR	93
	PBMC		101
	FFPE	HMGB1	103

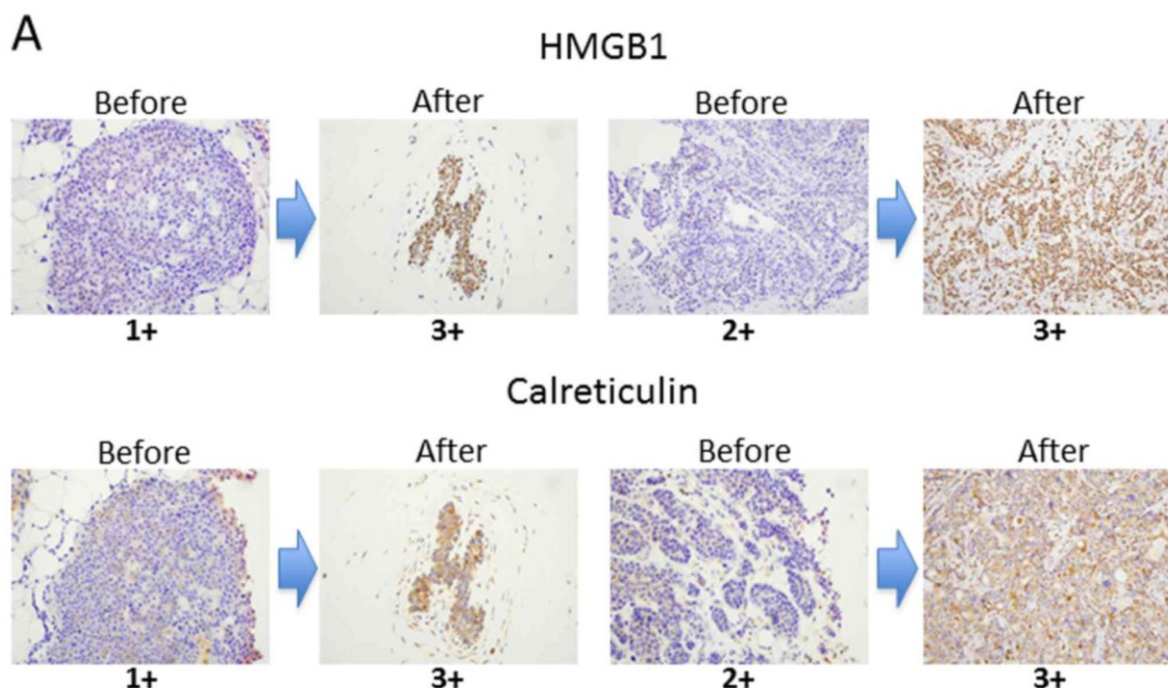
### 3.2 Změna hladiny DAMP během léčby

V *in vitro* experimentech dochází po vystavení nádorových buněk induktoru ICD k sekreci DAMP, nebo jejich vystavení na povrchu. Výsledky z klinických vzorků však nejsou jednoznačné. Některé publikace ukazují před a po léčbě induktorem ICD pozitivní vliv (tedy nárůst, označeno  $\uparrow\Delta\text{DAMP}$ )<sup>95,97,99,100,110,111</sup>, jiné negativní (pokles, označeno  $\downarrow\Delta\text{DAMP}$ )<sup>104,105,107</sup>, nebo žádnou výraznou změnu<sup>93,94,101,102,106</sup>, viz Tabulka 2, str. 23.

Pro příklad, pacienti s BRCA ( $n = 41$ ) byli léčeni EPI a docetaxelem. Celkem 22 pacientů na tuto léčbu odpovídalo, odpověď nádoru byla stanovena jako kompletní nebo částečná patologická odpověď. U 17 z těchto 22 došlo po první dávce chemoterapie k zvýšení hladiny HMGB1 v plazmě<sup>97</sup>. Stejně tak tomu bylo u 37 z 50 pacientů s rektálním adenokarcinomem, kteří prošli chemoterapií (OXP, 5-fluorouracil) a radioterapií<sup>99</sup>. V případě nádorů hlavy a krku hladina HMGB1 v plazmě během chemoradioterapie kolísala, na konci mělo 8 pacientů z 11 vyšší koncentraci než před léčbou<sup>100</sup>. Opačné výsledky přináší stanovení  $\Delta\text{HMGB1}$  v séru, a to u pacientů podstupujících chemoterapii při léčbě BRCA<sup>104</sup>, rakoviny slinivky<sup>105</sup>, nebo různých typů rakoviny plic<sup>107</sup>. Během *ex vivo* inkubace nádorů močového měchýře s MMC byla kvantitativní změna hladiny HMGB1 určená jako relativní nárůst oproti neléčené kontrole. U ~45 % vzorků došlo k poměrnému zvýšené hladiny. Relativní nárůst se pohyboval mezi hodnotami 2-9 násobku, přesná koncentrace HMGB1 není v publikaci uvedena<sup>96</sup>.

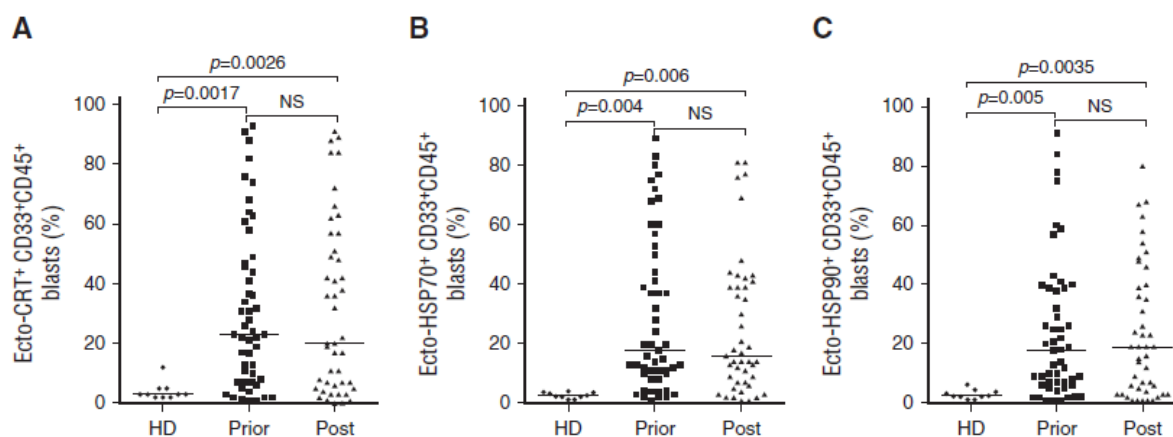
Při vyhodnocení FFPE vzorků pomocí IHC je zvýšená úroveň  $\uparrow\Delta\text{HMGB1}$  i  $\uparrow\Delta\text{CALR}$  určená jako přesun do vyšší kategorie, označené 1+, 2+, 3+, 4+, na základě stanoveného relativního zastoupení pozitivních buněk, viz **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**, str. 19. Příkladem jsou vzorky BRCA pacientů, kteří byli léčeni kombinací chemoterapeutik (5-fluorouracil, EPI, CP)<sup>111</sup>. Některé publikace nesledují přímo změnu v jedinci, ale porovnání hladinu DAMP u skupin pacientů, kteří podstoupili, nebo nepodstoupili chemoterapeutickou léčbu. Při porovnání pacientů s nádory slinivky a vaječníků,

kteří před operativním zákrokem prošli chemoradioterapií, s těmi, kteří neprošli, má první skupina zvýšenou celkovou expresi CALR a HSP70<sup>94,110</sup>.



Obrázek 8: Zvýšení exprese HMGB1 a CALR v buňkách BRCA před (before) a po (after) chemoterapii induktory ICD. Detekované jako přesun z méně pozitivní skupiny (1+ / 2+) do více pozitivní (3+) v rámci semikvantitativní analýzy IHC, tedy % zastoupení pozitivních buněk. Zvětšení 400x. Upraveno podle Aoto et al.<sup>111</sup>

U pacientů s LAML nedošlo během antracyklinové terapie k % zvýšení populace buněk ecto-CALR<sup>+</sup>, ecto-HSP70<sup>+</sup> nebo ecto-HSP90<sup>+</sup>. Maligní blasty pacientů měly tyto DAMP na povrchu vystavené už před léčbou IDA a daunorubicinem, viz Obrázek 9 níže<sup>101,106</sup>. Na povrchu maligních blastů *ex vivo* kultivovaných společně s daunorubicinem došlo ke zvýšení ecto-CALR – určeno jako medián intenzity fluorescence (MFI, „median fluorescence intensity“), měřené FCM<sup>95</sup>.



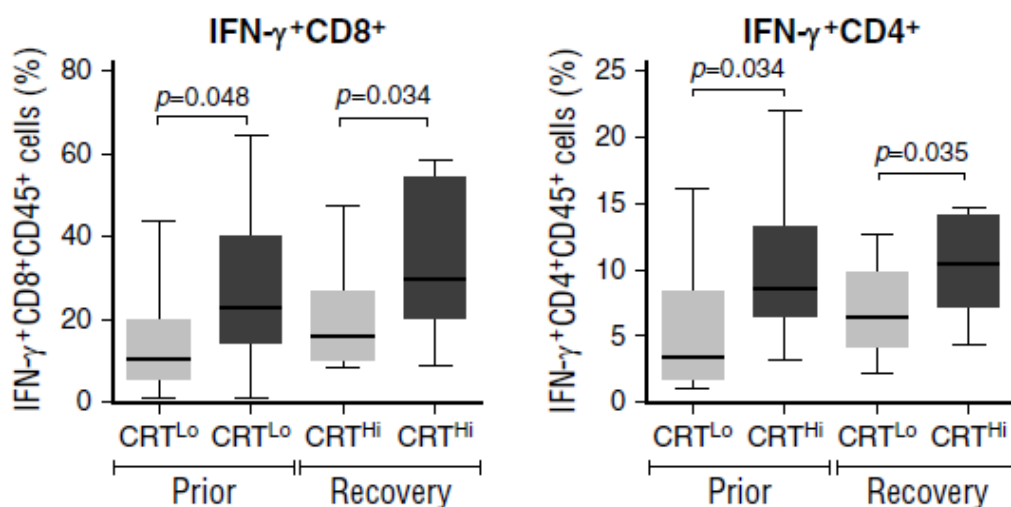
Obrázek 9: Srovnání populací ecto-CALR<sup>+</sup> (zde ecto-CRT<sup>+</sup>) (A), ecto-HSP70<sup>+</sup> (B) a ecto-HSP90<sup>+</sup> (C) v populaci živých (DAPIAnnV<sup>+</sup>) a umírajících (DAPIAnnV<sup>-</sup>) maligních blastů (CD33<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>). Jedná se o vzorky PBMC ze zdravých dárců (HD) a pacientů s LAML před (prior) a po (post) antracyklinové léčbě. Měření metodou FCM, ohraničení cílových populací během analýzy („gating strategy“) je dostupné na Supp.Fig.1 (str. 3) v souboru [Supplemental information](#) příslušné publikace. Upraveno podle Fucikova et al.<sup>106</sup>

### 3.3 Korelace DAMP s imunitními buňkami

Uvolnění DAMP z nádorových buněk stojí na počátku vyvolání imunitní odpovědi vůči nádoru. Klíčovou populací jsou DC schopné aktivovat TC k produkci cytokinů, mimo jiné i IFN- $\gamma$ . Proto je v některých případech v klinických vzorcích sledovaná korelace mezi DAMP a počtem imunitních buněk, nebo jejich stimulací, která je běžně stanovená jako produkce IFN- $\gamma$  (Th1 odpověď). Dostupná data jsou zobrazená pomocí symbolů, viz Tabulka 2, str. 23.

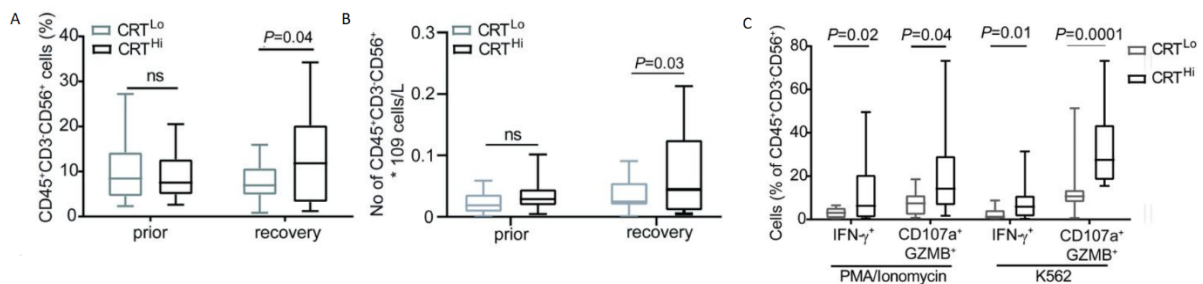
Počet imunitních buněk se srovnává mezi dvěma skupinami pacientů rozdělených na základě IHC. Skupina CALR<sup>Hi</sup> pacientů s rakovinou plic vykazovala v TME více DC oproti CALR<sup>Lo</sup> (1,1 vs. 0,6 buněk/mm<sup>2</sup>)<sup>93</sup>. U rakoviny vaječníků CALR<sup>Hi</sup> pacienti vykazovali více CTL (300 vs. 100 buněk/mm<sup>2</sup>)<sup>94</sup>. Vzorky rakoviny jícnu neukázaly žádný rozdíl v počtu CTL mezi CALR<sup>Hi</sup> a CALR<sup>Lo</sup>. Ve skupině HMGB1<sup>Hi</sup> byla jistá tendence pro vyšší zastoupení těchto cytotoxických buněk, ale nedosáhla statistické signifikance<sup>102</sup>. V případě BRCA nebyla nalezená žádná korelace mezi CTL a celkovou hladinou CALR<sup>111</sup>, nebo HMGB1<sup>108,111</sup>.

Pro stanovení produkce IFN- $\gamma$  z TC se používá FCM. IFN- $\gamma$  je produkován na základě specifické nebo nespecifické stimulace a opět se porovnávají hodnoty mezi skupinami CALR<sup>Hi</sup> a CALR<sup>Lo</sup>. Ag-specifická stimulace spočívá v kultivaci PBMC odebraných z periferní krve LAML pacientů s TAA *in vitro* ([BIRC5](#), [CCNB1](#), [PRAME](#), [WT1](#)), a následné kokultivaci těchto buněk s autologními CTL nebo Th buňkami. V takovém případě je IFN- $\gamma$  produkován z většího % buněk u skupiny CALR<sup>Hi</sup> (průměrný rozdíl ~10 %), a to jak před léčbou, tak po ukončení léčby a znovuustanovení normální hematopoézy (50-70 dní), viz Obrázek 10 níže<sup>106</sup>. Obdobný výsledek přinesla nespecifická stimulace CTL ionomycinem a PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) u pacientů s rakovinou vaječníků (~20 % vs. 5 %, CALR<sup>Hi</sup> vs. CALR<sup>Lo</sup>)<sup>94</sup>.



Obrázek 10: Procentuální zastoupení CD8<sup>+</sup> (CTL) a CD4<sup>+</sup> (Th) TC produkujících IFN- $\gamma$  po Ag-specifické stimulaci kokultivací s autologními PBMC pacientů s LAML před chemoterapií (prior) a po znovuustanovení normální hematopoézy (recovery). Porovnání mezi skupinami CALR<sup>Lo</sup> a CALR<sup>Hi</sup> (zde CRT) pacientů s LAML, měřené metodou FCM. Upraveno podle Fucikova et al.<sup>106</sup>

Za cytotoxickou odpověď proti nádoru jsou zodpovědné vedle CTL také NK buňky. Pacienti s LAML skupiny CALR<sup>Hi</sup> vykazovali po ukončení léčby větší % i absolutní zastoupení NK buněk definovaných jako CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, viz Obrázek 11 (A, B). Před léčbou byl rozdíl mezi skupinami nesignifikantní. Po nespecifické stimulaci PMA nebo ionomycinem, nebo kultivací s leukemickou buněčnou linií K562 bylo určeno % zastoupení NK buněk produkujících IFN- $\gamma$  a vykazujících degranulaci, tedy NK-buněčný cytotoxický mechanismus (CD107a<sup>+</sup>GZMB<sup>+</sup>). Po dokončení léčby vykazovala skupina CALR<sup>Hi</sup> vyšší % NK buněk v obou případech, viz Obrázek 11 (C). Aktivace cytotoxické funkce NK buněk závisí na poměru aktivačních ([NCR3](#), [NCRL](#), [KLRF1](#), [KLRK1](#), [CD226](#) a [FCGR3A](#)) a inhibičních ([KIR3DL1](#), [KIR2DL2](#), [KLRC1](#), [LILRB1](#)) receptorů. Při detekci exprese těchto receptorů však nebyl pozorovaný žádný významný rozdíl mezi CALR<sup>Hi</sup> a CALR<sup>Lo</sup><sup>113</sup>.



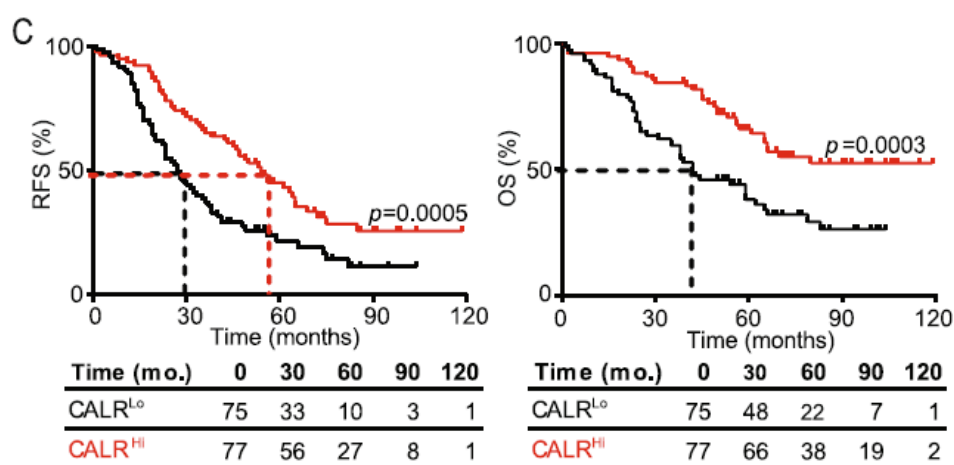
Obrázek 11: Přítomnost NK buněk (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) před (prior) léčbou a po znovuustanovení normální hematopoézy (recovery), relativní zastoupení v % (A), absolutní počet buněk /l (B). Cytotoxická aktivita NK buněk po stimulaci PMA/ionomycinem, nebo buněčnou linií K562: produkce IFN- $\gamma$  a degranulace (CD107a<sup>+</sup>GZMB<sup>+</sup>) u pacientů po léčbě (C). Porovnání mezi skupinami CALR<sup>Lo</sup> a CALR<sup>Hi</sup> (zde CRT) pacientů s LAML, měřené metodou FCM. Upraveno podle Truxova et al.<sup>113</sup>.

### 3.4 Korelace DAMP s dobou přežití pacientů

Pro hodnocení korelace DAMP s dobou přežití se nejčastěji používá neparametrický Kaplan-Meierův odhad, případně Coxův model proporcionálních rizik. Analýza doby přežití zobrazená na ose x v Kaplan-Meierově grafu odpovídá době přežití neboli trvání efektu léčby. Pro označení konkrétního parametru se užívá především anglických zkratk – celkové přežití (OS, „overall survival“), přežití bez recidivy (RFS, „recurrence-free survival“) = přežití bez nemoci (DFS, „disease-free survival“), přežití bez progresu (PFS, „progression-free survival“), přežití bez metastáz (MFS, „metastasis-free survival“) případně DMFS („distant metastasis-free survival“) (podle „[NCI Dictionary of Cancer Terms](#)“). Jednotkou osy x jsou měsíce, většinou 60 měsíců, tedy 5 let. To je doba, po kterou se vyhodnocuje efekt léčby nádoru. Na ose y jsou procenta pacientů v jednotlivých kategoriích, v případě ICD rozdělení na skupiny DAMP<sup>Hi</sup>/DAMP<sup>Lo</sup>. Pro vyhodnocení je zásadní tzv. střední doba, tedy doba na ose x odpovídající 50 % změny na ose y. Ukázka Kaplan-Meierova grafu viz Obrázek 12, str. 22. Korelace mezi CALR, HSP70, HMGB1 a dobou přežití je symbolicky sepsaná, viz Tabulka 2, str. 23. Vyhodnocení vzorků probíhá jak retrospektivně, tak prospektivně.

### 3.4.1 Retrospektivní analýza

Retrospektivní korelace mezi DAMP a dobou přežití se nejčastěji sleduje u pacientů, jejichž vzorky byly vyhodnocené pomocí IHC. V takovém případě byly popsány výsledky jak s pozitivní korelací ( $\uparrow$ DAMP  $\uparrow$ parametr doby přežití), tak žádnou signifikantní korelací. Žádnou signifikantní korelaci mezi dobou přežití a expresí CALR najdeme u pacientů s rakovinou slinivky<sup>110</sup>, jícnu<sup>102</sup> a u pacientů s BRCA<sup>111</sup>. CALR<sup>Hi</sup> skupina oproti CALR<sup>Lo</sup> vykazuje lepší OS v případě rakoviny plic (68 vs. 18 měsíců)<sup>93</sup> a vaječnicků (>120 vs. 42 měsíců)<sup>94</sup>. U rakoviny vaječnicků stejně platí i pro RFS, ovšem většina pacientů stejně dojde k relapsu, pouze časový rozdíl je menší (54 vs. 27 měsíců) viz Obrázek 12 níže<sup>94</sup>. Rozdílnou statistickou metodou (Coxův model proporcionálních rizik, jejímž výsledkem je poměr rizik („hazard ratio“) byla pozitivní korelace exprese CALR s RFS popsána u 33 pacientů s metastazujícím nádorem trávicího traktu<sup>112</sup>. HMGB1<sup>Hi</sup> skupina má statisticky signifikantně lepší OS u rakoviny jícnu, ale časový rozdíl je < 20 měsíců<sup>102</sup>.



Obrázek 12: Kaplan-Meierovy grafy zobrazující RFS a OS u pacientů s rakovinou vaječnicku rozdělených do skupiny CALR<sup>Hi</sup> a CALR<sup>Lo</sup>. Upraveno podle Kasikova et al.<sup>94</sup>

Retrospektivní analýza vzorků plazmy pacientů s BRCA, která navazuje na původní studii<sup>97</sup>, rozděluje pacienty ( $n = 36$ ) do dvou stejně velkých skupin podle  $\uparrow\Delta$ HMGB1 ( $\Delta >/< 1,1$  ng/ml)<sup>98</sup>. Všichni pacienti ze skupiny >1,1 ng/ml přežili více než 5 let (OS >60 měsíců). U pacientů s rakovinou plic a detekcí v séru byly výsledky opačné a skupina s vyšší hladinou HMGB1 měla OS zkrácený o >300 dní. Nicméně nehledně na hladinu HMGB1 pacienti nežili déle než dva roky<sup>107</sup>.

### 3.4.2 Prospektivní analýza

Stejně tak jako u retrospektivní analýzy jsou v prospektivně získaných vzorcích plazmy výsledky pozitivní. Všichni pacienti, v jejichž plazmě došlo k  $\uparrow\Delta$ HMGB1 měli v případě rakoviny hlavy a krku PFS (>46 měsíců)<sup>100</sup>, u rektálního adenokarcinomu byl výsledným parametrem DMFS (>60 měsíců)<sup>99</sup>. Naopak, ve vzorcích séra je korelace negativní. U pacientů s rakovinou slinivky je vyšší hladina spojená s horším OS i PFS, ale nehledě na skupinu po 18 měsících je naživu <40 % pacientů<sup>105</sup>.

Vzorky prospektivní kohorty pacientů pro CALR byly detekované pomocí FCM pouze v rámci laboratoře Sotio. Přestože pro medián hodnot pacientů s LAML skupiny CALR<sup>Hi</sup> vs CALR<sup>Lo</sup> byl signifikantní rozdíl v OS (~22 vs. ~8 měsíců), po 2 letech přežil stejný počet pacientů. CALR<sup>Hi</sup> skupina vykazovala také lepší RFS (~23 vs. ~4,5 měsíce)<sup>106</sup>. V další publikaci této skupiny CALR<sup>Hi</sup> pacienti s AML opět vykazovaly signifikantně lepší RFS (> 60 vs. 14 měsíců)<sup>113</sup>.

Tabulka 2: Shrnutí výsledků z klinických vzorků nádorů.

DAMP	Změna hladiny DAMP během léčby	Korelace DAMP s imunitními buňkami	Korelace DAMP s dobou přežití pacientů
CALR	↑ΔCALR <sup>95,110,111</sup>	↑CALR↑CTL <sup>94</sup> ↑CALR↑DC <sup>93,94</sup> ↑CALR↑IFN-γ z CTL/Th TC <sup>94,106</sup> ↑CALR↑NK buňky↑IFN-γ <sup>113</sup>	↑CALR↑OS <sup>93,94,106</sup> ↑CALR↑RFS <sup>94,106,112,113</sup>
	bez ΔCALR <sup>93,94,101,102,106</sup>	bez korelace CALR a CTL <sup>102,111</sup>	bez korelace s dobou přežití <sup>101,102,110,111</sup>
HSP70	↑ΔHSP70 <sup>95,110</sup>	n/a	↑HSP70↑RFS <sup>106</sup>
	bez ΔHSP70 <sup>106</sup>	n/a	bez korelace s dobou přežití <sup>110</sup>
HMGB1	↑ΔHMGB1 <sup>97-100,102,111</sup>	↑HMGB1↑CTL <sup>102</sup> ↑ΔHMGB1↑CD80 <sup>+</sup> DC <sup>96</sup>	↑HMGB1↑OS <sup>102,108</sup> ↑HMGB1↑MFS <sup>108</sup> ↑HMGB1↑PFS <sup>100</sup> ↑HMGB1↑DMFS <sup>99</sup> ↑ΔHMGB1↑RFS <sup>96</sup> ↑ΔHMGB1↑OS/↑PFS <sup>97-100</sup>
	↓ΔHMGB1 <sup>104,105,107</sup>	n/a	↑HMGB1↓OS <sup>105,107</sup>
	bez ΔHMGB1 <sup>106</sup>	bez korelace HMGB1 a CTL <sup>108,111</sup>	bez korelace s dobou přežití <sup>103,111</sup>

## 4 Klinické studie v databázi

Největší databází klinických studií je americká [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov), která shromažďuje probíhající i dokončené klinické studie pod specifickými kódy (NCT). Vedle této databáze existuje několik dalších databází – [EU Clinical Trials Register](https://european-clinical-trials-register.eu), [ICTRP](https://www.ictpr.com), [ISRCTN](https://www.isrctn.com) a [PACTR](https://www.pactr.org). Příklady těchto databází jsou uvedené pouze pod zkratkou názvu, jejich výčet je jen informativní a data dostupná v nich nejsou v této bakalářské práci zohledněna. Klinické studie dělíme do dvou typů – experimentální neboli intervenční a analytické neboli pozorovací. Nejčastějším příkladem experimentální studie jsou klinické testy, které hodnotí terapeutický zásah. Pozorovací studie se z hlediska času a sběru dat dělí na retrospektivní a prospektivní<sup>119</sup> (a podle „[ClinicalTrials.gov Glossary of Site Terms](https://clinicaltrials.gov/glossary)“).

V databázi [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov) byly vyhledané studie zahrnující nádorová onemocnění ve spojitosti s ICD. Nalezené studie byly rozdělené do tří skupin na základě popisu a sledovaných výstupů. První skupinu studií tvoří ty, ve kterých dochází k detekci DAMP molekul, a zároveň jejich popis přímo odkazuje na ICD. Ve druhé skupině jsou studie, které detekují DAMP, ale ICD vůbec nepopisují. Poslední, nejméně důležitou skupinou jsou studie, které ve svém popisu pouze zmiňují ICD nebo imunogenní vlastnost některých léčebných přístupů, ale DAMP nedetekují. Klinické studie často zkoumají právě léčebnou kombinaci ICB s induktory ICD. Takové studie důkladně popisuje několik

souhrnných článků<sup>11,15,36</sup>. Uvedené studie se ale ICD nezabývají přímo, proto se tato kapitola soustředí pouze na studie, které alespoň na ICD odkazují.

Dostupné informace ke klinickým studiím shrnují tabulky Tabulka 3, Tabulka 4 a Tabulka 5, str. 28, 29 a 30. Studie jsou uvedené pod identifikačním kódem NCT. Jejich status je platný k 14. 11. 2021 a popisuje v jakém stavu se studie momentálně nachází. Stanovený počet pacientů je pouze odhadovaný, pokud není uvedeno jinak (skutečný). Zadavatel odpovídá hlavnímu vědeckému pracovníkovi, odpovědné straně, nebo jinému kontaktu. Zdrojem dat je databáze [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov).

#### 4.1 Zveřejněné výsledky klinických studií

Celkový počet nalezených klinických studií ohledně ICD byl poměrně malý ( $n = 31$ ). Navíc žádná z těchto studií neobsahuje výsledky v databázi. Výsledky mohou být publikované mimo databázi v podobě článku v odborném časopise. Podle etické normy by výzkumníci měli publikovat veškeré pozitivní i negativní výsledky z klinických studií na základě apelu Světové zdravotnické organizace (WHO, „World Health Organization“), a to do dvou let od dokončení studie<sup>120,121</sup>. Databáze [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov) udává pro publikaci výsledků hraniční termín 1 rok od dokončení studie. Reálný stav je ovšem zcela odlišný a nevyhovující.

Ani v případě, kdy se podíváme na dostupnost výsledků v databázi [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov) velice obecně – jakékoliv studie / nádorová onemocnění, není výsledek optimální. Ke dni 9. 11. 2021 databáze obsahuje celkem<sup>iii</sup> 394 924 klinických studií, z toho 212 464 je dokončených<sup>iv</sup> a z nich jen 43 517 má výsledky<sup>v</sup>, což odpovídá pouze 20,48 %. Při zaměření vyhledávání na klinické studie s rakovinou se zobrazí celkem<sup>vi</sup> 85 595 nálezů, necelá polovina, celkem 36 402, je dokončených<sup>vii</sup>, a jen 8 372 obsahuje výsledky<sup>viii</sup>, tedy 22,99 % z dokončených. Dostupnost výsledků všech studií nebo studií se zaměřením na rakovinu je srovnatelná (20,48 % vs. 22,99 %), ale tedy velice neuspokojivá. Jen ~1/5 má veřejně dostupná data v databázi, přestože instituce a vedoucí výzkumníci jsou povinni data včetně negativních výsledků zveřejnit.

Rozsáhlá analýza dostupnosti výsledků studií dokončených mezi lety 2007 a 2010 ukazuje, že dva roky od dokončení studie je pouze 29 % publikovaných a dokonce jen 13 % výsledků je uvedených přímo v databázi. Po čtyřech letech bylo 56,5 % dostupných v publikacích a 26,8 % v databázi. Navíc je důležité upozornit na to, že se tato analýza soustředila především na vybrané akademické instituce vyšší kvalitativní úrovně vědecké práce<sup>122</sup>.

---

<sup>iii</sup> <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=&cntry=&state=&city=&dist=>

<sup>iv</sup> [https://clinicaltrials.gov/ct2/results?Search=Apply&recrs=e&age\\_v=&gndr=&type=&rslt=](https://clinicaltrials.gov/ct2/results?Search=Apply&recrs=e&age_v=&gndr=&type=&rslt=)

<sup>v</sup> [https://clinicaltrials.gov/ct2/results?recrs=e&age\\_v=&gndr=&type=&rslt=With&Search=Apply](https://clinicaltrials.gov/ct2/results?recrs=e&age_v=&gndr=&type=&rslt=With&Search=Apply)

<sup>vi</sup> <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=cancer&term=&cntry=&state=&city=&dist=>

<sup>vii</sup> [https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=cancer&Search=Apply&recrs=e&age\\_v=&gndr=&type=&rslt=](https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=cancer&Search=Apply&recrs=e&age_v=&gndr=&type=&rslt=)

<sup>viii</sup> [https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=cancer&recrs=e&age\\_v=&gndr=&type=&rslt=With&Search=Apply](https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=cancer&recrs=e&age_v=&gndr=&type=&rslt=With&Search=Apply)

#### 4.1.1 Klinické studie s detekcí DAMP a ICD

Při vyhledávání bylo nalezeno jen minimum studií ( $n = 6$ ), které detekují DAMP molekuly asociované s ICD a v popisu mají ICD explicitně uvedené, viz Tabulka 3, str. 28. Dvě z nich ([NCT02921854](#) a [NCT03388190](#)) však vůbec neuvádí, které konkrétní DAMP detekují, a to přestože jedna z těchto studií ([NCT02921854](#)) nese název „Detection of Circulating Biomarkers of Immunogenic Cell Death After Radiotherapy and Chemotherapy: An Exploratory study“, který značí podrobné studium ICD. Většina studií probíhala v posledních 5 letech, s výjimkou ([NCT01637532](#)), která byla ukončena v září roku 2013. Výsledky této studie nejsou umístěné v databázi, ale jsou publikované v odborném článku. Nicméně, tato publikace neobsahuje žádná data ohledně detekce DAMP (CALR, HMGB1), pouze konstatuje možnost kombinované léčby DOX s tocilizumabem (monoklonální protilátka anti-IL-6R)<sup>123</sup>.

Druhou momentálně dokončenou studií je [NCT02921854](#) z roku 2019. Její výsledky stejně jako u předchozí studie nejsou v databázi, a v tomto případě nejsou dostupné ani v podobě uceleného článku. Jediným zdrojem je krátký příspěvek v konferenčním sborníku z ESMO („European Society for Medical Oncology“) Congress 2021<sup>124</sup>. Stejně tak je tomu u [NCT03388190](#), která je ale momentálně ještě ve stádiu náboru pacientů. Dostupné jsou příspěvky z konferencí AACR („American Association for Cancer Research“)<sup>125</sup> a ASCO („American Society for Clinical Oncology“) Annual Meeting 2021<sup>126</sup>.

#### 4.1.2 Klinické studie s detekcí DAMP

Další nalezené klinické studie ( $n = 11$ ) detekují DAMP molekuly, především HMGB1, ale v popisu přímo nezmiňují ICD. Tento typ studií shrnuje Tabulka 4, str. 29. Obdobně jako u předchozí skupiny se většina těchto studií uskutečnila v posledních 5 letech. Výjimkou je [NCT01440413](#), která začala již v roce 2011, avšak momentálně stále ještě probíhá. Oproti ostatním studiím této skupiny se vyznačuje také tím, že detekuje nejen HMGB1, ale i CALR a p-eIF2 $\alpha$ .

Situace ohledně zveřejnění výsledků je obdobná jako v předchozí skupině. Na základě dokončené studie [NCT03486119](#) byl publikovaný článek<sup>127</sup>, který ale neobsahuje data měření HMGB1. [NCT03453164](#) je výjimkou, kde došlo k vložení výsledků do databáze (25. 8. 2021). Bohužel ani v tomto případě není momentálně vyhodnocení veřejně přístupné, jelikož bylo 20. 9. 2021 v rámci procesu kontroly kvality vrácené autorům k opravě. Jediným zdrojem k této studii tak zůstává opět pouze krátký příspěvek z konference ESMO Congress 2021<sup>128</sup>. Ani toto sdělení neobsahuje údaje o HMGB1, ale jen konstatuje možnost kombinace léčby radioterapií a ICB nivolumab (monoklonální protilátka anti-PD-1). Poslední tři studie jsou uvedené jen pro úplnost, jelikož byly pozastavené, a to buď z důvodu nedostatku pacientů ([NCT02631252](#) a [NCT03241927](#)), nebo pro problémy v časovém průběhu studie ([NCT01144169](#)).

Při obecném vyhledávání studií s HMGB1 a nádorovým onemocněním<sup>ix</sup>, obsahuje databáze celkem  $n = 27$  studií. Ty, které neuvádí Tabulka 4, HMGB1 reálně nedetekují, nebo ho detekují v kontextu operativního zákroku či resuscitace, ale nikoli rámci nádorových onemocnění. V této skupině 27 klinických studií je 10 studií dokončených, ovšem jen 2 obsahují v databázi výsledky. Pouze jedna z nich ([NCT01023477](#)) se zabývá nádorovým onemocněním, konkrétně léčbou rakoviny prsu chloroquinem, což ale není induktor ICD. Navíc výsledky jsou na velice malém počtu pacientů ( $n = 12$ ) a HMGB1 je detekované metodou IHC, která určuje pouze celkovou expresi ve vzorku. Ani v tomto případě tedy nelze výsledky nijak komentovat v kontextu ICD. Pacientské vzorky z klinické studie ([NCT04256616](#), první skupina) a [NCT04256122](#) (tato skupina) jsou použité v rámci publikace<sup>96</sup> popsané v kapitole 3.

#### 4.1.3 Klinické studie zmiňující ICD

U třetí skupiny nalezených klinických studií ( $n = 14$ ) nebyla předmětem studie detekce DAMP. Tyto studie zmiňují pro úplnost soupisu klinických studií, které se věnovaly tematice ICD, viz Tabulka 5, str. 30. Avšak jediné, co je spojuje s ICD, je zmínka o imunogenní buněčné smrti v popisu studie, například při charakterizaci chemoterapeutické léčby. Žádná z nich nemá výsledky zveřejněné v databázi, ale k některým jsou automaticky přiřazené publikace. Tato skupina se dá z hlediska induktorů ICD rozdělit na tři podskupiny – kombinace induktoru ICD s ICB (Tabulka 5, první část), netradiční nebo nejednoznačně stanovený induktor ICD (Tabulka 5, druhá část) a jiná biologická léčba (Tabulka 5, třetí část).

Podle databáze jsou výsledky dokončené studie [NCT04879888](#) v publikaci<sup>129</sup>, ta ale obsahuje pouze metody pro *in vitro* vytvoření DC s TAA u jednoho pacienta. Primárním výstupem této studie by měla být bezpečnost léčby založené na vakcinaci autologními DC s TAA. K [NCT02821182](#) je automaticky připojena publikace<sup>130</sup>, která má spojitost s ICD však minimální, protože ICD se objevuje pouze v rámci diskuze, stejně tak je tomu v případě této publikace<sup>131</sup>. Výsledky dokončené [NCT02406183](#) uvádí bezpečnost kombinované léčby ICB (ipilimumab, monoklonální protilátka anti-CTLA-4) s induktorem ICD (radioterapie)<sup>132</sup>. První výsledky probíhající studie [NCT02499367](#) ukazují vyšší celkovou četnost odpovědí (ORR, „overall response rate“) při kombinaci ICB (nivolumab, monoklonální protilátka anti-PD-1) a DOX (35 % pacientů)<sup>133</sup>.

V některých studiích jsou jako induktory ICD uváděné netradiční látky, jako například P2Et, tedy výtažek z rostliny *Caesalpinia spinosa*<sup>134,135</sup> ([NCT05007444](#)). Dále melfalan ([NCT04463368](#)), jehož vliv na ICD je nejednoznačný. Jako příklad lze uvést změnu hladiny ecto-CALR, která je 1 hodinu po vystavení buněk melfalanu stejná jako u neléčené kontroly, po 24 hodinách o polovinu menší než

---

<sup>ix</sup> <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=cancer&term=HMGB1+&cntry=&state=&city=&dist=>

pozitivní kontrola Hyp-PDT a dvakrát větší než negativní kontrola. Pro maturaci DC (MHC-I<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup>) je melfalan 4x efektivnější než negativní kontrola, ale méně účinný než Hyp-PDT<sup>136</sup>.

V klinické studii [NCT03944252](#) je jako induktor ICD uvedený cetuximab (monoklonální protilátka anti-EGFR) blokující receptor pro růstový faktor. Ovšem *in vitro* je cetuximab schopný vyvolat ICD a ecto-CALR jen u některých buněčných linií lidského nádoru tlustého střeva (DiFi ano, HT-29 ne)<sup>137</sup>. U poslední studie ([NCT03747744](#)) je použitý léčebný postup založený na injekci CD1c<sup>+</sup> myeloidních DC, kdy zdůrazňují roli DC ve zkřížené prezentaci Ag a stimulaci adaptivní části imunitní odpovědi<sup>48</sup>.

Žádná z klinických studií z jakékoliv skupiny nemá výsledky, které by se přímo týkaly ICD nebo detekce DAMP, včetně jejich externalizace jako hlavního definičního znaku ICD. Po více než 15 letech od prvního popisu ICD<sup>9</sup> tedy nejsou k dispozici žádné závěry, které by poskytovaly informace vedoucí k objasnění role ICD v terapii lidských nádorových onemocnění a vhodné stratifikaci nádorových pacientů.

Tabulka 3: Klinické studie sledující DAMP v kontextu ICD (n = 6).

NCT	STATUS	TYP RAKOVINY	POČET PACIENTŮ	TYP STUDIE	PRIMÁRNÍ SLEDOVANÉ VÝSTUPY	DAMP	ZADAVATEL
<a href="#">NCT02921854</a>	dokončeno	NSCLC	60	experimentální / intervenční	změny v relativní expresi proteinů a lipidů v plazmě vzhledem k ICD	neuvedeno	Dirk De Ruyscher, Maastru Clinic
<a href="#">NCT01637532</a>	dokončeno	OC	21	experimentální / intervenční	možnost léčebné kombinace	CALR, HMGB1	J. R. Kroep, Leiden University Medical Center
<a href="#">NCT04256616</a>	nábor pacientů	NMIBC	110	prospektivní	schopnost MMC indukovat ICD	HMGB1	Maria Rescigno, Michele Tedeschi, Humanitas research hospital
<a href="#">NCT03388190</a>	nábor pacientů	mCRC	100	experimentální / intervenční	PFS	neuvedeno	Anne H Ree, Dawn J Patrick-Brown, University Hospital, Akershus
<a href="#">NCT04248582</a>	nábor pacientů	jícnu	18	experimentální / intervenční	DLT („dose limiting toxicity“)	HMGB1, CALR	Tilak Shah, McGuire VA Medical Center
<a href="#">NCT03755115</a>	neznámý	SCLC	40	experimentální / intervenční	ORR	HMGB1, CALR, HSP	Tongde Tian, Henan Cancer Hospital

Tabulka 4: Klinické studie, kde jsou detekované DAMP, ale bez explicitního popisu ICD (n = 11).

NCT	STATUS	TYP RAKOVINY	POČET PACIENTŮ	TYP STUDIE	PRIMÁRNÍ SLEDOVANÉ VÝSTUPY	DAMP	ZADAVATEL
<a href="#">NCT03486119</a>	dokončeno	NSCLC	60	prospektivní	detekce markerů různých imunitních buněk	HMGB1	Yonsei University
<a href="#">NCT04256122</a>	nábor pacientů	NMIBC	200	retrospektivní	IHC analýza biomarkerů	HMGB1	Maria Rescigno, Humanitas reseach hospital
<a href="#">NCT03964337</a>	nábor pacientů	prostaty	33	experimentální / intervenční	apoptický index	HMGB1	Julia Hurrelbrink, Michael Harrison, Duke University Medical Center
<a href="#">NCT03429907</a>	probíhající, bez náboru	BRCA	140	experimentální / intervenční	vliv stresu na výsledek nemoci	HMGB1, HSP70	Cobi J. Heijnen, M. D. Anderson Cancer Center
<a href="#">NCT03385226</a>	nábor pacientů	lymfom	46	experimentální / intervenční	ORR	HMGB1	Tim Illidge, University of Manchester
<a href="#">NCT01440413</a>	probíhající, bez náboru	BRCA	40	experimentální / intervenční	korelace mezi histopatologickou odpovědí a indukci protinádorové imunitní odpovědi	HMGB1, CALR, p-eIF2 $\alpha$	Oliver Tredan, Centre Leon Berard
<a href="#">NCT03453164</a>	probíhající, bez náboru	nádory trávicí trubice	41	experimentální / intervenční	změna velikosti nádoru	HMGB1	Koji Kono, Fukushima Medical University Hospital
<a href="#">NCT02916147</a>	neznámý	NSCLC	40	experimentální / intervenční	změna hladiny DAMP v bronchoalveolární tekutině	HMGB1	Kaiyuan Wang, Tianjin Medical University Cancer Institute Hospital
<a href="#">NCT02631252</a>	ukončeno (málo pacientů)	LAML	1	experimentální / intervenční	DLT	HMGB1	Alison Sehgal, University of Pittsburgh
<a href="#">NCT03241927</a>	ukončeno (málo pacientů)	melanom	1	experimentální / intervenční	imunitní odpověď NK buněk	HMGB1	Nina Bhardwaj, Icahn School of Medicine at Mount Sinai
<a href="#">NCT01144169</a>	ukončeno	karcinom ledvin	7	experimentální / intervenční	detekce markerů autofágie	HMGB1	Jodi K. Maranchie, University of Pittsburgh

Tabulka 5: Klinické studie zmiňující ICD, ale bez detekce DAMP (n = 14).

NCT	STATUS	TYP RAKOVINY	POČET PACIENTŮ	TYP STUDIE	PRIMÁRNÍ SLEDOVANÉ VÝSTUPY	LÉČBA	ZADAVATEL
<a href="#">NCT02406183</a>	dokončeno	melanom	13	experimentální / intervenční	MDT („maximal tolerated dose“) a DLT	ipilimumab + radioterapie	Piet Ost, University Hospital, Ghent
<a href="#">NCT04262687</a>	nábor pacientů	mCRC	55	experimentální / intervenční	% pacientů bez progresu po 10 měsících	capcitabine + bevacizumab + pembrolizumab + OXP	David Tougeron, CHU Poitiers
<a href="#">NCT03164993</a>	nábor pacientů	BRCA	75	experimentální / intervenční	nežádoucí účinky léčby, PFS	atezolizumab + DOX + CP	Jon Amund Kyte, Oslo University Hospital
<a href="#">NCT02499367</a>	probíhající, bez náboru	BRCA	84	experimentální / intervenční	PFS	nivolumab + radioterapie / DOX / CP / cisplatina	Marleen Kock, Antoni van Leeuwenhoek Netherlands Cancer Institute
<a href="#">NCT03409198</a>	probíhající, bez náboru	BRCA	82	experimentální / intervenční	toxická kombinovaná léčba, PFS	ipilimumab + nivolumab + DOX + CP	John Amund Kyte, Oslo University Hospital
<a href="#">NCT02821182</a>	neznámý	melanom	40	experimentální / intervenční	ORR	anti-PD1 + radioterapie	Piet Ost, University Hospital, Ghent
<a href="#">NCT04463368</a>	nábor pacientů	melanom	18	experimentální / intervenční	nežádoucí účinky léčby	ipilimumab + nivolumab + melphalan	Roger Olofsson Bagge, Sahlgrenska University Hospital
<a href="#">NCT02821754</a>	nábor pacientů	různé	90	experimentální / intervenční	PFS	durvalumab + tremelimumab + kryablace + radiofrekvenční ablace	Tim F Greten, NCI
<a href="#">NCT03944252</a>	probíhající, bez náboru	SCCAC	54	experimentální / intervenční	ORR	avelumab + cetuximab	Gruppo Oncologico del Nord-Ovest
<a href="#">NCT03801304</a>	probíhající, bez náboru	NSCLC	80	experimentální / intervenční	smrt pacientů, progresu nemoci	atezolizumab + vinorelbine	University Hospital, Brest
<a href="#">NCT05007444</a>	zatím bez náboru	BRCA	58	experimentální / intervenční	toxikologický profil	P2Et + antracyklín + CP	Hospital Universitario San Ignacio
<a href="#">NCT02906800</a>	neznámý	karcinomy hlavy a krku	15	experimentální / intervenční	toxická léčba	cisplatina + digoxin	Stephane Hans, Assistance Publique – Hopitaux de Paris
<a href="#">NCT04879888</a>	dokončeno	BRCA	9	experimentální / intervenční	počet nežádoucích účinků	vakcinace DC s TAA	Carlos A. Parra-López, Universidad Nacional de Colombia
<a href="#">NCT03747744</a>	probíhající, bez náboru	melanom	18	experimentální / intervenční	počet pacientů s nežádoucími účinky	CD1c <sup>+</sup> myDC + T-VEC	Bart Neyns, Universitair Ziekenhuis Brussel

## 5 Závěr

Imunogenní buněčná smrt je formou regulované buněčné smrti, která je schopná vyvolat imunitní odpověď namířenou proti nádoru. Ověření ustanovení imunitní paměti a ochrany proti nádoru se provádí pomocí *in vivo* myších modelů. V *in vitro* podmínkách s lidskými i myšími nádorovými liniemi je ICD stanovená na základě detekce DAMP molekul v extracelulárním prostředí. Jedná se především o CALR vystavený na vnější straně PM a do supernatantu uvolněné ATP a protein HMGB1. Popis mechanismů a signalizačních kaskád, díky kterým DAMP molekuly opouští vnitřní prostor buňky, je omezený na několik málo autorsky provázaných publikací. Navíc dodnes zůstává neúplně objasněný.

V experimentech s buněčnými liniemi je ecto-CALR nejčastěji detekovaný metodou FCM, doplněnou imunofluorescenční mikroskopií. V supernatantu je kvantitativně stanovená hladina HMGB1 metodou ELISA, ATP pak komerčními kity na základě luciferin-luciferázové reakce. Na rozdíl od klinických vzorků pacientů se v experimentálním provedení hojně využívá imunoblot, a to jak pro CALR, tak HMGB1. Dalším rozdílem je, že u pacientů není v kontextu ICD detekovaná ATP, ale pouze CALR, HMGB1 a ve velmi malé míře HSP70, jehož role v ICD navíc není jasně stanovená. Pacientům s nádorovým onemocněním jsou odebírané vzorky pevných nádorů zpracované jako FFPE, dále také vzorky krevního séra či krevní plasmy, PBMC nebo čerstvé tkáně. Právě FFPE vzorky a jejich vyhodnocení metodou IHC jsou třetím rozdílem oproti klasickým *in vitro* experimentům. Hlavní nevýhodou IHC je nepřesné rozlišení lokalizace DAMP molekul, které je pro ICD zásadní. Dále také semikvantitativní subjektivní analýza převažující ve většině publikací, s jedinou výjimkou softwarového vyhodnocení. Přesnou kvantifikaci přináší ELISA použitelná pro HMGB1. Detekce hladiny tohoto proteinu ovšem probíhá v séru nebo plasmě, což nemusí odrážet stav uvnitř TME. FCM vzorků PBMC a čerstvé nádorové tkáně překonává výše zmíněné nedostatky. Nicméně použití této metody je méně časté, omezené především na práci pražské laboratoře Sotio. Doplnkovou metodou je opět imunofluorescenční mikroskopie, pomocí které je detekovaný ecto-CALR a HMGB1 v čerstvé nádorové tkáni, PBMC a FFPE ale vždy pouze v jedné odborné publikaci.

Induktory ICD, kterými jsou pacienti běžně léčeni, vedou v experimentálních modelech ke zvýšení CALR na povrchu buněk, nebo HMGB1 v supernatantu. Výsledky z pacientů před a po podstoupení chemoterapie nebo radioterapie nejsou však jednoznačné. Navíc je změna hladiny detekovaná v různých typech vzorků a u pacientů s odlišnými druhy nádorů. Z výsledků tedy nelze vyvodit závěr o vlivu terapie na uvolnění DAMP molekul. Vyhodnocení korelace CALR nebo HMGB1 a imunitní odpovědi se zakládá na různých parametrech – produkce IFN $\gamma$ , přítomnost DC, CTL, Th buněk nebo NK buněk. Vedle pozitivní korelace, nebyla v několika případech nalezená žádná korelace, avšak nikdy nebyla negativní. Z důvodu rozličných parametrů i druhů nádorů těžko zobecnit jednotlivé výsledky do celistvého závěru. Stejně tak jsou různé parametry využívány pro korelaci mezi hladinou DAMP molekul a dobou přežití pacientů. Opět zde nalezneme především pozitivní výsledky, případně

bez korelace a pouze ve dvou případech negativní korelaci mezi HMGB1 a OS. CALR je pozitivně spjatý s dobou přežití v 5 z 9 odborných publikací, zbytek je bez signifikantní korelace. Obdobné výsledky jsou také pro HMGB1 (7 z 11 odborných publikací). Zhodnocení ukazuje jistý pozitivní trend, nicméně jde o různé parametry a odlišné druhy nádorových onemocnění (viz Tabulka 2, str. 23).

Posouzení závěrů klinických studií zabývajících se ICD je nemožné, jelikož žádné výsledky nejsou aktuálně dispozici. Proto poslední kapitola obsahuje především klasifikaci ICD klinických studií nalezených v databázi [ClinicalTrials.gov](http://ClinicalTrials.gov) a zhodnocení dostupnosti výsledků z obecného pohledu. Výstupem klasifikace klinických studií je Tabulka 3, Tabulka 4 a Tabulka 5. Publikace výsledků je možná přímo v databázi, avšak méně než čtvrtina všech dokončených studií data skutečně obsahuje. Zveřejnění výsledků je přípustné také v podobě odborného článku, ani v tomto případě však není procento publikací příliš vysoké, jak ukázala metaanalýza klinických studií z nejprestižnějších akademických ústavů.

Pro prokázání významu ICD jako spouštěcího mechanismu protinádorové imunitní odpovědi je zapotřebí jasně definovat molekulární a buněčné procesy vedoucí k uvolnění DAMP molekul. Pro přenos poznatků z *in vitro* nebo *in vivo* experimentů do klinické praxe chybí adekvátní standardizované postupy detekce DAMP molekul zohledňující jejich lokalizaci během ICD. Takové standardizované protokoly budou nutné pro stratifikaci pacientů a vymezení DAMP jako prediktivních nebo prognostických biologických znaků v klinické péči. Nezbytné je taktéž zveřejnění pozitivních i negativních výsledků klinických studií, a to jak z vědeckého, tak etického hlediska.

## 6 Použitá literatura

\* jsou označené souhrnné články a komentáře.

- \*1. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
- \*2. Garner, H. & de Visser, K. E. Immune crosstalk in cancer progression and metastatic spread: a complex conversation. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 483–497 (2020).
- \*3. Matzinger, P. The Danger Model: A Renewed Sense of Self. *Science* **296**, 301–305 (2002).
- \*4. Galluzzi, L. *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* **25**, 486–541 (2018).
- \*5. Galluzzi, L. *et al.* Consensus guidelines for the definition, detection and interpretation of immunogenic cell death. *J. Immunother. Cancer* **8**, e000337 (2020).
6. Obeid, M. *et al.* Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat. Med.* **13**, 54–61 (2007).
7. Ghiringhelli, F. *et al.* Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1 $\beta$ -dependent adaptive immunity against tumors. *Nat. Med.* **15**, 1170–1178 (2009).
8. 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).
9. Casares, N. *et al.* Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *J. Exp. Med.* **202**, 1691–1701 (2005).
- \*10. Fucikova, J., Spisek, R., Kroemer, G. & Galluzzi, L. Calreticulin and cancer. *Cell Res.* **31**, 5–16 (2021).
- \*11. Galluzzi, L., Humeau, J., Buqué, A., Zitvogel, L. & Kroemer, G. Immunostimulation with chemotherapy in the era of immune checkpoint inhibitors. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **17**, 725–741 (2020).
- \*12. Krysko, D. V. *et al.* Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 860–875 (2012).
- \*13. Fucikova, J. *et al.* Prognostic and Predictive Value of DAMPs and DAMP-Associated Processes in Cancer. *Front. Immunol.* **6**, 402 (2015).
- \*14. Fucikova, J. *et al.* Detection of immunogenic cell death and its relevance for cancer therapy. *Cell Death Dis.* **11**, 1–13 (2020).
- \*15. Vanmeerbeek, I. *et al.* Trial watch: chemotherapy-induced immunogenic cell death in immuno-oncology. *Oncoimmunology* **9**, 1703449 (2020).
- \*16. Vivier, E. & Malissen, B. Innate and adaptive immunity: specificities and signaling hierarchies revisited. *Nat. Immunol.* **6**, 17–21 (2005).
- \*17. Chaplin, D. D. Overview of the Immune Response. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**, S3–23 (2010).
- \*18. Galluzzi, L., Buqué, A., Kepp, O., Zitvogel, L. & Kroemer, G. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 97–111 (2017).
- \*19. Kelley, N., Jeltama, D., Duan, Y. & He, Y. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 3328 (2019).
- \*20. Swanson, K. V., Deng, M. & Ting, J. P.-Y. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat. Rev. Immunol.* **19**, 477–489 (2019).
- \*21. Boatright, K. M. & Salvesen, G. S. Mechanisms of caspase activation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**, 725–731 (2003).
- \*22. Wculek, S. K. *et al.* Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 7–24 (2020).
- \*23. Stow, J. L., Hung, Y. & Wall, A. A. Macropinocytosis: Insights from immunology and cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.* **65**, 131–140 (2020).
- \*24. Klein, L., Robey, E. A. & Hsieh, C.-S. Central CD4+ T cell tolerance: deletion versus regulatory T cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* **19**, 7–18 (2019).
- \*25. Schumacher, T. N., Scheper, W. & Kvistborg, P. Cancer Neoantigens. *Annu. Rev. Immunol.* **37**, 173–200 (2019).

- \*26. Aaes, T. L. & Vandenabeele, P. The intrinsic immunogenic properties of cancer cell lines, immunogenic cell death, and how these influence host antitumor immune responses. *Cell Death Differ.* **28**, 843–860 (2021).
- \*27. Ribas, A. & Wolchok, J. D. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science* **359**, 1350–1355 (2018).
- \*28. Legrand, A. J., Konstantinou, M., Goode, E. F. & Meier, P. The Diversification of Cell Death and Immunity: Memento Mori. *Mol. Cell* **76**, 232–242 (2019).
29. Yang, H. *et al.* Contribution of RIP3 and MLKL to immunogenic cell death signaling in cancer chemotherapy. *OncoImmunology* **5**, e1149673 (2016).
30. Aaes, T. L. *et al.* Immunodominant AH1 Antigen-Deficient Necroptotic, but Not Apoptotic, Murine Cancer Cells Induce Antitumor Protection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **204**, 775–787 (2020).
31. Wang, Y. *et al.* Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin. *Nature* **547**, 99–103 (2017).
32. Vacchelli, E. *et al.* Chemotherapy-induced antitumor immunity requires formyl peptide receptor 1. *Science* **350**, 972–978 (2015).
33. Sistigu, A. *et al.* Cancer cell–autonomous contribution of type I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy. *Nat. Med.* **20**, 1301–1309 (2014).
34. Panaretakis, T. *et al.* Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *EMBO J.* **28**, 578–590 (2009).
35. Fucikova, J. *et al.* Human tumor cells killed by anthracyclines induce a tumor-specific immune response. *Cancer Res.* **71**, 4821–4833 (2011).
- \*36. Pol, J. *et al.* Trial Watch: Immunogenic cell death inducers for anticancer chemotherapy. *Oncoimmunology* **4**, e1008866 (2015).
- \*37. 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).
38. Michaud, M. *et al.* Autophagy-Dependent Anticancer Immune Responses Induced by Chemotherapeutic Agents in Mice. *Science* **334**, 1573–1577 (2011).
39. Tesniere, A. *et al.* Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin. *Oncogene* **29**, 482–491 (2010).
40. Guerriero, J. L. *et al.* DNA alkylating therapy induces tumor regression through an HMGB1-mediated activation of innate immunity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **186**, 3517–3526 (2011).
41. 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).
42. Deng, L. *et al.* STING-Dependent Cytosolic DNA Sensing Promotes Radiation-Induced Type I Interferon-Dependent Antitumor Immunity in Immunogenic Tumors. *Immunity* **41**, 843–852 (2014).
43. 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).
44. Vanpouille-Box, C. *et al.* DNA exonuclease Trex1 regulates radiotherapy-induced tumour immunogenicity. *Nat. Commun.* **8**, 15618 (2017).
45. 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).
46. 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).
- \*47. Bloy, N. *et al.* Immunogenic stress and death of cancer cells: Contribution of antigenicity vs adjuvanticity to immunosurveillance. *Immunol. Rev.* **280**, 165–174 (2017).

48. Di Blasio, S. *et al.* Human CD1c(+) DCs are critical cellular mediators of immune responses induced by immunogenic cell death. *Oncoimmunology* **5**, e1192739 (2016).
49. Garg, A. D. *et al.* ROS-induced autophagy in cancer cells assists in evasion from determinants of immunogenic cell death. *Autophagy* **9**, 1292–1307 (2013).
50. Colangelo, T. *et al.* The miR-27a-calreticulin axis affects drug-induced immunogenic cell death in human colorectal cancer cells. *Cell Death Dis.* **7**, e2108–e2108 (2016).
51. Martins, I. *et al.* Molecular mechanisms of ATP secretion during immunogenic cell death. *Cell Death Differ.* **21**, 79–91 (2014).
52. Pfirschke, C. *et al.* Immunogenic Chemotherapy Sensitizes Tumors to Checkpoint Blockade Therapy. *Immunity* **44**, 343–354 (2016).
53. Lévesque, S. *et al.* A synergistic triad of chemotherapy, immune checkpoint inhibitors, and caloric restriction mimetics eradicates tumors in mice. *Oncoimmunology* **8**, e1657375 (2019).
- \*54. Kozlov, G. & Gehring, K. Calnexin cycle – structural features of the ER chaperone system. *Febs J.* **287**, 4322–4340 (2020).
- \*55. Michalak, M., Groenendyk, J., Szabo, E., Gold, L. I. & Opas, M. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem. J.* **417**, 651–666 (2009).
- \*56. Thomas, C. & Tampé, R. MHC I assembly and peptide editing — chaperones, clients, and molecular plasticity in immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **70**, 48–56 (2021).
57. Bezu, L. *et al.* eIF2 $\alpha$  phosphorylation is pathognomonic for immunogenic cell death. *Cell Death Differ.* **25**, 1375–1393 (2018).
58. Panaretakis, T. *et al.* The co-translocation of ERp57 and calreticulin determines the immunogenicity of cell death. *Cell Death Differ.* **15**, 1499–1509 (2008).
59. Azuma, Y., Suzuki, K., Higai, K., Matsumoto, K. & Tada, S. Biphasic Increases of Cell Surface Calreticulin Following Treatment with Mitoxantrone. *Biol. Pharm. Bull.* **43**, 1595–1599 (2020).
60. Li, C. *et al.* Mitoxantrone triggers immunogenic prostate cancer cell death via p53-dependent PERK expression. *Cell. Oncol.* **43**, 1099–1116 (2020).
61. Giglio, P. *et al.* PKR and GCN2 stress kinases promote an ER stress-independent eIF2 $\alpha$  phosphorylation responsible for calreticulin exposure in melanoma cells. *Oncoimmunology* **7**, e1466765 (2018).
62. Liu, C.-C. *et al.* Integrins and ERp57 Coordinate to Regulate Cell Surface Calreticulin in Immunogenic Cell Death. *Front. Oncol.* **9**, (2019).
63. Liu, C.-C. *et al.*  $\alpha$ -Integrin expression and function modulates presentation of cell surface calreticulin. *Cell Death Dis.* **7**, e2268 (2016).
64. Obeid, M. ERP57 Membrane Translocation Dictates the Immunogenicity of Tumor Cell Death by Controlling the Membrane Translocation of Calreticulin. *J. Immunol.* **181**, 2533–2543 (2008).
65. Gardai, S. J. *et al.* Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell* **123**, 321–334 (2005).
66. Colangelo, T. *et al.* Proteomic screening identifies calreticulin as a miR-27a direct target repressing MHC class I cell surface exposure in colorectal cancer. *Cell Death Dis.* **7**, e2120–e2120 (2016).
67. 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).
- \*68. Kepp, O. *et al.* ATP and cancer immunosurveillance. *EMBO J.* **40**, e108130 (2021).
69. Ma, Y. *et al.* Anticancer Chemotherapy-Induced Intratumoral Recruitment and Differentiation of Antigen-Presenting Cells. *Immunity* **38**, 729–741 (2013).

70. Boyd-Tressler, A., Penuela, S., Laird, D. W. & Dubyak, G. R. Chemotherapeutic Drugs Induce ATP Release via Caspase-gated Pannexin-1 Channels and a Caspase/Pannexin-1-independent Mechanism \*. *J. Biol. Chem.* **289**, 27246–27263 (2014).
71. 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).
72. Chekeni, F. B. *et al.* Pannexin 1 channels mediate ‘find-me’ signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature* **467**, 863–867 (2010).
73. Ruan, Z., Orozco, I. J., Du, J. & Lü, W. Structures of human pannexin 1 reveal ion pathways and mechanism of gating. *Nature* **584**, 646–651 (2020).
- \*74. Štros, M. HMGB proteins: Interactions with DNA and chromatin. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.* **1799**, 101–113 (2010).
75. Panneerselvam, S. *et al.* Cysteine redox state plays a key role in the inter-domain movements of HMGB1: A molecular dynamics simulation study. *RSC Adv.* **6**, 100804–100819 (2016).
- \*76. Ferrara, M. *et al.* Oxidation of HMGB1 Is a Dynamically Regulated Process in Physiological and Pathological Conditions. *Front. Immunol.* **11**, 1122 (2020).
77. Urbonaviciute, V. *et al.* Induction of inflammatory and immune responses by HMGB1-nucleosome complexes: implications for the pathogenesis of SLE. *J. Exp. Med.* **205**, 3007–3018 (2008).
78. 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).
79. Venereau, E. *et al.* Mutually exclusive redox forms of HMGB1 promote cell recruitment or proinflammatory cytokine release. *J. Exp. Med.* **209**, 1519–1528 (2012).
80. Schiraldi, M. *et al.* HMGB1 promotes recruitment of inflammatory cells to damaged tissues by forming a complex with CXCL12 and signaling via CXCR4. *J. Exp. Med.* **209**, 551–563 (2012).
81. Fassi, E. M. A. *et al.* Oxidation State Dependent Conformational Changes of HMGB1 Regulate the Formation of the CXCL12/HMGB1 Heterocomplex. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **17**, 886–894 (2019).
82. Yang, H. *et al.* A critical cysteine is required for HMGB1 binding to Toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 11942–11947 (2010).
83. Yang, H. *et al.* MD-2 is required for disulfide HMGB1-dependent TLR4 signaling. *J. Exp. Med.* **212**, 5–14 (2015).
84. Yang, H. *et al.* Redox Modification of Cysteine Residues Regulates the Cytokine Activity of High Mobility Group Box-1 (HMGB1). *Mol. Med.* **18**, 250–259 (2011).
85. LeBlanc, P. M. *et al.* An immunogenic peptide in the A-box of HMGB1 protein reverses apoptosis-induced tolerance through RAGE receptor. *J. Biol. Chem.* **289**, 7777–7786 (2014).
86. Tang, D. *et al.* HMGB1 release and redox regulates autophagy and apoptosis in cancer cells. *Oncogene* **29**, 5299–5310 (2010).
87. Kwak, M. S. *et al.* Immunological Significance of HMGB1 Post-Translational Modification and Redox Biology. *Front. Immunol.* **11**, (2020).
88. Baracco, E. E. *et al.* Contribution of annexin A1 to anticancer immunosurveillance. *OncoImmunology* **8**, e1647760 (2019).
89. Sheikh, M. H. & Solito, E. Annexin A1: Uncovering the Many Talents of an Old Protein. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1045 (2018).
90. Fucikova, J. *et al.* Human tumor cells killed by anthracyclines induce a tumor-specific immune response. *Cancer Res.* **71**, 4821–4833 (2011).
91. Basu, S., Binder, R. J., Ramalingam, T. & Srivastava, P. K. CD91 Is a Common Receptor for Heat Shock Proteins gp96, hsp90, hsp70, and Calreticulin. *Immunity* **14**, 303–313 (2001).

92. Garg, A. D. *et al.* Pathogen response-like recruitment and activation of neutrophils by sterile immunogenic dying cells drives neutrophil-mediated residual cell killing. *Cell Death Differ.* **24**, 832–843 (2017).
93. Fucikova, J. *et al.* Calreticulin Expression in Human Non-Small Cell Lung Cancers Correlates with Increased Accumulation of Antitumor Immune Cells and Favorable Prognosis. *Cancer Res.* **76**, 1746–1756 (2016).
94. Kasikova, L. *et al.* Calreticulin exposure correlates with robust adaptive antitumor immunity and favorable prognosis in ovarian carcinoma patients. *J. Immunother. Cancer* **7**, 312 (2019).
95. Aurelius, J. *et al.* Anthracycline-based consolidation may determine outcome of post-consolidation immunotherapy in AML. *Leuk. Lymphoma* **60**, 2771–2778 (2019).
96. Oresta, B. *et al.* Mitochondrial metabolic reprogramming controls the induction of immunogenic cell death and efficacy of chemotherapy in bladder cancer. *Sci. Transl. Med.* **13**, (2021).
97. Arnold, T. *et al.* Plasma HMGB-1 after the initial dose of epirubicin/docetaxel in cancer. *Eur. J. Clin. Invest.* **43**, 286–291 (2013).
98. Exner, R. *et al.* Prognostic value of HMGB1 in early breast cancer patients under neoadjuvant chemotherapy. *Cancer Med.* **5**, 2350–2358 (2016).
99. Bains, S. J. *et al.* Immunogenic cell death by neoadjuvant oxaliplatin and radiation protects against metastatic failure in high-risk rectal cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* **69**, 355–364 (2020).
100. Clasen, K., Welz, S., Faltin, H., Zips, D. & Eckert, F. Dynamics of HMGB1 (High Mobility Group Box 1) during radiochemotherapy correlate with outcome of HNSCC patients. *Strahlenther. Onkol.* (2021).
101. Wemeau, M. *et al.* Calreticulin exposure on malignant blasts predicts a cellular anticancer immune response in patients with acute myeloid leukemia. *Cell Death Dis.* **1**, e104–e104 (2010).
102. Suzuki, Y. *et al.* Immunogenic Tumor Cell Death Induced by Chemoradiotherapy in Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Res.* **72**, 3967–3976 (2012).
103. Wild, C. A. *et al.* HMGB1 is overexpressed in tumor cells and promotes activity of regulatory T cells in patients with head and neck cancer. *Oral Oncol.* **48**, 409–416 (2012).
104. Stoetzer, O. J. *et al.* Circulating immunogenic cell death biomarkers HMGB1 and RAGE in breast cancer patients during neoadjuvant chemotherapy. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **34**, 81–90 (2013).
105. Wittwer, C. *et al.* Circulating nucleosomes and immunogenic cell death markers HMGB1, sRAGE and DNase in patients with advanced pancreatic cancer undergoing chemotherapy. *Int. J. Cancer* **133**, 2619–2630 (2013).
106. 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).
107. Handke, N. A., Rupp, A. B. A., Trimpop, N., von Pawel, J. & Holdenrieder, S. Soluble High Mobility Group Box 1 (HMGB1) Is a Promising Biomarker for Prediction of Therapy Response and Prognosis in Advanced Lung Cancer Patients. *Diagn. Basel Switz.* **11**, (2021).
108. Ladoire, S. *et al.* The presence of LC3B puncta and HMGB1 expression in malignant cells correlate with the immune infiltrate in breast cancer. *Autophagy* **12**, 864–875 (2016).
109. Muth, C. *et al.* Primary glioblastoma multiforme tumors and recurrence : Comparative analysis of the danger signals HMGB1, HSP70, and calreticulin. *Strahlenther. Onkol. Organ Dtsch. Rontgengesellschaft Al* **192**, 146–155 (2016).
110. Murakami, T. *et al.* Neoadjuvant chemoradiotherapy of pancreatic cancer induces a favorable immunogenic tumor microenvironment associated with increased major histocompatibility complex class I-related chain A/B expression. *J. Surg. Oncol.* **116**, 416–426 (2017).
111. Aoto, K. *et al.* Immunogenic tumor cell death induced by chemotherapy in patients with breast cancer and esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol. Rep.* **39**, 151–159 (2018).
112. Laengle, J. *et al.* DNA damage predicts prognosis and treatment response in colorectal liver metastases superior to immunogenic cell death and T cells. *Theranostics* **8**, 3198–3213 (2018).

113. Truxova, I. *et al.* Calreticulin exposure on malignant blasts correlates with improved natural killer cell-mediated cytotoxicity in acute myeloid leukemia patients. *Haematologica* **105**, 1868–1878 (2020).
- \*114. Matos, L. L. de, Truffelli, D. C., de Matos, M. G. L. & da Silva Pinhal, M. A. Immunohistochemistry as an important tool in biomarkers detection and clinical practice. *Biomark. Insights* **5**, 9–20 (2010).
- \*115. Cossarizza, A. *et al.* Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). *Eur. J. Immunol.* **49**, 1457–1973 (2019).
116. Wild, C. A. *et al.* HMGB1 is overexpressed in tumor cells and promotes activity of regulatory T cells in patients with head and neck cancer. *Oral Oncol.* **48**, 409–416 (2012).
117. Muth, C. *et al.* Primary glioblastoma multiforme tumors and recurrence : Comparative analysis of the danger signals HMGB1, HSP70, and calreticulin. *Strahlenther. Onkol. Organ Dtsch. Rontgengesellschaft Al* **192**, 146–155 (2016).
- \*118. Saeys, Y., Van Gassen, S. & Lambrecht, B. N. Computational flow cytometry: helping to make sense of high-dimensional immunology data. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 449–462 (2016).
- \*119. Thiese, M. S. Observational and interventional study design types; an overview. *Biochem. Medica* **24**, 199–210 (2014).
- \*120. Goldacre, B. How to Get All Trials Reported: Audit, Better Data, and Individual Accountability. *PLOS Med.* **12**, e1001821 (2015).
- \*121. Moorthy, V. S., Karam, G., Vannice, K. S. & Kieny, M.-P. Rationale for WHO’s New Position Calling for Prompt Reporting and Public Disclosure of Interventional Clinical Trial Results. *PLOS Med.* **12**, e1001819 (2015).
122. Chen, R. *et al.* Publication and reporting of clinical trial results: cross sectional analysis across academic medical centers. *BMJ* **352**, i637 (2016).
123. Dijkgraaf, E. M. *et al.* A phase I trial combining carboplatin/doxorubicin with tocilizumab, an anti-IL-6R monoclonal antibody, and interferon- $\alpha$ 2b in patients with recurrent epithelial ovarian cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **26**, 2141–2149 (2015).
124. Vaes, R. *et al.* 77P Identification of prognostic and predictive immunological biomarkers in stage I and III non-small cell lung cancer (NSCLC) patients: A prospective exploratory study. *Ann. Oncol.* **32**, S389 (2021).
125. Ree, A. H. *et al.* Abstract 522: Immunogenic chemotherapy and immune checkpoint inhibition (ICI) in microsatellite-stable (MSS) metastatic colorectal cancer (mCRC): Biomarkers indicative of durable treatment response. *Cancer Res.* **81**, 522–522 (2021).
126. Ree, A. H. *et al.* Repeat sequential oxaliplatin-based chemotherapy (FLOX) and nivolumab versus FLOX alone as first-line treatment of microsatellite-stable (MSS) metastatic colorectal cancer (mCRC): Initial results from the randomized METIMMOX study. *J. Clin. Oncol.* **39**, 3556–3556 (2021).
127. Kim, C. G. *et al.* Dynamic changes in circulating PD-1+CD8+ T lymphocytes for predicting treatment response to PD-1 blockade in patients with non-small-cell lung cancer. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990* **143**, 113–126 (2021).
128. Kono, K. *et al.* 1393P Phase I/II clinical trial of combination of anti-PD-1 mAb, nivolumab with radiotherapy for unresectable and recurrent gastric cancer who failed to standard chemotherapy. *Ann. Oncol.* **32**, S1053–S1054 (2021).
129. Bernal-Estévez, D., Sánchez, R., Tejada, R. E. & Parra-López, C. Chemotherapy and radiation therapy elicits tumor specific T cell responses in a breast cancer patient. *BMC Cancer* **16**, 591 (2016).
130. De Wolf, K. *et al.* A phase II trial of stereotactic body radiotherapy with concurrent anti-PD1 treatment in metastatic melanoma: evaluation of clinical and immunologic response. *J. Transl. Med.* **15**, 21 (2017).
131. Sundahl, N. *et al.* Phase 2 Trial of Nivolumab Combined With Stereotactic Body Radiation Therapy in Patients With Metastatic or Locally Advanced Inoperable Melanoma. *Int. J. Radiat. Oncol.* **104**, 828–835 (2019).
132. Sundahl, N. *et al.* Phase 1 Dose Escalation Trial of Ipilimumab and Stereotactic Body Radiation Therapy in Metastatic Melanoma. *Int. J. Radiat. Oncol.* **100**, 906–915 (2018).
133. Voorwerk, L. *et al.* Immune induction strategies in metastatic triple-negative breast cancer to enhance the sensitivity to PD-1 blockade: the TONIC trial. *Nat. Med.* **25**, 920–928 (2019).

134. Gomez-Cadena, A. *et al.* Immune-system-dependent anti-tumor activity of a plant-derived polyphenol rich fraction in a melanoma mouse model. *Cell Death Dis.* **7**, e2243–e2243 (2016).
135. Prieto, K. *et al.* The delay in cell death caused by the induction of autophagy by P2Et extract is essential for the generation of immunogenic signals in melanoma cells. *Apoptosis* **25**, 875–888 (2020).
136. Dudek-Perić, A. M. *et al.* Antitumor immunity triggered by melphalan is potentiated by melanoma cell surface-associated calreticulin. *Cancer Res.* **75**, 1603–1614 (2015).
137. Pozzi, C. *et al.* The EGFR-specific antibody cetuximab combined with chemotherapy triggers immunogenic cell death. *Nat. Med.* **22**, 624–631 (2016).

## 6.1 Internetové zdroje

Bank, RCSB Protein Data. RCSB PDB – 6ENY: Structure of the human PLC editing module. *RCSB PDB* [online]. USA: National Institutes of Health, 2017 [cit. 2021-11-29]. Dostupné z: <https://www.rcsb.org/structure/6ENY>

Basic Search. *Pan African Clinical Trials Registry* [online]. Jihoafrická republika: Pan African Clinical Trials Registry, ©2022 [cit. 2022-01-03]. Dostupné z: <https://pactr.samrc.ac.za/Search.aspx>

BioRender. *BioRender* [online]. 2017 [cit. 2021-12-15]. Dostupné z: <https://biorender.com/>

Glossary of Common Site Terms. *ClinicalTrials.gov* [online]. USA: U.S. National Library of Medicine, poslední kontrola 2021 [cit. 2021-11-9]. Dostupné z: <https://clinicaltrials.gov/ct2/about-studies/glossary>

Home & Search. *EU Clinical Trials Register* [online]. Nizozemsko: European Medicine Agency, ©1995-2022 [cit. 2022-01-03]. Dostupné z: <https://www.clinicaltrialsregister.eu/ctr-search/search>

Home. *ClinicalTrials.gov* [online]. USA: U.S. National Library of Medicine, poslední revize 2021 [cit. 2021-11-9]. Dostupné z: <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>

Home. *NCBI Gene* [online]. USA: U.S. National Library of Medicine [cit. 2021-12-20]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>

International Clinical Trials Registry Platform Search Portal. *World Health Organization ICTRP* [online]. World Health Organization, poslední revize 2018 [cit. 2022-01-03]. Dostupné z: <https://trialsearch.who.int/>

ISRCTN Search Portal. *BioMed Central, ISRCTN* [online]. Springer Nature, ©2022 [cit. 2022-01-03]. Dostupné z: <https://www.isrctn.com/search?q=>

NCI Dictionary of Cancer Terms. *National Cancer Institute* [online]. USA: National Institutes of Health, 2011 [cit. 2021-11-20]. Dostupné z: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/>

PyMOL. *PyMOL by Schrödinger* [online]. Schrödinger, ©2021 [cit. 2021-11-29]. Dostupné z: <https://pymol.org/2/>

TCGA Study Abbreviations. *National Cancer Institute, Genomic Data Commons* [online]. USA: National Institutes of Health [cit. 2021-11-20]. Dostupné z: <https://gdc.cancer.gov/resources-tcga-users/tcga-code-tables/tcga-study-abbreviations>

University of Liverpool. Further update on research misconduct investigation. *University of Liverpool News* [online]. Velká Británie: University of Liverpool, 2020 [cit. 2021-12-21]. Dostupné z: <https://news.liverpool.ac.uk/2020/08/17/further-update-on-research-misconduct-investigation/>