

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

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



**Natálie Hříbková**

**Molekulární mechanismy účinků cfDNA**

Molecular mechanisms of cfDNA effects

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: RNDr. Pavlína Daňková, Ph.D.

Praha, 2023

# Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat své vedoucí závěrečné práce RNDr. Pavlíně Daňkové, Ph.D. za vstřícnost, ochotu, odborné konzultace a pomoc při získávání literárních podkladů.

# Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracovala samostatně a veškerou literaturu a ostatní informační zdroje řádně citovala. Tato práce ani žádná její část nebyla použita k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 3.5. 2023

.....  
Natálie Hříbková

## Abstrakt

Biologická role volné cirkulující DNA je v současné době zkoumána především z hlediska etiologie autoimunitních stavů a rakovinového onemocnění. Ukazuje se, že úloha cfDNA jaderného či mitochondriálního původu v interakci s receptory vrozeného imunitního systému je poměrně komplexní a cfDNA je tak zapojena do celé řady molekulárních mechanismů jako je například šíření rakovinových metastáz, indukce autofágie a spouštění zánětlivých procesů. Znalost konkrétních drah, do kterých je cfDNA v rozvoji těchto patologických stavů zapojena, se zdá být klíčová především z hlediska zvolení a cílení vhodné léčebné terapie. Tato práce poskytuje rámcovým přehled poznatků o interakci cfDNA s receptory vrozeného imunitního systému, indukcí imunologických signálních drah a možných důsledků, které tyto molekulární dráhy mohou v organismu způsobovat.

**Klíčová slova:** cfDNA, TLR9, cGAS/STING, AIM2, autoimunitní onemocnění, biomarker, rakovina

## Abstract

The biological role of free circulating DNA is currently being investigated mainly in terms of the etiology of autoimmune conditions and cancer. It appears that the role of cfDNA of nuclear or mitochondrial origin in interacting with receptors of the innate immune system is quite complex and cfDNA is thus involved in a variety of molecular mechanisms such as the spread of cancer metastasis, induction of autophagy and triggering of inflammatory processes. Knowledge of the specific pathways in which cfDNA is involved in the development of these pathologies seems to be crucial, especially in terms of selecting and targeting appropriate therapies. This paper provides a framework for the knowledge on the interaction of cfDNA with receptors of the innate immune system, the induction of immunological signaling pathways and the possible consequences that these molecular pathways may have in the body.

**Key words:** cfDNA, TLR9, cGAS/STING, AIM2, autoimmune disease, biomarker, cancer

# Seznam zkratek

AIM2 – absent in melanoma 2

ALR – AIM2-like receptor

CASP-1 – kaspáza-1

cfDNA – volná cirkulující DNA

cGAMP – cyklický guanosinmonofosfát-adenosinmonofosfát

cGAS – cyklická GMP-AMP syntáza

CpG – motiv cytosin-fosfát-guanin

CpG-DNA – DNA obsahující motiv cytosin-fosfát-guanin

DAMPs – molekulární vzory asociované s nebezpečím

ET – extracelulární pasti

gDNA – jaderná DNA

GSDMD – gastermin D

HMGB1 – protein skupiny box s vysokou mobilitou

INF – interferon

ISD – interferon stimulující dráha

IRF – interferon regulující faktor

MAPK – mitogenem aktivovaná protein kináza

mtDNA – mitochondriální DNA

mt-cfDNA – volná mitochondriální DNA

NFκB – nukleární faktor kappaB

NIPT – neinvazivní prenatální vyšetření

PAMPs – molekulární vzory asociované s patogenem

PRR – receptory rozpoznávajícími molekulární vzory typické pro nebezpečí

TLR – toll-like receptor

TLR9 – toll-like receptor 9

RA – revmatoidní artritida

ROS – reaktivní formy kyslíku

SLE – systémový lupus erythematoses

sODN – oligodeoxynukleotidy obsahujících CpG

STING – stimulátor interferonových genů

# Obsah

<b>1 Úvod</b> .....	1
<b>2 cfDNA</b> .....	2
2.1. Historie a současnost.....	2
2.2 Struktura cfDNA.....	3
2.2.1 Velikost fragmentů cfDNA.....	3
2.2.2 Strukturní vlastnosti cfDNA.....	4
2.2.3 Integrita fragmentů cfDNA.....	5
2.3 Uvolňování cfDNA z buněk.....	5
2.3.1 Příčiny uvolňování cfDNA.....	6
2.3.2 Mechanismy uvolňování cfDNA.....	6
2.3.3 Clearance cfDNA.....	8
<b>3 Mechanismy účinků cfDNA</b> .....	8
3.1 Mitochondriální DNA jako mediátor zánětu.....	9
3.2 Role PRR v rozpoznávání cfDNA.....	10
3.2.1 Receptor TLR.....	11
3.2.2 Signální dráha cGAS/STING.....	14
3.2.3 Receptor AIM2.....	17
3.3 Role cfDNA v imunomodulačních a zánětlivých procesech.....	18
3.3.1 Imunomodulační role receptoru TLR.....	19
3.3.2 Imunomodulační role signální dráhy cGAS/STING.....	20
3.3.3 Imunomodulační role receptoru AIM2.....	22
3.4 Úloha cfDNA v molekulárních mechanismech rakoviny.....	22
3.4.1 Neutrofilní extracelulární pasti (NET).....	23
3.4.2 Úloha TLR9 v molekulárních mechanismech rakoviny.....	23
3.4.3 Úloha cGAS/STING v molekulárních mechanismech rakoviny.....	24
3.4.4 Úloha AIM2 v molekulárních mechanismech rakoviny.....	25
<b>4 Závěr</b> .....	26
<b>5 Bibliografie</b> .....	27

# 1 Úvod

Volná cirkulující DNA (cfDNA) je pojem, který je v rámci molekulární a genetické diagnostiky, relevantní již od druhé poloviny 20. století. Jedná se o většinou krátké fragmenty dvoušroubovice DNA ve formě nukleozomu, které jsou uvolňovány z buněčného jádra nebo mitochondrií do oběhu v rámci celé řady fyziologických i patologických stavů.

Uvolňování cfDNA je z patologického hlediska spojeno především se zánětlivými stavy a rakovinovým bujením. Za zvýšenou hladinu cfDNA však může odpovídat celá řada dalších faktorů jako je například stárnutí, těhotenství, fyzický a psychický stres a mnohé neurální funkce. Tato cfDNA může být do plazmy uvolněna celou řadou mechanismů. Způsob uvolnění a původ cfDNA hraje důležitou roli ve specifikaci délky a strukturních modifikací jednotlivých fragmentů. Tyto charakteristické vlastnosti dále determinují specifitu vazby na jednotlivé receptory a další osud cfDNA v organismu.

Uvolněná cfDNA dále interaguje s receptory vrozené imunitní odpovědi, čímž je aktivována celá řada signálních drah včetně tvorby protilátek proti vlastní DNA. Nedostatečná clearance a následná akumulace této cfDNA v extracelulárním prostoru pak může vést k nadměrné stimulaci imunitní odpovědi a rozvoji autoimunitních onemocnění. Role cfDNA byla taktéž objevena i v rámci mechanismů spojených s rakovinovou proliferací a metastázováním. Aktivace konkrétní signální dráhy a celkový vliv na výsledné molekulární procesy se různí napříč jednotlivými typy tumorů.

Tato bakalářská práce pojednává o mechanismech účinku cfDNA na receptory vrozené imunity, které jsou ze současného pohledu významné především z hlediska zapojení do modulace patologických stavů – konkrétně autoimunitních a tumorových mechanismů. Cílem práce je vysvětlit podstatu interakce cfDNA s těmito konkrétními receptory na základě její struktury a co nejkompaktněji popsat všechny možné způsoby, kterými může volná DNA ovlivnit jedince jak na úrovni buňky, tak celkového organismu. Výsledkem práce je dokument sumarizující základní poznatky této problematiky s ohledem na nejnovější výzkum z této oblasti.

## 2 cfDNA

### 2.1. Historie a současnost

Volná cirkulující DNA (cfDNA) v lidské krevní plazmě byla poprvé popsána roku 1948 vědci Mandelem a Metaisem (shrnuto v Duvvuri & Lood , 2019). Zájem o cfDNA jakožto biomarkeru u autoimunitních revmatických onemocnění avšak započal až v 60. a 70. letech, kdy se dvěma výzkumným skupinám, zabývajícím se výzkumem pacientů se systémovým onemocněním lupus erythematosus (SLE) a revmatoidní artritidou, podařilo detekovat cfDNA pomocí anti-DNA protilátek (Tan *et al.*, 1966; Leon *et al.*, 1977a).

V této době také vznikají první studie týkající se detekce zvýšených hladin cfDNA u pacientů s onkologickými onemocněními oproti zdravým kontrolám a objevují se první hypotézy o její úloze v rakovinovém metastázování. Při porovnání plazmatických hladin cfDNA pacientů s primárními a metastatickými nádory, byly u druhé skupiny zjištěny výrazně vyšší hladiny cfDNA. Dále pak byla zjištěna korelace mezi hladinou cfDNA v plazmě a progresí onemocnění (Leon *et al.*, 1977b). To, že se jedná o DNA původem z rakovinových buněk, však bylo potvrzeno až experimenty M. Strouna a jeho týmu o dvanáct let později (Stroun *et al.*, 1989).

Dalším důležitým milníkem byl rok 1989, kdy bylo objeveno, že se v krevním séru těhotných žen nachází volná DNA původem z plodu. Na základě tohoto poznatku pak byla vytvořena metoda neinvazivního prenatalního vyšetření (NIPT), čímž byl zároveň odhalen další potenciál cfDNA v molekulární diagnostice (Lo *et al.*, 1989; Lo *et al.*, 1997).

V současné době je tedy na cfDNA nahlíženo jako na perspektivní neinvazivní biomarker v řadě autoimunitních onemocnění, při tekuté biopsii, NIPT a v neposlední řadě při sledování transplantace orgánů. V poslední letech je pozornost zaměřena také na terapeutický a imunomodulační potenciál cfDNA. Současné studie ukazují, že účinky cfDNA v kombinaci s dalšími faktory mohou mít do budoucna zásadní význam v rámci personalizované protinádorové terapie (Sipos *et al.*, 2022). Tyto poznatky jsou však zatím relativně čerstvé a bude potřeba dalších experimentů, které by lépe objasnily vztahy mezi aktivací a inhibicí signálních drah prostřednictvím cfDNA a molekulárními mechanismy zodpovědnými za progresi nebo regresi nádoru. Další možností z hlediska terapie autoimunitních onemocnění je cílená modulace signálních drah spojených s cfDNA.

## 2.2 Struktura cfDNA

Pro komplexní pochopení biologické funkce volné cirkulující DNA v organismu je důležité se nejdříve zabývat samotnou strukturou fragmentů cfDNA, které se mezi sebou liší na základě různých faktorů. Struktura těchto fragmentů pak určuje další osud cfDNA v buňce a zapojení do konkrétních imunologických drah.

Když mluvíme o cfDNA, mluvíme o vysoce fragmentované kyselině deoxyribonukleotidové, která se může uvolňovat také ve formě nukleozomu, a je uvolňována z buňky do tělních tekutin, jako jsou například plazma, mozkomíšní mok, pleurální tekutina, moč, sliny a další (Mouliere *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2021).

### 2.2.1 Velikost fragmentů cfDNA

Jednotlivé fragmenty můžeme dělit podle velikosti, přičemž kratší fragmenty mohou dosahovat délky v rozmezí 45 bp až 1 kbp a delší fragmenty mohou být větší než 10 kbp (Mouliere *et al.*, 2013; Jiang & Lo, 2016; Jahr *et al.*, 2001).

Ačkoli pro velikost těchto fragmentů existuje relativně široké rozpětí, některé vzory spjaté s délkou cfDNA jsou relativně častější než jiné. V tomto ohledu bylo provedeno hned několik studií pomocí různých metod, přičemž byly zjištěny rozdílné výsledky. Ve starší studii z roku 2014 Mouliere a spol. provádí Q-PCR analýzu na základě již zjišťuje, že více než 80 % fragmentů plazmatické cfDNA je kratších než 145 bp (Mouliere *et al.*, 2014). V této studii Mouliere a spol. navazuje na poznatky z předchozích výzkumů, kdy se zabýval kvantifikací různě dlouhých fragmentů cfDNA. Bylo zjištěno, že kratší fragmenty o velikosti 60-100 bp detekovatelného ampliconu cfDNA jsou v porovnání s delšími fragmenty snáze kvantifikovatelné (Mouliere *et al.*, 2011; Mouliere *et al.*, 2013).

Rozpor s tímto zjištěním přinesla studie z roku 2015, ve které se Jing a spol. se svým vědeckým týmem zabývá analýzou velikostních profilů cfDNA pocházející z nádoru pomocí metody masivně paralelního sekvenování. Výsledky ukazují, že pro jadernou cfDNA charakteristická velikost dosahovala výrazného vrcholu zhruba okolo 166 bp (Jiang *et al.*, 2015).

Tato délka a pozorovaná struktura cfDNA odpovídá formě mononukleozomálních jednotek, které jsou ve většině případů uvolňovány z buněk při procesu apoptózy. Mononukleozomy kromě jaderné genetické informace rovněž obsahují i histony, jejichž účel spočívá v ochraně DNA před enzymatickou degradací. Přítomností histonů je také jedním z rozdílů mezi jadernou a mitochondriální DNA (mtDNA). Absence histonů, a tím pádem i větší náchylnost mtDNA k degradaci, je s největší pravděpodobností důvodem, proč byla u mtDNA pozorována menší velikost fragmentů a nižší koncentrace v plazmě v porovnání s jadernou DNA. Mitochondriální cfDNA (mt-cfDNA) tak typicky

dosahuje délky v rozmezí 40-300 bp, přičemž je vysoce obohacena o krátkou cfDNA v rozmezí 30-60 bp (Chandrananda *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016). Z původu fragmentů mt-cfDNA jsou pak odvozeny i specifické modifikace této genetické informace, které hrají důležitou roli v následných interakcích v organismu a specifickém zapojení v imunomodulačních signálních drahách (Meddeb *et al.*, 2019).

Studie zabývající se distribucí velikosti plazmatické DNA u pacientů s rakovinou prokázala, že plazmatická DNA nesoucí aberace asociované s nádorem a pocházející z rakovinových tkání je kratší, než plazmatická DNA pocházející ze zdravých tkání (Jiang, 2015). Obecně však platí, že délka téměř veškeré cfDNA cirkulující v plazmě se pohybuje v intervalu hodnot 120 až 220 bp nebo násobcích těchto hodnot s maximálním vrcholem při 166 a 167 bp (Alcaide *et al.*, 2020; Jiang *et al.*, 2015).

Na základě těchto poznatků tedy můžeme říct, že délka fragmentů je poměrně variabilní a závisí na mnoha faktorech včetně mechanismu, kterým je DNA z buňky uvolněna. Jaderná cfDNA je typicky více fragmentována, pokud k jejímu uvolnění dojde pomocí apoptózy, než je tomu u mechanismu nekrózy. To odpovídá výsledkům některých studií prováděných na nádorových buňkách, které prokázaly, že mechanismus nekrózy produkoval relativně dlouhé fragmenty cfDNA o délce více než 10 kb (Jahr *et al.*, 2001). Naopak již zmíněný mechanismus apoptózy generuje mnohem menší fragmenty z důvodu procesů, při kterých dochází k aktivaci endogenních nukleáz, a chromatin je tak štěpen s mnohem vyšší četností, než je tomu například u nekrózy (Jiang & Lo, 2016; Jahr *et al.*, 2001; Zhivotosky & Orrenius, 2001).

Pro komplexnější přehled je vhodné zmínit i další výsledky studií zabývajících délkou cfDNA, jež byla uvolněna ze specifických příčin. Jedná se například o analýzu plazmatické cfDNA v krvi těhotné ženy, ve které bylo zjištěno, že fetální cfDNA je fragmentovanější než mateřská (Lo & Chan, 2010).

Tyto závěry pak daly impuls pro výzkum rozdílu v distribuci velikosti mezi hematopoeticky a nehematopoeticky odvozenou plazmatickou cfDNA. V případě studie z roku 2011 byla kvantifikována nehematopoeticky derivovaná cfDNA pocházející z transplantované kostní dřeně a solidních orgánů spolu s cfDNA derivovanou z hematopoetické linie příjemce transplantace. Výsledky ukazují, že nehematopoeticky derivovaná cfDNA je kratší a vykazuje odlišný fragmentační vzor než hematopoeticky derivovaná cfDNA (Zheng *et al.*, 2011).

## 2.2.2 Strukturní vlastnosti cfDNA

Některé studie se také zabývají vztahem patologie a mírou četnosti ALU repetice ve fragmentech DNA. ALU repetice jsou DNA elementy, které tvoří až 10 % lidského genomu. Tyto elementy jsou dlouhé zhruba 300 bází a v celém genomu se vyskytují v tisících kopiích. Pravděpodobně se jedná o pozůstatky retrotranspozomů, které se v průběhu evoluce nahromadily v genomu a již nemají žádnou specifickou funkci (shrnuto v Häsler & Strub, 2006). Na jejich struktuře je ovšem zajímavý vysoký

obsah CpG dinukleotidů, které jsou v normálních zdravých tkání metylované, ale v tkáních zasažených rakovinovým bujením nebo autoimunitním onemocněním může dojít k lokální hypometylaci (shrnutí v Deininger & Batzer, 1999). Řada studií již prokázala zvýšené zastoupení ALU sekvencí v plazmě pacientů trpících určitými patologiemi v porovnání se zdravými kontrolami. V tomto ohledu mají ALU repetice potenciál stát se dalším biomarkerem při detekci patologických stavů (Qi *et al.*, 2019; Park *et al.*, 2014).

Dalším strukturním aspektem, který je možné pozorovat v rámci modifikací cfDNA, je stav oxidace. Oxidace cfDNA je zprostředkována vystavením a interakcí s ROS (reaktivní formy kyslíku) a volnými radikály, což se na její strukturu a integritě projeví poškozením. Tento stav je asociován s oxidativním stresem, při kterém dochází k vysoké produkci ROS, jež buňka nedokáže neutralizovat. Nejčastějším poškozením DNA vlivem oxidace bází je oxidativní léze 8-oxo-2'-deoxyguanosin (8-oxo-G) z důvodu nejnižšího jednoelektronového redukčního potenciálu guaninu v rámci všech DNA nukleosidů. Takto oxidovaná cfDNA působí v organismu jako molekula stresového signálu a interaguje s receptory vrozené imunity. Navíc její biologická aktivita, která je spjata se zvýšenými hladinami v plazmě oproti fyziologickým stavům, může podporovat progresi zánětlivých stavů a onemocnění (Alekseeva *et al.*, 2016; West *et al.*, 2011; Burrows & Muller, 1998)

### 2.2.3 Integrita fragmentů cfDNA

Distribuce fragmentů cfDNA o různých délkách má velký význam především z klinického pohledu, jelikož odráží integritu volné DNA. Integrita cfDNA je určována poměrem dlouhého a krátkého PCR produktu amplifikovaného ze stejného lokusu (Kustanovich *et al.*, 2019).

U pacientů trpících rakovinou byla zjištěna zvýšená integrita cfDNA v porovnání se zdravými jedinci. Z výsledků několika studií vyplývá, že zvýšená integrita cirkulující DNA u pacientů, kteří trpí rakovinou, je důsledkem patologických procesů jako je například nekróza, autofágie a mitotická katastrofa (shrnutí v Chan *et al.*, 2008).

## 2.3 Uvolňování cfDNA z buněk

Existuje celá řada příčin, které vedou k uvolnění jaderné nebo mitochondriální DNA do plazmy. Tento jev může být následkem jak fyziologických procesů v organismu, tak i již zmíněných patologických.

Původ cfDNA a způsob, jakým se dostává do plazmy organismu, může mít důležitý vliv na aspekty její struktury, jakými jsou například stav fragmentace (Obr. 1) a metylace. Volnou cirkulující DNA

můžeme dále dělit na endogenní a exogenní dle toho, zda je odvozena z vlastních buněk tkání organismu nebo zda jsou odvozeny od hostitelského mikrobiomu, infekčních agens, plodu nebo potravy (shrnutí v Sipos *et al.*, 2022).

### 2.3.1 Příčiny uvolňování cfDNA

Mezi příčiny uvolnění cfDNA z buněk patří například již zmíněné zánětlivé stavy, fyzické trauma, transplantace, těhotenství nebo rakovina. Nové studie ukazují, že k uvolňování cfDNA přispívá i stáří, psychologický stres, psychiatrická onemocnění, a že se hladina cfDNA může měnit v závislosti na cirkadiálním rytmu (shrnutí v Aucamp *et al.*, 2018; Qi *et al.*, 2020).

### 2.3.2 Mechanismy uvolňování cfDNA

Apoptóza je termín, který označuje programovanou buněčnou smrt a zároveň je jedním z nejčastějších mechanismů uvolňování cfDNA. Typické pro tento mechanismus je štěpení endogenní DNA nukleázou na 160-180 bp násobky nukleozomálních fragmentů. V důsledku apoptózy jsou vytvořena tzv. apoptotická tělíčka, která jsou posléze degradována prostřednictvím fagocytózy. Tento mechanismus je spojen s celou řadou patologických stavů, ale byl popsán jako zdroj cfDNA i v případě zdravých jedinců. (Stroun *et al.*, 2001; shrnutí v Aucamp *et al.*, 2018). To se týká především cfDNA pocházející z hematopoetických buněk (Lui *et al.*, 2002).

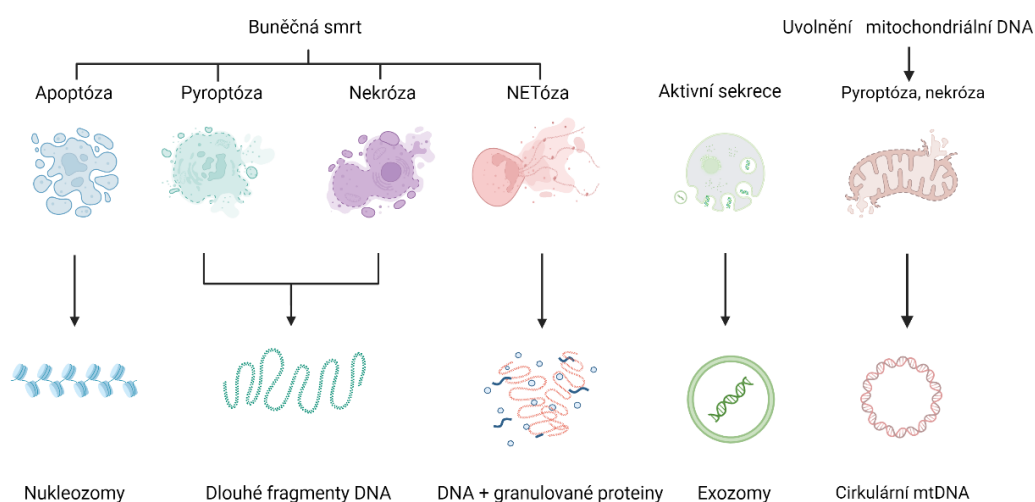
K indukované buněčné smrti patří také pyroptóza, která se vztahuje především k inherentně proinflamatorní kaspázové 1-dependentní programované buněčné smrti v reakci na patogen. Tento mechanismus se vyznačuje tvorbou pórů v buněčné membráně a vylučováním intracelulárního obsahu spolu s prozánětlivými cytokiny jako jsou například IL-1 $\beta$  a IL-18. Póry v membráně jsou tvořené pomocí proteinů, z nichž je nejlépe popsán gastermin D (GSDMD) (Cookson & Brennan, 2001; Liu *et al.*, 2016).

Dalším poměrně významným mechanismem je nekróza, ke které typicky dochází vlivem poškození tkáně a je charakterizována nekontrolovanou buněčnou smrtí. Vzhledem k absenci indukce regulačních mechanismů, které se vyskytují u apoptózy, nedochází k aktivaci endonukleáz a genetická informace uvolněná tímto mechanismem bývá poměrně dlouhá. Tento mechanismus je na rozdíl od apoptózy spojen výhradně s patologickými stavy jako je například rakovinové bujení (shrnutí v Proskuryakov *et al.*, 2003; Aarthy *et al.*, 2015; Jiang & Lo, 2016).

ETóza je mechanismus, který zprostředkovává obrannou imunitní reakci prostřednictvím buněk imunitního systému vylučujících svůj jaderný obsah. Ten je tvořen spolu s genetickou informací ještě granulovanými proteiny. Výsledné fragmenty cfDNA jsou podobné jako u nekrózy zpravidla

makromolekulární. Tento mechanismus byl pozorován u granulocytů i monocytů (Guimarães-Costa *et al.*, 2012; Yousefi *et al.*, 2015; Germic *et al.*, 2021).

Dnes panuje přesvědčení, že největší množství cfDNA je do organismu uvolněno prostřednictvím aktivní sekrece (Lui *et al.*, 2002). Některé studie potvrdily, že tato DNA je nově syntetizována v buňce a posléze aktivně uvolněná ve vezikulách nebo ve formě komplexů, které jsou označeny jako virtosomy (Gaham & Stroun, 2010; Fernando *et al.*, 2017). Uvolnění tímto mechanismem probíhá ze zdravých a diferencujících se buněk. Některé studie předpokládají, že aktivní uvolňování probíhá regulovaně a mohlo by zprostředkovávat intercelulární komunikaci (Gahan, 2013). Tento jev byl by mohl znamenat, že cfDNA asociovaná s proteiny a lipidy dokáže sloužit jako regulátor synchronizace diferenciaci (Aucamp *et al.*, 2018). Dále bylo zjištěno, že vstup nukleozomů do buňky nezávisí na sekvenci cfDNA, na modifikacích DNA a histonů a ani na buněčném typu cílové buňky. To naznačuje, že vstup nukleozomu do buňky je v organismu zcela běžný jev (Wang *et al.*, 2020). Dále bylo prokázáno, že volná DNA je po přijetí další buňkou schopná měnit její biologii a inkorporovat se do genomu, kde následně může indukovat apoptózu, buněčné zlomy a může taktéž fungovat jako dědičný modifikátor genomu (Gaham & Stroun, 2010; Mitra *et al.*, 2015). Studie z roku 2014 poskytuje důkazy pro schopnost rakovinových buněk, rezistentních vůči léčebné terapii, šířit svou kapacitu rezistence na další kompetentní buňky pomocí uvolnění exozomů (Chen *et al.*, 2014). Uvolňování cfDNA mimo jiné napomáhá i šíření metastáz karcinomu (Peters *et al.*, 2011).



**Obr. 1:** Schéma uvolňování cfDNA z buněk do plazmy (vytvořeno pomocí BioRender.com)

### 2.3.3 Clearance cfDNA

Clearance cfDNA je komplexní proces, který pomocí celé řady mechanismů pomáhá degradovat fragmenty volné DNA, aby bylo zamezeno nadměrné interakci se složkami imunitního systému a autoreaktivitě. Degradace probíhá prostřednictvím fagocytózy imunitními buňkami nebo činností DNáz (Stephan *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2020a).

Fyziologicky je v organismu neustále detekovatelná určitá hladina cfDNA. U jedinců, trpících určitým patologickým stavem je tato hladina trvale zvýšena, v důsledku aktivace zánětlivých procesů, které uvolňují velké množství cfDNA, nebo vlivem defektní funkce nukleáz, jež uvolněnou cfDNA nestíhají degradovat. Nahromaděná cfDNA pak v organismu může představovat potenciální induktor zánětu. (Stephan *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2020a).

Volná DNA má v plazmě relativně krátký poločas rozpadu, což se ukázalo jako výhodný faktor z hlediska analýzy cfDNA v rámci poškození a regenerace tkáně v reálném čase. Odhadovaný polorozpad cfDNA v plazmě činí od několika desítek minut až po zhruba dvě hodiny (Moreira *et al.*, 2006). Bylo také zjištěno, že fetální cfDNA je z mateřské krve odbourávána dvoufázovým postupem, přičemž první fáze trvá zhruba deset minut a druhá fáze může trvat až třináct hodin (Yu *et al.*, 2013a).

## 3 Mechanismy účinků cfDNA

Imunitní systém se u mnohobuněčných organismů vyvinul tak, aby byl schopen okamžité reakce na nebezpečí. Tato reakce je zprostředkována signály ve formě molekul označovaných DAMPs (damage associated molecular patterns) a PAMPs (patogen associated molecular patterns), které signalizují endogenní poškození nebo ohrožení organismu patogenem. Souhrnně se tyto molekuly nazývají alarminy a mohou být tedy jak infekčního, tak sterilního endogenního původu. V obou případech specificky interagují s receptory rozpoznávajícími molekulární vzory typické pro nebezpečí (PRR), které jsou exprimované buňkami imunologické i neimunologické povahy na jejich povrchu a v cytosolu, a spouští reakce vrozené imunity, jejichž výsledkem je zánět (Janeway *et al.*, 1989; Matzinger *et al.*, 1994).

V boji vrozeného imunitního systému s patogeny virového a mikrobiálního původu hraje důležitou roli i rozpoznávání nukleové kyseliny patogenního původu, jejíž detekce přes receptory rozpoznávající molekulární vzory (PRR) je klíčová pro indukci antivirové a antimikrobiální imunitní odpovědi. Zatím byly popsány dvě dráhy, které jsou aktivovány po detekci intracelulární DNA. První z těchto drah je asociována s inflamazomem, vede k proteolytické aktivaci cysteinové proteázy kaspázy-1 a je spojena s maturací protizánětlivých cytokinů IL-1 a IL-18 a jejich sekrecí z monocytů. Druhá, tzv. interferon

stimulující dráha (ISD) spočívá v transkripční indukci interferonu (IFN) typu 1 a protizánětlivých genů. Obě dráhy ve svém důsledku vedou k indukci apoptózy virem napadených buněk, buněčné rezistenci vůči virové infekci a stimulaci dalších složek imunitního systému (Hemmi *et al.*, 2000; shrnuto v Takeuchi & Akira, 2007; Fernandes-Alnemri *et al.*, 2009).

Vlivem stresových reakcí může v organismu dojít k uvolnění i tělu vlastní jaderné nebo mitochondriální DNA, která na základě své struktury a specifických modifikací může být příslušnými receptory (PRR) rozpoznána jako DAMP nebo PAMP. V takovém případě pak spouští, stejně jako cizorodá DNA, imunitní zánětlivé reakce, které ve svém konečném důsledku mohou vést až k rozvoji autoimunitních onemocnění (Hauser *et al.*, 2018).

### 3.1 Mitochondriální DNA jako mediátor zánětu

Hladiny mtDNA mohou být oproti normálnímu fyziologickému stavu zvýšeny v případě chronického zánětu, buněčného stárnutí nebo vlivem rakovinového onemocnění (Wu *et al.*, 2022). Kromě toho byla prokázána regulační role mtDNA v intermitochondriální, intracelulární a mezibuněčné komunikaci (Perdas *et al.*, 2019; Picca *et al.*, 2022).

Ve vědecké komunitě dnes na základě fylogenetických analýz panuje obecné přesvědčení, že se mitochondrie vyvinuly z  $\alpha$ -proteobakterií. Vzhledem k podmínkám, ve kterých  $\alpha$ -proteobakterie žily, pro ně byla esenciální schopnost detoxikace molekulárního kyslíku a syntéza molekul ATP. Tyto vlastnosti z nich pak udělaly ideální endosymbioty pro primitivní eukaryota, kterým tak umožnily vyvinout se v mnohobuněčné organismy a přežít v atmosféře bohaté na kyslík. Poté došlo k postupné redukci řady mitochondriálních genů a přesunu velké části genetické informace do jádra (Sagan *et al.*, 1967; Andersson *et al.*, 2003)

Přesto, že v průběhu evoluce mtDNA došlo k významným změnám, strukturní vlastnosti, které jsou charakteristické pro DNA prokaryotického původu, zůstaly zachovány. Jsou jimi například kruhovitý tvar molekuly DNA, vysoká četnost nemetylovaných CpG ostrovů, nepřítomnost histonových proteinů a kódování formylovaných peptidů. To je důvodem, proč organismus může vlastní mtDNA rozeznat jako genetickou informaci bakterie a následně proti ní spustit imunitní reakci (Hauser, 2010a; Fang *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016).

Vlivem poranění nebo stresových podmínek může dojít k uvolnění mitochondriálních DAMP, které zahrnují mtDNA a formylové peptidy. Volná mtDNA zahajuje aktivaci vrozených imunitních drah prostřednictvím signalizace přes několik různých receptorů. Zatím byly nejlépe popsány signální dráhy prostřednictvím Toll-like receptoru 9 (TLR9), inflamazomového komplexu a stimulatorových genů pro interferony tzv. STING (Hauser *et al.*, 2010b; Fang *et al.*, 2015).

Mitochondriální DNA však nehraje ve vrozeném imunitním systému pouze roli DAMP, nýbrž se v posledních letech prokazuje její funkce v zapojení do imunologických drah, čímž dochází k regulaci a aktivaci antivirové a antibakteriální imunitní odpovědi. Navíc bylo zjištěno, že stres, kterými patogeny působí na mitochondrie, vede k uvolnění mtDNA, čímž je v organismu zesílena imunitní reakce na přítomnost oněch patogenů (Kanneganti *et al.*, 2015; Riley *et al.*, 2018).

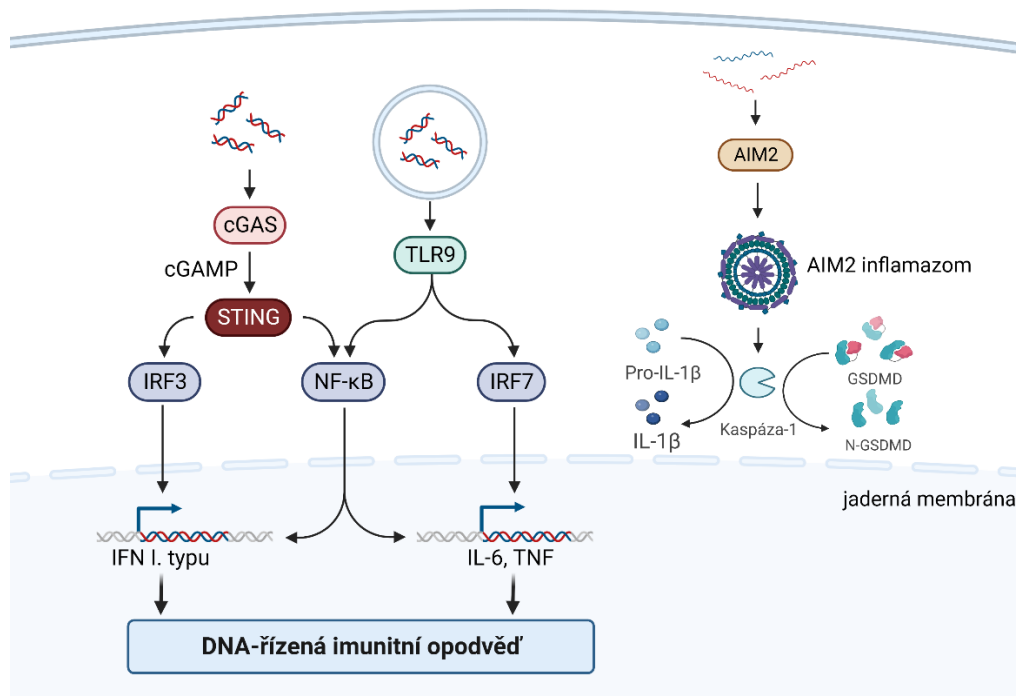
Mitochondrie se podílejí na antivirové imunitě z hlediska detekce virové RNA, která po navázání na cytosolické senzory vrozené imunitní odpovědi vede k aktivaci mitochondriálního antivirového signálního proteinu MAVS, který slouží jako adaptorový protein pro aktivaci interferon (INF) indukující dráhy vedoucí k expresi cytokinů a aktivaci autofágie. Samotná mt-cfDNA se podílí na aktivaci antivirové imunity prostřednictvím aktivace signální dráhy STING-IRF3-INF (Yoneyama *et al.*, 2015; Brubaker *et al.*, 2014).

Co se týče antibakteriální funkce mitochondrií v organismu, už dříve byl velmi dobře popsán mechanismus, kdy mitochondrie výrazně usnadňují antibakteriální imunitu pomocí generování ROS, které se následně zapojují v mechanismech spojených s makrofágy (West *et al.*, 2011). Samotná mtDNA je do tohoto procesu zapojena v rámci tvorby extracelulárních pastí (ET). Schopnost vytvářet ET na bázi mtDNA byla popsána u eozinofilů a bazofilů (Yousefi *et al.*, 2008; Yousefi *et al.*, 2015). Princip tohoto mechanismu spočívá v cíleném vysunutí mtDNA do extracelulárního prostoru, což poté funguje jako ET, tedy pomáhá imobilizaci a zneškodnění mikrobiálních patogenů v reakci na poškození okolní tkáně. Jako pro všechny formy tvorby ET je i pro tento mechanismus esenciální produkce ROS. Na rozdíl od jiných druhů tvorby ET však tento mechanismus nevede k buněčné smrti imunitní buňky po eejkci extracelulární pastí. V extracelulárním prostoru je pak mtDNA asociována s granulovanými proteiny, které vážou a zabíjejí bakterie (Wu *et al.*, 2000; Yousefi *et al.*, 2008; Morshed *et al.*, 2014).

### 3.2 Role PRR v rozpoznávání cfDNA

Z hlediska antivirové imunitní odpovědi je pro organismus klíčová detekce nukleové kyseliny nacházející se v extracelulárním prostředí i prostředí cytosolu pomocí receptorů PRR (Obr. 2). Nás tyto receptory budou zajímat přednostně kvůli jejich schopnosti vázat vlastní cfDNA a tím i jejich podílu na etiologii různorodých onemocnění.

Mechanismus, kterým interaguje cfDNA s TLR9, je známý již nějakou dobu, v posledních letech se ale pozornost zaměřuje i na receptor AIM2 a dráhu cGAS/STING, jejichž patologická role je postupně odhalována (Cox *et al.*, 2015; shrnuto Kumar, 2021).



**Obr. 2:** Základní schéma zapojení cfDNA do signálních drah (vytvořeno v BioRender.com)

### 3.2.1 Receptor TLR

Z hlediska struktury se jedná o integrální membránové glykoproteiny, které jsou charakterizované specifickou transmembránovou a cytosolickou doménou. Transmembránová doména slouží k mikrobiální detekci a je lokalizována směrem do extracelulárního prostoru nebo endozomálního lumen. Tvoří ji  $\beta$ -skládaný list a  $\alpha$ -helix vzájemně propojené smyčkou. Transmembránové domény se skládají z 19-25 tandemových motivů o délce 24-29 aminokyselin, s vysokým obsahem leucinu – LRR (leucine rich repeats). Předpokládá se, že terciální struktura má podkovovitý tvar (Buchanan & Gay, 1996; Akira *et al.*, 2006; shrnuto v Takeuchi & Akira, 2007).

Cytoplazmatická doména se nazývá TIR a vykazuje homologii s cytosolickou doménou receptorů rodiny IL-1 a v rámci receptoru má signální funkci. Doména TIR je složena z tří vysoce konzervovaných oblastí a slouží jako zprostředkovatel protein-proteinových interakcí mezi toll-like receptory a molekulami přenášejícími signál (Bowie & O'Neill, 2000; Ve *et al.*, 2015).

Navázání PAMPs mikrobiálního původu na transmembránovou doménu vede k dimerizaci TLR a pomocí cytoplazmatické domény TIR je následně spuštěna downstream signální dráha, která prostřednictvím několika mediátorů zprostředkovává expresi konkrétních genů (Bowie & O'Neill, 2000). Mezi tyto mediátory patří MyD88 (myeloid differentiation primary response 88), TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ ), IRAKs (IL-1 receptor-associated kinases) (Muzio *et al.*, 2000), TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6) (Hemmi *et al.*, 2000), TRAM (TRIF-related

adapter molecule) a TIRAP (TIR-domain-containing adapter protein) (shrnutí v Takeda & Akira, 2005). Produkty exprimovaných genů poté vstupují do imunitní reakce jako řídicí složky a zapojují se do vývoje antigen-specifické získané imunity (shrnutí v Akira *et al.*, 2006).

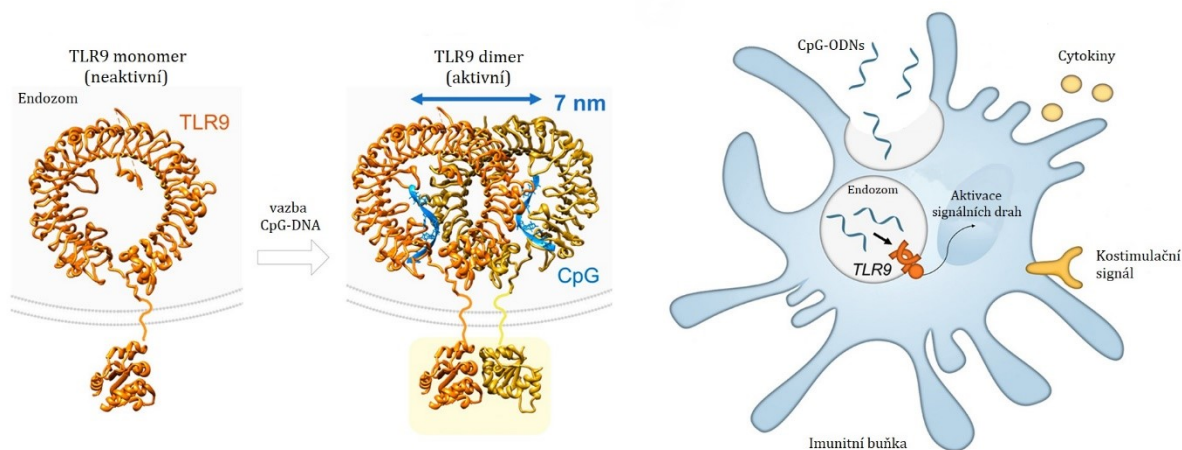
U savců bylo doposud pospáno dvanáct různých receptorů TLR. Receptory můžeme rozlišit na základě jejich primárních sekvencí do několika podrodin, z nichž každá rozpoznává určitý druh PAMP. Nás bude zajímat především TLR 9, který s vysoce příbuznými TLR7 a TLR8 rozpoznává nukleové kyseliny (shrnutí v Akira *et al.*, 2006).

### 3.2.1.1 Receptor TLR9

TLR9 byl prvním receptorem, u kterého bylo prokázáno rozpoznávání hypometylovaných CpG motivů na fragmentech DNA (Hemmi *et al.*, 2000). Spolu s TLR3 a TLR7 je jedním z receptorů, které jsou exprimované výhradně v intracelulárních kompartmentech, konkrétně na vnitřní endozomální membráně. Z této skutečnosti pak vyplývá, že jejich hlavní ligand, kterým je nukleová kyselina, musí být nejdříve internalizován do endozomu, než je možné navázání na receptor a zahájení signalizace (Akira *et al.*, 2006; Fukui *et al.*, 2018).

Struktura receptoru TLR9 je, společně s blízkými příbuznými receptory TLR7 a TLR8, od ostatních skupin TLR receptorů odlišena dlouhou Z-smyčkou, neboli smyčkou vkládání, která se nachází mezi oblastmi LRR14 a LRR15. (Ohto *et al.*, 2015) DNA obsahující motiv cytosin-fosfát-guanin (CpG-DNA), čímž se rozumí i mtDNA, která jej coby bakteriální DNA obsahuje, se váže přímo na TLR9 receptor, který přímo indukuje zánětlivou imunitní odpověď (Latz *et al.*, 2004; Ohto *et al.*, 2015).

V roce 2015 byla provedena krystalografická studie, ve které byla zkoumána molekulární podstata vazby DNA na TLR9. Studie potvrdila funkční význam Z-smyčky v ligand-dependentní oligomerizaci TLR9, ačkoli samotná vazba nukleové kyseliny na receptor na ni závislá není (Ohto *et al.*, 2015). Dále bylo potvrzeno, že se DNA váže do dvou ekvivalentních poloh v rámci receptoru a interaguje s oběma podjednotkami dimeru TLR9 v ohnuté konformaci. DNA tímto způsobem funguje jako spojka mezi dvěma podjednotkami TLR9 (Obr. 3). Při zkoumání afinity CpG-DNA bylo navíc zjištěno, že jednovláknová DNA má k receptoru výrazně vyšší afinitu než dvouvláknová DNA (Ohto *et al.*, 2015).



**Obr. 3:** Vazba CpG-DNA na TLR9 (převzato z Comberlato *et al.*, 2022)

Proteolyticky zpracovaný receptor TLR9 rozeznává především DNA, která obsahuje nemetylovaný dinukleotidový motiv cytosin-fosfát-guanin (CpG). Tyto nemetylované CpG dinukleotidy jsou výrazně zastoupeny ve virovém a bakteriálním genomu oproti genomu obratlovců. Genomová DNA obratlovců obsahuje až dvacetkrát nižší frekvenci CpG dinukleotidů, které jsou navíc ještě z většiny metylované. Z toho vyplývá, že savčí jaderná DNA nemá kvůli metylovaným CpG ostrůvkům tak velkou imunostimulační aktivitu, v porovnání s mikrobiální nebo mitochondriální DNA (Krieg *et al.*, 1995; Hemmi *et al.*, 2000).

Význam přítomnosti CpG pro rozpoznání DNA receptorem TLR9 byl prokázán ve studii z roku 2015, kdy byl motiv CpG v DNA zaměněn za motiv GpC, následkem čehož došlo k výraznému poklesu indukce tvorby dimerů TLR9-DNA (Ohto *et al.*, 2015). Z hlediska imunostimulační aktivity CpG-DNA hraje velkou roli její délka, počet motivů CpG a sekvence, které CpG motiv ohraničují. Základní motiv CpG je tvořen hexamerem s nemetylovaným CpG v centrální části. Na 5'-konci je motiv ohraničen dvěma puriny a na 3'-konci konci dvěma pyrimidiny (Krieg *et al.*, 1995).

Dále bylo zjištěno, že vazebná schopnost DNA je charakterizována také délkou, dimerizačními vlastnostmi fragmentu DNA, a že minimální oligodeoxyribonukleotid, který je potřebný k aktivaci lidského TLR9, musí být ve formě ssDNA o délce minimálně dvacet nukleotidů. Jeho sekvence dále musí obsahovat alespoň dva CpG dinukleotidy oddělené dalšími 6-10 nukleotidy, přičemž prvnímu z CpG motivů předchází 5'-tymidin a na 3' konci fragmentu se nachází prodloužený polytymidinový ocas. V případě fragmentu, který obsahuje pouze jeden motiv CpG, však může být aktivace TLR9 navozena, pokud se v blízkosti vyskytují také krátké oligodeoxynukleotidy obsahující CpG (sODN), které však samy o sobě aktivační schopnost nemají. Struktura sODN je charakterizována sekvencí TCGTT. sODN tak mohou hrát důležitou roli v podpoře rozpoznávání gDNA, která kvůli svému obsahu, až 80 % metylovaných cytosinů v CG nukleotidech, vykazuje nízkou indukční aktivitu lidského

TLR9. Tímto způsobem může být zvýšena aktivace lidského TLR9 pomocí gDNA i při její limitní koncentraci (Pohar *et al.*, 2015; Pohar *et al.*, 2017).

Dalším faktorem modulujícím vazebné schopnosti gDNA na TLR9 je přítomnost proteinů indukujících zakřivení DNA. Mezi tyto proteiny patří například histony H2A, H2C a cytosolický protein skupiny box s vysokou mobilitou (HMGB1), který se spolu s granulinem váže na CpG-DNA a podporuje její interakci s TLR9. Z tohoto vyplývá, že aktivace lidských TLR9 je podmíněna přítomností minimálně dvou CpG motivů a závisí především na sekvenci, délce a zakřivení fragmentu (Jin *et al.*, 2012).

V klidovém stavu se neaktivní receptory TLR9 nacházejí v endoplazmatickém retikulu dendritických buněk a makrofágů. CpG-DNA je nejdříve přesunuta do časných endosomů, odkud je pak transportována do tubulárního lysozomálního kompartmentu. E. Latz se svým týmem objasnil do té doby neznámý mechanismus buněčné aktivace, při kterém dochází k redistribuci TLR9 z endoplazmatického retikula do struktur s vysokým výskytem a vychytáváním CpG-DNA. V těchto místech je pak zahájena transdukce signální dráhy (Latz *et al.*, 2004).

Ve studiích zabývajících se zánětlivými účinky mtDNA při indukci signalizace přes receptory TLR9 bylo zjištěno, že zvýšení mtDNA v krvi vede k aktivaci neutrofilů a zahájení signalizace zahrnující nukleárního faktoru kappaB (NFκB) (Zhang *et al.*, 2014), což má za následek zvýšení exprese prozánětlivých cytokinů jako jsou například tumor nekrotizující faktor-α (TNF-α) a interleukin IL-1β (Yu *et al.*, 2013b).

Signální dráhy TLR jsou úzce spjaty s několika endogenními negativními regulátory, které pomocí různých mechanismů regulují ukončení signalizace a udržení imunitní homeostázy. Dysregulace v těchto mechanismech, které chrání organismus před přehnanou imunitní odpovědí a zánětlivou signalizací, může ve svém konečném důsledku vést k rozvoji celé řady patogenezí (shrnuto v Kumar, 2020)

### 3.2.2 Signální dráha cGAS/STING

Po objasnění mechanismu stimulace signálních drah vedoucích k produkci IFN-1 přes TLR9 v endozomu, zůstával nějakou dobu stále záhadou mechanismus, jakým cfDNA indukuje imunitní odpověď v prostředí cytosolu. V roce 2012 byla provedena studie, díky které byl objasněn tento dosud neznámý mechanismus detekce volné cytoplazmatické DNA prostřednictvím signální dráhy cGAS/STING (Sun *et al.*, 2012).

cGAS (cyklická GMP-AMP syntáza) je cytosolický senzor, který se vyvinul tak, aby byl schopen detekovat především dvouvláknovou nukleovou kyselinu, nejčastěji původem z dsDNA virů a retrovirů, a následně pak indukoval antivirovou imunitní odpověď. Může se na něj však vázat i vlastní

cfDNA, která byla uvolněna do cytosolu z jádra či mitochondrií (Sun *et al.*, 2012; Ma & Damania, 2016).

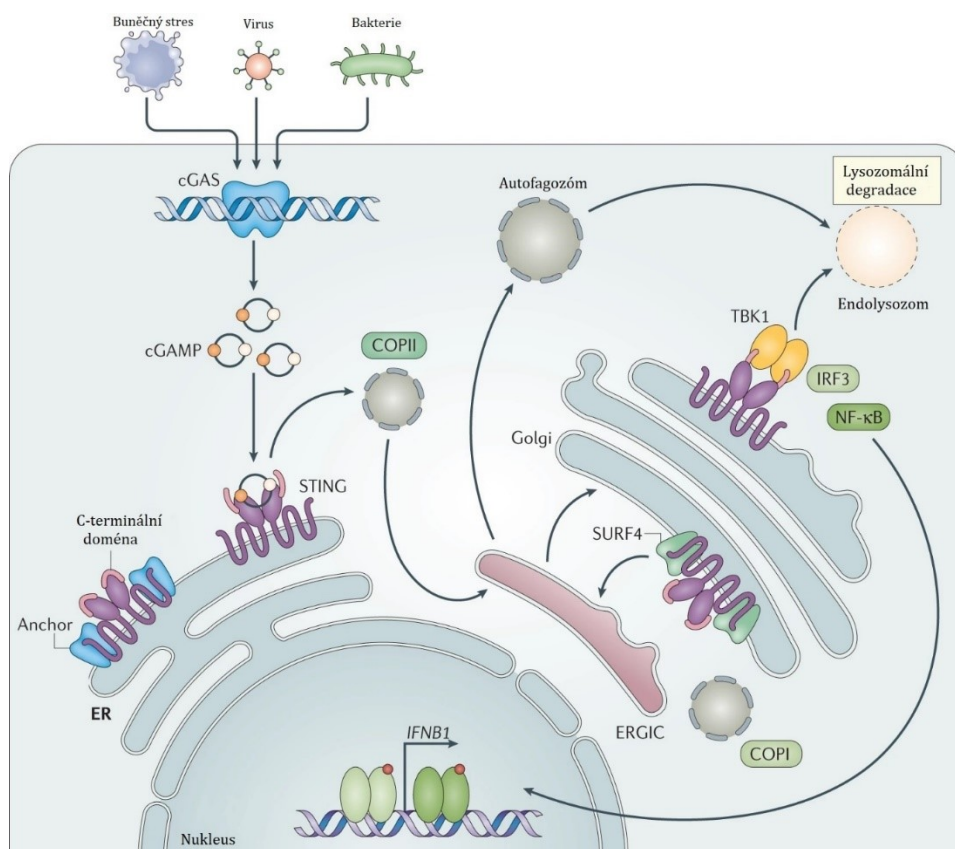
V buňce se tento receptor vyskytuje ve třech formách, které zahrnují cGAS vázaný na buněčné membráně, v jádře a volně plovoucí v cytosolu (Sun *et al.*, 2021). Bylo zjištěno, že nejvíce zastoupenou formou cGAS je ta, ve které existuje jako na jadernou membránu navázaný jaderný protein. Pro potlačení vazby vlastní chromatinové DNA na jaderný cGAS je nezbytný cGAS tethering neboli těsné navázání na jadernou membránu. Tento stav je klíčový, neboť brání rozvoji autozánětlivých stavů a vzniku autoimunitních onemocnění (Volkman *et al.*, 2019; Boyer *et al.*, 2020).

Na plazmatickou membránu se cGAS váže prostřednictvím své N-terminální domény rozpoznávající fosfoinositidy. Tato vazba, stejně jako v jádře, hraje roli v omezení interakce s vlastní cytosolickou DNA, která by mohla vyústit v autoimunitní reakce (Barnett *et al.*, 2019). Na základě různého poměru distribuce forem cGAS mezi plazmatickou membránou a cytoelem je možné se domnívat, že existuje něco jako kontextově specifická regulace distribuce forem cGAS v buněčném prostředí (Strzyz, 2019; Barnett *et al.*, 2019).

Mechanismus signální dráhy spočívá v detekci cytoplazmatické nukleové kyseliny senzorem cGAS, který spouští složitou kaskádu interakcí a indukci exprese prozánětlivých interferonů (Wang *et al.*, 2020). cGAS je cyklická GMP-AMP (cGAMP) syntáza, která přímo váže DNA a tím katalyzuje produkci cGAMP. Produkované cGAMP dále hraje roli druhého posla a váže se na stimulator interferonových genů (STING), čímž ho aktivuje. Aktivovaný STING poté indukuje downstream signální dráhy včetně dráhy kinázy TBK1, což vede k aktivaci transkripčních faktorů zahrnujících interferon regulující faktor (IRF) 3 a nukleární faktor-kappa B (NF- $\kappa$ B). Tyto transkripční faktory vstupují do jádra, kde následně aktivují expresi konkrétních genů, čímž je spuštěna produkce interferonů IFN- $\beta$  nebo IFN typu 1 a zároveň je indukována i antivirová a antibakteriální imunitní odpověď (Obr. 4). Aktivovaný STING se také zapojuje do aktivace dalších imunitních buněk, jako jsou T-lymfocyty a NK buňky (Wu *et al.*, 2013; Larkin *et al.*, 2017).

V několika studiích bylo prokázáno, že dráha cGAS/STING má, kromě indukce interferonů, klíčový význam i při spouštění autofágie (Obr. 4). Aktivovaný STING se totiž spolu s aktivací IRF3-dependentní produkce IFN typu 1 účastní i signalizace v drahách, které zahrnují také NF- $\kappa$ B, MAP kinázy (MAPK) a STAT6a. Tyto mediátory a transkripční faktory hrají důležitou roli v tvorbě autofagozómů po rozpoznání cytosolické dsDNA (shrnuto v Múzes *et al.*, 2022). Tento poznatek také dokazuje spojitost mezi přítomností cfDNA v cytosolu a spouštěním autofágie. Hlavním účelem takto navozené autofágie je eliminace cfDNA, která by svojí přítomností v buňce mohla zapříčinit autozánětlivé stavy v důsledku trvalé imunitní stimulace. Celý tento proces je řízen autofágickým proteinem Beclin-1, což je klíčový regulátor autofágie a tedy i buněčných procesů zodpovědných za degradaci a recyklaci buněčných komponent. Ukázalo se, že aktivovaný Beclin-1 interaguje jak

s receptorem cGAS, tak i s proteinem STING. Důsledkem interakce s cGAS je snížení produkce cGAMP, což vede k poklesu hladiny prozánětlivých cytokinů a interferonu I (Liang *et al.*, 2014).



**Obr. 4:** Přehled signální dráhy cGAS/STING (převzato z Decout *et al.*, 2021)

Existují i další způsoby regulace této signální dráhy. Jeden z nich závisí na mechanismu regulace intracelulárního váčkového transportu pomocí proteinu COPA. Po navázání cGAS na STING dochází k translokaci STING do endoplazmatického retikula - Golgiho intermediárního kompartmentu (ERGIC) a Golgi, přičemž je tento mechanismus závislý mimo jiné i na aktivitě GTPázy COP-II. Tento krok se ukázal jako důležitý zdroj lipidace proteinu 1A/1B-lehkého řetězce 3 spojeného s mikrotubuly v procesu biogeneze autofagozómů, což má také klíčový význam pro clearance volné DNA v cytosolu (Gui *et al.*, 2019).

Z hlediska imunitní homeostázy je nezbytná negativní regulace, která zamezuje nadměrnému zánětu v důsledku trvalé stimulace dráhy cGAS/STING. V tomto ohledu má velký význam degradace STING po ukončení signalizace. Degradace STING je realizována pomocí proteazomální dráhy. Konkrétně je za tento proces zodpovědná E3 ubiquitin ligáza TRIM56, která zprostředkovává lysin 63-vázanou polyubikvitinaci STING (Tsuchida *et al.*, 2010). STING může být degradován i pomocí autofágie zprostředkované faktorem p62/SQSTM1 fosforylovaným prostřednictvím TBK1, což vede k řízené

translokaci ubikvitovaného STING do autofagozómů. Bylo zjištěno, že deficit p62 vede k neschopnosti buňky degradovat STING, což má za následek nadměrnou produkci INF-1 a zánětlivých cytokinů (Prabakaran *et al.*, 2018).

Receptor cGAS optimálně rozpoznává lineární dsDNA o minimální délce 20 a více bp, bez ohledu na její primární sekvenci. Receptor může rozpoznávat i DNA kratší než 20 bp, ta ale nedokáže vyvolat dimerizaci cGAS a tím aktivovat tuto signální dráhu (shrnuto v Yu & Liu, 2021).

Dále bylo zjištěno, že receptory cGAS vykazují vyšší vazebnou afinitu pro nukleozomy, které obsahují histony, ve srovnání s dvouvláknovou DNA bez histonů. Avšak ukázalo se, že účinnost při aktivaci této signální dráhy pomocí nukleozomů a následné produkci prozánětlivých cytokinů IL-6, IL-8, TNF a interferonů první třídy je nižší v porovnání s dsDNA bez histonů. I přes nižší aktivační potenciál je tohle stále jeden ze způsobů, jak se organismu vlastní cfDNA může podílet na produkci určité hladiny prozánětlivých cytokinů a tvorby autofagozómů (Wang *et al.*, 2020).

Detekce nukleové kyseliny závisí kromě délky také na jejím tvaru a mechanické flexibilitě, která je charakterizována i sekvencí a poškozením: rozpoznání DNA dlouhé až 200 bp může být stimulováno zakřivením pomocí mitochondriálního transkripčního faktoru A (TFAM) a proteinem HMGB1 (Andreeva *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2022a).

### 3.2.3 Receptor AIM2

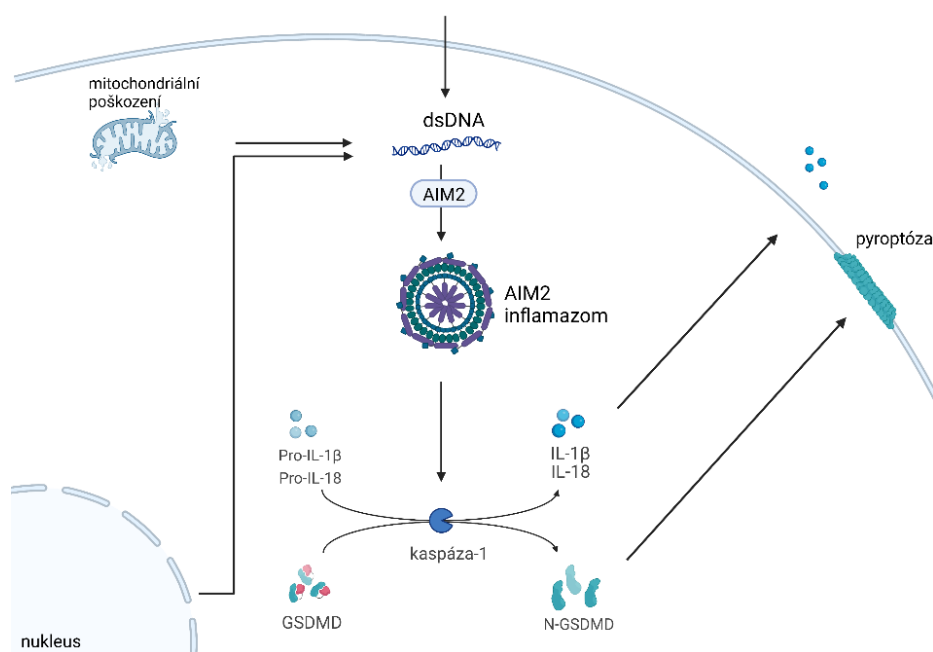
Receptory patřící do rodiny AIM2-like receptorů (ALRs) jsou cytosolické senzory spouštějící vrozené imunitní signalizační dráhy v reakci na detekci dsDNA různého původu. Lidské ALRs jsou kódovány čtyřmi geny nacházejícími se na prvním chromozomu – *AIM2*, *IFI16*, *MNDA* a *PYHINI* (Bürckstümmer *et al.*, 2009; Fernandes-Alnemri *et al.*, 2009).

Nás bude z hlediska rozpoznání a vazby vlastní cfDNA zajímat receptor AIM2 (Absent in melanoma 2), který na základě detekce DNA aktivuje tvorbu inflamazomu (Kerur *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2021). Receptor detekuje DNA dvoušroubovici bez bližší specifity, což dělá z cfDNA nacházející se v cytosolu v důsledku narušení integrity mitochondrií, jaderného obalu (Di Micco *et al.*, 2016) či přijetí exozomu s organismu vlastní genetickou informací (Lian *et al.*, 2017) ideální ligand.

O receptoru AIM2 je také známo, že dokáže heterodimerizovat s faktorem p202, který jako jediný z faktorů HIN-200 neobsahuje N-koncovou pyrinovou doménu (Choubey *et al.*, 2000). V několika studiích byla následně popsána role p202 jako inhibitoru aktivace kaspáz, která je následkem vazby dsDNA na receptor AIM2. Kromě toho výsledky naznačují podíl faktoru p202 na fenotypu systémového lupusu vlivem modifikace odpovědi na cfDNA (Roberts *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2014).

Vazba dsDNA na receptory AIM2 závisí na rozdíl od TLR9 výlučně na délce dané nukleové kyseliny. Optimální délka cfDNA pro vazbu na AIM2 je v rozmezí 80-300 bp. Délka DNA je také přímo úměrná

aktivaci a velikosti imunitní odezvy (Jin *et al.*, 2012; Morrone *et al.*, 2015). Poté, co je cfDNA rozpoznána HIN doménou AIM2, pyrinová doména AIM2 interaguje s PYD doménou inflamazomu ASC. ASC obsahuje na C-konci kaspázu rekrutující doménu (CARD), která interaguje s pro-kaspázou-1. Tato interakce dává vznik inflamazomovému komplexu, který následně štěpí prokaspázu-1 (pro-CAP1) na kaspázu-1 (CASP1). Takto vzniklá kaspáza štěpí prozánětlivé procytokiny do jejich aktivní formy a ty jsou poté uvolňovány jako IL-1 $\beta$  and IL-18. Celý proces tvorby inflamazomu zároveň indukuje proces buněčné smrti (Obr. 5) (Fernandes-Alnemri *et al.*, 2007; shrnuto v Kumari, 2020).



**Obr. 5:** Základní schéma zapojení cfDNA do signálních drah prostřednictvím AIM2 (vytvořeno v BioRender.com)

Dále bylo zjištěno, že aktivace signální dráhy prostřednictvím receptoru AIM2 slouží jako endogenní negativní regulátor GAS/STING dráhy. Při stimulaci této dráhy totiž dochází k indukci gasterminu D pomocí kaspázy, čímž je indukována tvorba pórů a pyroptóza (Obr. 5). Ve studii z roku 2018 bylo zjištěno, že takto aktivovaný gastermin D potlačuje odpověď interferonu I, který vzniká v důsledku signalizace dráhy cGAS/STING po detekci cytosolické DNA (Banerjee *et al.*, 2018).

### 3.3 Role cfDNA v imunomodulačních a zánětlivých procesech

Volná cirkulující DNA má potenciál vyvolávat zánět svým působením na receptory zapojené v imunologických drahách. Dlouhodobě zvýšená cfDNA a s ní spojený zánět je významným faktorem v celé řadě patogenezi včetně chronických imunologických onemocnění.

### 3.3.1 Imunomodulační role receptoru TLR

Role TLR receptorů byla prokázána v patogenezi řady autoimunitních revmatických onemocnění, jako je například systémový lupus erythematoses (SLE) nebo revmatoidní artritida (RA). Tato onemocnění jsou definována specifickými protilátkovými vzory a vyznačují se ztrátou tolerance B-lymfocytů. U pacientů trpících některým z této skupiny onemocnění tak byly detekovány protilátky proti vlastní RNA a DNA, které vznikají při stimulaci přes B-buněčné receptory (BCR) v B-lymfocytech spolu s aktivací signalizace přes receptory TLR (Fischer, 2018; shrnuto v Fillatreau, 2021).

Konkrétně ve studii zabývající se mechanismem vzniku SLE byla zkoumána role receptorů TLR7, TLR8 a TLR9. Bylo zjištěno, že receptory TLR7 hrají roli v řízení reakcí extrafolikulárního a germinálního centra, což je spojeno s aktivací autoreaktivních B-lymfocytů. Z tohoto hlediska se TLR7 ukazuje jako kritický faktor při rozvoji SLE. Roli v tomto onemocnění hrají také receptory TLR8 a TLR9, ačkoli jejich úloha se zdá být spíše prospěšná a jejich signalizace přispívá k útlumu produkce prozánětlivých cytokinů a klinických projevů SLE. Výsledky studie K. Nündela popisují antagonistické role TLR9 a TLR7 v signalizaci při rozvoji SLE, přesný mechanismus však nebyl dosud objasněn. Tato skutečnost by mohla mít souvislost s odlišnými typy autoantigenů, které jednotlivé receptory rozpoznávají (Nündel *et al.*, 2015).

Receptory TLR9 jsou exprimovány celou řadou buněčných typů. Detekce cfDNA jednotlivými typy buněk se může výrazně lišit z hlediska dopadů na organismus. Například ve studii z roku 2020 byla prokázána úloha aktivace krevních destiček skrz receptory TLR9 po vazbě virové DNA (Banerjee *et al.*, 2020). Aktivované krevní destičky hrají v organismu významnou roli v koagulačních a zánětlivých procesech a podle nových zjištění i v endocytóze virových částic. Tyto poznatky jsou v souladu s výsledky studie, kdy bylo pozorováno, že krevní destičky byly aktivovány přímo v blízkosti nekrotických buněk při akutním poškození ledvin (Jansen *et al.*, 2017). Tento jev by mohl být vysvětlen uvolněním cfDNA mechanismem nekrózy a následným navázáním a aktivací receptorů TLR9, které jsou exprimovány krevními destičkami. Kromě toho bylo zjištěno, že aktivita krevních destiček stimuluje nekrózu a tvorbu extracelulárních pastí neutrofilů, čímž se opět uvolňuje velké množství další cfDNA. Samotné neutrofilie také exprimují TLR9, čímž mohou po navázání cfDNA taktéž podpořit proces NETózy. Zánětlivá role cfDNA uvolněné tímto způsobem byla zjištěna u poškození srdečního endotelu (Paunel-Görgülü *et al.*, 2017) a při zhoršení akutního poškození ledvin (Jansen *et al.*, 2017).

Celá řada studií dává do souvislosti detekci vlastní cfDNA prostřednictvím receptoru TLR9 se vznikem aterosklerózy. Bylo například zjištěno, že infuze angiotensinu II zvyšuje hladinu endogenní cfDNA a ta je posléze rozeznávána TLR9, což má za následek také zvýšení hladiny prozánětlivých cytokinů zodpovědných za rozvoj aterosklerózy v aortě. Na stavu celkového zánětu vyvolaného TLR9 se dále podílí apolipoprotein E (ApoE), který se zapojuje do regulace dráhy p38MAPK (Fukuda *et al.*, 2019). V nedávné studii zkoumající vliv elektronických cigaret byly jako následek jejich užívání

zjištěny zvýšené hladiny cf-mtDNA v plazmě. Tato mt-cfDNA je rozpoznávána TLR9, v důsledku čehož je zvýšena exprese tohoto receptoru na povrchu imunitních buněk. Tímto mechanismem vzniká imunologická smyčka, která je zodpovědná za celkové zvýšení produkce zánětlivých cytokinů přispívajících ke vzniku aterosklerózy (Li *et al.*, 2021b).

Působení cfDNA na receptory TLR9 mimo jiné hraje důležitou roli i v etiologii obezity spojené s inzulinovou rezistencí. Hladiny cfDNA se u jedinců s viscerální obezitou zvyšují, čímž se aktivují receptory TLR9 a zároveň se zvyšuje i akumulace prozánětlivých M1 makrofágů v tukových tkáních (Hong *et al.*, 2015). Chronický stres způsobený nadměrnou výživou pak hraje roli v uvolňování mt-cfDNA. Volná mtDNA prostřednictvím nadměrné aktivace receptorů TLR9 zasahuje kromě rozvoje obezity i do etiologie metabolické dysfunkce asociované se ztučněním jater a nealkoholického ztučnění jater. (shrnutí Shepard, 2020).

### 3.3.2 Imunomodulační role signální dráhy cGAS/STING

Ve studiích z posledních let se ukazuje, že v patogenezi autoimunitních a chronickým zánětem vyvolaných onemocnění hraje důležitou roli zapojení mitochondriální cfDNA do imunomodulačních drah. Kromě toho byla volná cirkulující mtDNA identifikována také jako faktor vzniku obezity, která je důsledkem interakce této mt-cfDNA v signální dráze cGAS/STING při dietě s vysokým obsahem tuků (Lood *et al.*, 2016; Bai *et al.*, 2020).

Z adipocytů je vlivem mitochondriálního stresu uvolňována mtDNA, která je následně ihned rozpoznána senzorem cGAS a indukuje aktivaci STING. To má za následek aktivaci fosfodiesterázy, která svým účinkem snižuje hladiny cAMP a inhibuje signalizaci proteinkinázy A (PKA), což vede k celkovému útlumu termogeneze (Bai *et al.*, 2020). Mitochondriální cfDNA může tuto dráhu stimulovat také v endoteliálních buňkách, pokud jedinec přijímá potravu s vysokým obsahem kyseliny palmitové. Indukce dráhy cGAS/STING v tomto případě vede k zánětu tukové tkáně ústí v obezitu, inzulinovou rezistenci a glukózovou toleranci (Bai *et al.*, 2017; Mao *et al.*, 2017; Yuan *et al.*, 2017).

Uvolňování mtDNA může být dále indukováno intracelulárním lipopolysacharidem (LPS), který se běžně nachází ve vnější membráně gramnegativních bakterií. Uvolnění tímto mechanismem je závislé na kaspáze-11 a Gasderminu D, jejichž vzájemnou interakcí dochází k tvorbě pórů v mitochondriální membráně, čímž je následně spuštěna pyroptická buněčná smrt. Takto uvolněná mtDNA aktivuje signální dráhu cGAS/STING a inhibuje transkripční regulátor YAP (yes-associated protein), který je zodpovědný za řízení buněčné proliferace. V důsledku toho dochází k potlačení proliferace a vaskulární opravy po zánětlivém poškození (Huang *et al.*, 2020).

Kromě toho oxidovaná mtDNA, která je vypuštěna do extracelulárního prostoru společně s extracelulárními pastmi z neutrofilů (NET), může svou stimulací drah cGAS/STING přispívat

k rozvoji onemocnění podobným lupusu. Její role byla dále potvrzena při rozvoji familiární laterální sklerózy (ASL) a chronických zánětlivých procesů, vedoucích k rozvoji autoimunitních a autozánětlivých onemocnění (Lood *et al.*, 2016; shrnuto v Kumar, 2019). Mezi další onemocnění vyvolané sterilním zánětem, který je asociován se zapojením cfDNA do cGAS/STING signální dráhy, patří ataxie-telangiektázie (Aguado *et al.*, 2021), frontotemporální demence (Elzinga *et al.*, 2022), Bloomův syndrom (Gratia *et al.*, 2019) a Huntingtonova choroba (Sharma *et al.*, 2020).

Bylo zjištěno, že také STING hraje klíčovou úlohu v patogenezi SLE. STING, který je aktivován v návaznosti na detekci cfDNA, indukuje aktivaci tyrosin kinázy LYN, která stimuluje konvenční maturaci v dendritických buňkách a diferenciaci plazmocytoidních dendritických buněk – lidských monocytů. Nadměrná indukce této dráhy vede u pacientů se SLE ke zvýšené produkci interferonu I ve srovnání se zdravou kontrolou (Thim-Uam *et al.*, 2020). V procesu rozvoje SLE hraje roli i oxidovaná mtDNA, která je uvolněná prostřednictvím NETózy (Tumurkguu *et al.*, 2020). Ta pak stimuluje dráhu cGAS/STING, čímž se zvyšuje systémový zánět v těle a zároveň tak přispívá ke zhoršení klinických příznaků tohoto onemocnění (Lood *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2018). Dalším faktorem, který je zapojen do rozvoje SLE, je intracelulární regulátor signalizace zprostředkované proteinem STING ve formě konzervovaného transmembránového proteinu TMEM203. Tento protein interaguje se STING a společně pak migrují a spolupracují při aktivaci kinázy TBK1 a transkripčního faktoru IRF3, což vede k indukcí cílových genů v makrofázích (Li *et al.*, 2019). Kromě toho se ukázalo, že deficientní TMEM203 vedl k inhibici STING. U pacientů s onemocněním SLE byla detekována výrazně vyšší hladina TMEM203 v T-lymfocytech v porovnání se zdravou kontrolou (Li *et al.*, 2019). Všechny tyto poznatky poukazují na komplexní úlohu této signalizační dráhy v etiologii SLE a zároveň podporují její roli potenciálního imunomodulačního cíle v terapii.

Kromě autoimunitních revmatických onemocnění je hyperstimulace cGAS/STING spojena i se vznikem monogenních zánětlivých onemocnění. Ta vznikají v důsledku deficitu endonukleázy TREX, která patří mezi funkční DNázy II. Její úloha spočívá v degradaci dsDNA, čímž negativně reguluje aktivaci dráhy cGAS/STING (Zhou *et al.*, 2022). Při poškození tohoto regulačního mechanismu dochází k akumulaci cytosolické DNA a tím pádem je dráha cGAS/STING nepřiměřeně aktivována, což je spojeno se zvýšenými hladinami interferonu I. Tento stav může vést až k rozvoji těžké autoimunity (Gao *et al.*, 2015). Do skupiny monogenních zánětlivých onemocnění patří například Aicardi-Goutièresův syndrom (Crow *et al.*, 2006), familiární lupus omrzlin a retinální vaskulopatie s cerebrální leukodystrofií (shrnuto v Zhou *et al.*, 2022).

Souvislost s aktivací signálních drah cGAS/STING byla dále detekována i u onemocnění neurologické povahy, jakými jsou například cerebrální ischemie nebo mrtvice. V tomto případě vedlo buněčné poškození nervové tkáně k uvolňování velkého množství cfDNA, které se následně zapojovalo do imunitních signálních drah, čímž byl vyvolán další zánět (Li *et al.*, 2020b).

### 3.3.3 Imunomodulační role receptoru AIM2

Úloha AIM2 v imunomodulačních procesech byla za posledních několik let popsána již v celé řadě studií. Bylo zjištěno, že interakce cfDNA s receptorem AIM2 může taktéž hrát roli v rozvoji autoimunitních revmatických onemocnění. Konkrétně byla zvýšená exprese AIM2 popsána v etiologii onemocnění jako RA, SLE, Sjögrenův syndrom, atopická kontaktní dermatitida a psoriáza (shrnutí v Wang *et al.*, 2022b; Zhu *et al.*, 2021).

Trvalá stimulace tohoto receptoru vyvolaná zvýšenou hladinou cfDNA vede k chronickému zánětu v různých orgánech jako jsou například játra (Kim *et al.*, 2014), ledviny (shrnutí v Anders, 2016) nebo klouby u pacientů s polyartritidou (Jakobs *et al.*, 2015). Ve studii zkoumající vliv zvýšené aktivity AIM2 v Kupfferových buňkách na poškození jater byla prokázána úloha cfDNA v rozvoji ischemicko-perfúzní hepatitidy spolu s chronickými záněty jater (Kim *et al.*, 2014). U poškození ledvinových tubulů při chronickém ischemicko-perfúzním poškození ledvin byl zánět zprostředkován aktivací AIM2 inflamazomem v makrofázích. Takto vyvolané dlouhodobě zánětlivé stavy vedou k indukci trvalého poškození tkáně (Komada *et al.*, 2018).

Souvislost mezi působením cfDNA na receptor AIM2 a rozvojem patologie byla nalezena i v rámci onemocnění nervové soustavy. Bylo zjištěno, že trvalá aktivace AIM2 v nervových buňkách vyvolává jejich apoptózu a pyroptózu, což přispívá k ischemickému poranění mozku a mozkovému ischemicko-perfúznímu poranění mozku (Poh *et al.*, 2021).

Stejně jako dráhy TLR9 a cGAS/STING, také AIM2 se svou aktivitou podílí na vzniku aterosklerózy (Fidler *et al.*, 2021). Výsledky studie z roku 2020 taktéž podporují úlohu AIM2 při vzniku aneurysmatu břišní aorty (Worthmann *et al.*, 2020).

## 3.4 Úloha cfDNA v molekulárních mechanismech rakoviny

Volná cirkulující DNA se zapojuje i do molekulárních drah úzce spojených s regulací mikroprostředí nádoru. Řada studií již potvrdila zvýšenou hladinu cfDNA v mnoha typech nádorů a popsala interakci cfDNA v signálních drahách s již zmíněnými receptory. Ty mohou mít jak tumorigenizující tak tumorsupresivní účinky. Významným zdrojem plazmatické cfDNA, která moduluje tumorové procesy, je kromě nekrózy také vylučování v rámci NET.

Volná DNA může hrát značnou roli i při rakovinovém metastázování prostřednictvím transformace iniciovaných buněk. V roce 1999 byla poprvé navržena hypotéza genometastáze, která poukazovala na to, že nádorová cfDNA obsahující dominantní onkogeny by mohla transformovat kompetentní buňky orgánů vzdálených od karcinomu a tím podporovat metastázování nádorů (García-Olmo *et al.*, 1999; Aarthy *et al.*, 2015). K horizontálnímu přenosu genetické informace může dojít prostřednictvím příjmu

cfDNA v apoptotických těliscích nebo virtosomech pomocí fagocytózy. Takto přijatá cfDNA je schopna transformace genomu hostitelské buňky (Aarthy *et al.*, 2015).

### 3.4.1 Neutrofilní extracelulární pasti (NET)

Klíčovou roli v metastázování a celkové imunoeditaci při interakci karcinomu s imunitním systémem zprostředkovávají NET. Úloha NET by měla být primárně protinádorového charakteru, ačkoli existuje množství důkazů, že NET mají i tumorigenezivní účinek a podílejí se na obnovení aktivity rakovinových buněk, což má za důsledek relaps nádoru, nekontrolovatelnou proliferaci a metastázování. Rakovinové buňky dokážou ovlivnit neutrofile, které následně do mikroprostředí nádoru uvolňují svoje NET. Takto uvolněné NET následně hrají klíčovou roli v regulaci sekrece matrixových metaloproteináz a prozánětlivých cytokinů, čímž podporují migraci a invazivitu nádoru. Aspekt invazivity je ovlivněn především schopností NET indukovat přeměnu epitelu na mezenchym v nádorových buňkách. Kromě toho mohou NET podporovat šíření nádoru prostřednictvím indukce angiogeneze a fyzické blokace T-buněk snažících se proniknout do mikroprostředí nádoru (Schedel *et al.*, 2020; Demkow *et al.*, 2021).

Jednou ze složek NET je i protein HMGB1, který podporuje vazbu DNA na receptor TLR9, čímž aktivuje signální dráhy v rakovinových buňkách. Protein HMGB1 interaguje i s receptorem TLR4, tím indukuje tvorbu NET a podporuje nádorovou transmigraci. TLR4 spouští signální aktivaci drah p38 MAPK/ERK a výrazně přispívá ke zvýšenému uvolňování zánětlivých cytokinů (shrnuto v Demkow *et al.*, 2021; Tadie *et al.*, 2013; Schedel *et al.*, 2020).

### 3.4.2 Úloha TLR9 v molekulárních mechanismech rakoviny

Biologická role cfDNA působící přes receptory TLR9 byla zaznamenána u celé řady karcinomů. Ve studii z roku 2018 byla objasněna signální úloha receptoru TLR9 aktivovaného vazbou cfDNA v proliferaci nádorových buněk kolorektálního karcinomu (CRC). Tato signální dráha se v rakovinovém bujení uplatnila především z hlediska usnadnění migrace a invaze dalších buněk. Vazba cfDNA původem z nádorových buněk na receptor TLR9 spustila downstream signální dráhu zahrnující adaptorový protein MyD88, jehož aktivita indukovala uvolnění chemokinu interleukinu 8 (IL-8) v CRC. V této studii bylo také zjištěno, že buňky, které na svém povrchu exprimují receptor TLR9, po ošetření cfDNA zvýšily své proliferační schopnosti (Niu *et al.*, 2018).

Mezi další druhy karcinomů, do jejichž molekulární podstaty je prokazatelně zapojen receptor TLR9, patří například rakovina prsu (Shi *et al.*, 2020), rakovina prostaty (Zhao *et al.*, 2014), rakovina plic (Bauer *et al.*, 2017), rakovina ovarií (Woezfeld *et al.*, 2018) a melanomy (Burns & Yusuf, 2014). Některé studie, které se zabývaly výzkumem těchto karcinomů, naznačily, že tumorová cfDNA je

uvolňována z buněk pomocí mechanismu aktivní sekrece, ne však výlučně prostřednictvím exozomů. Biologická funkce takto přijaté cfDNA byla prokázána v proliferaci buněk prsního karcinomu (Shi *et al.*, 2020).

Řada studií se také zabývá molekulární podstatou propojení signalizační dráhy TLR9 s regulací autofágie. Bylo potvrzeno, že autofágie má značný podíl v regulaci aktivace a inhibice proliferace rakoviny, udržení kmenovosti a rozvoji rezistence vůči protirakovinným lékům. Přesné mechanismy těchto molekulárních procesů však nejsou dosud plně objasněny (shrnutí v Levy & Thorburn, 2020).

Ve studii z roku 2016 byla popsána role TLR9 v indukci autofágie závislé na buněčném stresu. Bylo zjištěno, že stresové podmínky, jako je například sérové hladovění buňky nebo stimulace receptorů pomocí fragmentů CpG-ODN, indukovaly jak zvýšení autofágie, tak zvýšení exprese TLR9 v rakovinových buňkách. Výsledky také naznačují, že stimulace TLR9 přímo reguluje časnou autofagii po sérovém hladovění (Lim *et al.*, 2016). V navazující studii bylo dále zjištěno, že cfDNA z rakovinových buněk indukuje zvýšení faktorů spojených s autofágií, jako jsou Beclin1, Atg16L1 a LC3B (Sipos *et al.*, 2019). Ošetření cfDNA podpořilo celkové přežití buňky a aktivovalo makroautofagii a lipofagii. Tyto poznatky poukazují na zajímavý vztah mezi aktivací TLR9 a přežíváním a diferenciací rakovinových buněk (Sipos *et al.*, 2019). V současné době je rovněž diskutován terapeutický potenciál v aplikaci kombinace cfDNA pocházející z nádoru spolu s inhibitory receptoru pro růstový hormon IGF1R. Kombinace těchto dvou molekul by měla mít na rakovinovou buňku antiproliferační účinek. Ten však lze zvrátit paralelní inhibicí signalizace TLR9 (Sipos *et al.*, 2019).

Taktéž byla prokázána role interakce cfDNA s TLR9 v modulaci protinádorové imunity po chemoterapii. Ukázalo se, že tumorová cfDNA, která působí prostřednictvím dráhy TLR9, částečně zprostředkovává adjuvantní účinek chemoterapie tím, že podporuje akumulaci a vychytávání antigenu a následně i zrání dendritických buněk (DC) v nádoru. Takto indukované DC následně aktivují další složky specifické imunity, což vede k celkové podpoře protinádorové imunitní reakce (Kang *et al.*, 2019).

### 3.4.3 Úloha cGAS/STING v molekulárních mechanismech rakoviny

Jako u předchozích dvou receptorů, úloha cGAS/STING ve vývoji nádoru může být jak stimulačního, tak inhibičního charakteru. Ve studii z roku 2021 byla u cGAS/STING signalizační dráhy, stejně jako u receptoru TLR9, prokázána role v regulaci apoptózy. Konkrétně bylo zjištěno, že cGAS/STING aktivuje dráhy NF- $\kappa$ B a IRF3-IFN $\beta$  indukující apoptózu (Li *et al.*, 2021a).

Vrozená imunitní detekce cfDNA prostřednictvím dráhy cGAS/STING v dendritických buňkách je jedním z nejvýznamnějších mechanismů z hlediska aktivace spontánní T-buněčné odpovědi proti

nádoru (Li *et al.*, 2020c). Na druhou stranu bylo v některých studiích dokázáno, že tato dráha také pomáhá imunitnímu úniku rakovinových buněk v určitých typech karcinomu, což naznačuje komplexnější úlohu v modulaci mikroprostředí nádoru. Na význam cGAS/STING v protinádorové imunitě poukazují i výsledky několika studií, které dokázaly, že downregulace dráhy cGAS/STING je spojena se snížením protinádorové imunitní odpovědi a s nepříznivou prognózou (shrnuto v Múzes *et al.*, 2022).

### 3.4.4 Úloha AIM2 v molekulárních mechanismech rakoviny

Úloha AIM2 byla prokázána v regulaci lokálního mikroprostředí nádoru. Zajímavé je, že byl zjištěn jak tumorsupresivní, tak tumorigenizní účinek v závislosti na typu a stádiu onemocnění. Tumorsupresivní účinky AIM2 byly detekovány například v případě melanomu, kdy zvýšená exprese AIM2 korelovala s inhibicí fenotypu rakoviny. Tumorsupresivní roli, a tedy inhibicí proliferace rakoviny, zastává aktivace AIM2 spolu s navozením pyróptózy i u hepatocelulárního karcinomu, karcinomu prsu, karcinomu děložního čípku infikovaného HPV, karcinomu prostaty, renálního karcinomu a karcinomu tlustého střeva (Ponomareva *et al.*, 2013; shrnuto v Zhu *et al.*, 2021).

Tumorigenezivní úloha AIM2 byla naopak prokázána v několika dalších studiích, v nichž bylo zjištěno, že AIM2 mimo jiné podporuje vývoj karcinomu plicního epitelu. Vysoká exprese AIM2 byla v tomto případě spojena se špatnou prognózou a přispívala k růstu a proliferaci nádorových buněk nezávisle na aktivaci zánětu. Bylo zjištěno, že upregulace AIM2 moduluje mitochondriální dynamiku ke zvýšené produkci mitochondriálních ROS, což dále přispívá k indukci MAPK/ERK signalizace potřebné pro růst a proliferaci rakovinných buněk (Qi *et al.*, 2020; Feng *et al.*, 2022). U spinocelulárního karcinomu byla zvýšená exprese AIM2 asociována s inhibicí apoptózy a podporou přežití rakovinových buněk (Farshchian *et al.*, 2017; shrnuto v Zhu *et al.*, 2021).

Kromě toho bylo zjištěno, že AIM2 detekuje DNA i v jádře, což vede k aktivaci inflamazomového komplexu a indukci apoptózy. AIM2 zde detekuje dvouvláknové zlomy gDNA vzniklé v důsledku ozařování v rámci chemoterapie. Výsledkem je pyróptóza v buňkách střevního epitelu a kostní dřeně. V buňkách kostní dřeně tento proces vede k selhání krvetvorby a z buněk gastrointestinální výstelky dochází k uvolnění velkého množství cfDNA prostřednictvím exozomů. Ty jsou následně vychytávány imunitními buňkami a znovu spouští signalizační dráhu přes AIM2 receptory, což vede ke zvýšení hladiny prozánětlivých cytokinů IL-1 $\beta$  a IL-18. Tyto cytokiny následně hrají úlohu ve spouštění protinádorové imunity. Dysregulace v mechanismech detekce cfDNA pomocí AIM2 a trvalá aktivace zánětu vede k radiační gastrointestinální toxicitě a průjmu (Hu *et al.*, 2016; Lian *et al.*, 2017; Gao *et al.*, 2019). Nadměrná exprese AIM2 v těchto buňkách, má za důsledek také zpomalení proliferace a vyšší náchylnost k apoptotické buněčné smrti (Choubey *et al.*, 2000).

## 4 Závěr

Na volnou cirkulující DNA bylo z biomedicínského hlediska po dlouhou dobu nahlíženo především jako na biomarker v souvislosti s autoimunitními a zánětlivými stavy, rakovinou, neinvazivním prenatalním vyšetřením nebo například při sledování stavu po transplantaci orgánů. V současné době se však větší důraz klade na odhalení podstaty konkrétních molekulárních drah, do kterých je cfDNA zapojena.

V rámci interakce cfDNA s receptory vrozeného imunitního systému byly doposud nejlépe popsány signální dráhy indukované receptory TLR9, AIM2 a cGAS/STING. Detekce vlastní cfDNA prostřednictvím každého z receptorů závisí na celé řadě strukturních faktorů, mezi které patří například délka, zakřivení cfDNA, četnost nemetylovaných CpG motivů či zda se cfDNA vyskytuje ve formě ssDNA nebo dsDNA. Obecně lze říct, že pro aktivaci receptoru TLR9 je ideální ssDNA s vysokou četností CpG motivů v sekvenci. Vazba cfDNA na TLR9 je také modulována několika proteiny, které se vážou přímo na CpG-DNA a podporují její interakci s TLR9. Receptor cGAS/STING pak optimálně rozpoznává především lineární dsDNA o minimální délce 20 bp bez ohledu na primární sekvenci, a nakonec pro detekci cfDNA prostřednictvím AIM2 je ideální dsDNA o délce mezi 80 a 300 bp. CfDNA se z hlediska biologické aktivity liší také na základě jaderného či mitochondriálního původu. Vzhledem k evolučnímu původu mitochondrií jejich sekvence obsahuje vysokou četnost nemetylovaných CpG motivů, což hraje výraznou roli při aktivaci TLR9 receptoru. Mezi dráhy, které byly popsány v souvislosti s indukcí prostřednictvím cf-mtDNA, však patří i signální dráhy spojené s receptory AIM2 a cGAS/STING.

Interakce cfDNA s již zmíněnými receptory byla prokázána jak při rozvoji zánětlivých stavů, které mohou ústít v autoimunitního onemocnění, tak i v mechanismech, jež souvisí s progresí a regresí nádoru, jako jsou metastázování či autofágie. Ačkoli je cfDNA takto významný modulátor imunologických drah, komplexní role cfDNA v dysregulaci těchto molekulárních mechanismů nebyla prozatím zcela objasněna. Nové poznatky tímto směrem by mohly přispět k vývoji a zacílení léčebné terapie.

Vzhledem k tomu, že v celé řadě studií byla jako nejvýznamnější mechanismus uvolňování z hlediska kvantity cfDNA prokázána aktivní sekrece a zároveň byla experimentálně prokázána role cfDNA v mezibuněčné komunikaci a dalších fyziologických procesech, další výzkum biologických účinků cfDNA by mohl přinést lepší pochopení molekulárních mechanismů zodpovědných za fungování organismu.

## 5 Bibliografie

1. AARTHY, R., S. MANI, S. VELUSAMI, S. SUNDARSINGH a T. RAJKUMAR, 2015. Role of Circulating Cell-Free DNA in Cancers. *Mol Diagn Ther.* **19**, 339-350. Dostupné z: doi:10.1007/s40291-015-0167-y
2. AGUADO, J., H. CHAGGAR, C. GÓMEZ-INCLÁN, M. SHAKER, H. LEESON, A. MACKAY-SIM a E. WOLVETANG, 2021. Inhibition of the cGAS-STING pathway ameliorates the premature senescence hallmarks of Ataxia-Telangiectasia brain organoids. *Aging Cell.* **20**(9), 13468. Dostupné z: doi:10.1111/accel.13468.
3. \*AKIRA, A., S. UEMATSU a O. TAKEUCHI, 2006. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell.* **124**(4), 783-801. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2006.02.015
4. ALCAIDE, M., M. CHEUNG, J. HILLMAN, S. RASSEKH, R. DEYELL a G. BATIST, 2020. Evaluating the quantity, quality and size distribution of cell-free DNA by multiplex droplet digital PCR. *Scientific Reports.* **10**(125664). Dostupné z: doi:10.1038/s41598-020-69432-x
5. ALEKSEEVA, A., L. KAMANEVA, S. KOSTYUK a N. VEIKO, 2016. Multiple Ways of cfDNA Reception and Following ROS Production in Endothelial Cells. *Adv Exp Med Biol.* **924**, 127-131. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-42044-8\_25
6. \*ANDERS, H., 2016. Of Inflammasomes and Alarmins: IL-1 $\beta$  and IL-1 $\alpha$  in Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol.* **27**(9), 2564-75. Dostupné z: doi:10.1681/ASN.2016020177.
7. ANDERSSON, G., O. KARLBERG, B. CANBÄCK a Ch. KURLAND, 2003. In the origin of mitochondria: a genomics perspective. *Philosophical transactions of the royal society B.* **358**, 165-77. Dostupné z: doi:10.1098/rstb.2002.1193
8. ANDREEVA, L., B. HILLER, D. KOSTREWA et al., 2017. CGAS senses long and HMGB/TFAM-bound U-turn DNA by forming protein–DNA ladders. *Nature.* **549**, 394-398. Dostupné z: doi:10.1038/nature23890
9. \*AUCAMP, J., A. BRONKHORST, Ch. BADENHORST a P. PRETORIUS, 2018. The diverse origins of circulating cell-free DNA in the human body: a critical re-evaluation of the literature. *Biological Reviews.* **93**(3), 1649-1683. Dostupné z: doi:10.1111/brv.12413
10. BAI, J., Ch. CERVANTES, S. HE et al., 2020. Mitochondrial stress-activated cGAS-STING pathway inhibits thermogenic program and contributes to overnutrition-induced obesity in mice. *Communications Biology.* **3**(257). Dostupné z: doi:10.1038/s42003-020-0986-1
11. BAI, J., Ch. CERVANTES, J. LIU a F. LIU, 2017. DsbA-L prevents obesity-induced inflammation and insulin resistance by suppressing the mtDNA release-activated cGAS-cGAMP-STING pathway. *PNAS.* **114**(46), 12196-12201. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1708744114
12. BANERJEE, I., B. BEHL, M. MENDONCA et al., 2018. Gasdermin D Restrains Type I Interferon Response to Cytosolic DNA by Disrupting Ionic Homeostasis. *Immunity.* **49**(3), 413-426. Dostupné z: doi:10.1016/j.immuni.2018.07.006
13. BANERJEE, M., Y. HUANG, S. JOSHI, M. MANDENHALL, Q. WANG, B. GARVY, T. MYINT a S. WHITEHEART, 2020. Platelets Endocytose Viral Particles and Are Activated via TLR (Toll-Like Receptor) Signaling. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* **40**, 1635-1650. Dostupné z: doi:10.1161/ATVBAHA.120.314180

14. BARNETT, K., J. CORONAS-SERNA, W. ZHOU, M. ERNANDES, A. CAO, P. KRANZUSCH a J. KAGAN, 2019. Phosphoinositide Interactions Position cGAS at the Plasma Membrane to Ensure Efficient Distinction between Self- and Viral DNA. *Cell*. **176**(6), 1432-1446. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2019.01.049
15. BAUER, A., E. RONDINI, M. TENNIS, K. VELMURAGAN a D. WIESE, 2017. Toll-like receptor expression in human non-small cell lung carcinoma: potential prognostic indicators of disease. *Oncotarget*. **8**(54), 91860–91875. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.19463
16. BOWIE, A. a L.A. O'NEILL, 2000. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *Journal of leukocyte biology*. **67**(4), 508-14. Dostupné z: doi:10.1002/jlb.67.4.508
17. BOYER, J., C. SPANGLER, J. STRAUSS, P. LIU, R. MCGINTY a Qi ZHANG, 2020. Structural basis of nucleosome-dependent cGAS inhibition. *Science*. **3700**(6515), 450-454. Dostupné z: doi:10.1126/science.abd0609.
18. BRUBAKER, S., A. GAUTHIER, E. MILLS, N. INGOLIA a J. KAGAN, 2014. A Bicistronic MAVS Transcript Highlights a Class of Truncated Variants in Antiviral Immunity. *Cell*. **156**(4), 800-811. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2014.01.021
19. BUCHANAN, S. a N. GAY, 1996. Structural and functional diversity in the leucine-rich repeat family of proteins. *Progress in biophysics and molecular biology*. **65**(1-2), 1-44. Dostupné z: doi:10.1016/s0079-6107(96)00003-x.
20. BÜRCKSTÜMMER, T., Ch. BAUMANN, S. BLÜML et al., 2009. An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. *Nature Immunology*. **10**(3), 266-72. Dostupné z: doi:10.1038/ni.1702
21. BURNS, E. a N. YUSUF, 2014. Toll-Like Receptors and Skin Cancer. *Frontiers: In immunology*. **5**(135). Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2014.00135
22. BURROWS, C. a J. MULLER, 1998. Oxidative Nucleobase Modifications Leading to Strand Scission. *Chem. Rev*. **98**(3), 1109-1152. Dostupné z: doi:10.1021/cr960421s
23. COMBERLATO, A., M. M. KOGA, S. NÜSSING, I. A. PARISH a M. M. C. BASTING. Spatially Controlled Activation of Toll-like Receptor 9 with DNA-Based Nanomaterials. *Nano Lett*. 2022, **22**(6), 2506-2513. Dostupné z: doi:10.1021/acs.nanolett.2c00275
24. COOKSON, B.T. a M. BRENNAN, 2001. Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends in Microbiology*. **9**(3), 113-114. Dostupné z: doi:10.1016/S0966-842X(00)01936-3
25. COX, D., R. FIELD, D. WILLIAMS, M. BARAN, A. BOWIE, C. CUNNINGHAM a A. DUNNE, 2015. DNA sensors are expressed in astrocytes and microglia in vitro and are upregulated during gliosis in neurodegenerative disease. *Glia*. **63**(5), 812-25. Dostupné z: doi:10.1002/glia.22786.
26. CROW, Y., B. HAYWARD, R. PALMAR et al., 2006. Mutations in the gene encoding the 3'-5' DNA exonuclease TREX1 cause Aicardi-Goutières syndrome at the AGS1 locus. *Nature Genetics*. **38**, 917-920. Dostupné z: doi:10.1038/ng1845
27. DECOU, A., J. KATZ, S. VENKATRAMAN a A. ABLASSER, 2021. The cGAS–STING pathway as a therapeutic target in inflammatory diseases. *Nature Reviews Immunology*. **21**, 548-569. Dostupné z: doi:10.1038/s41577-021-00524-z
28. \*DEININGER, P. a M. BATZER, 1999. Alu repeats and human disease. *Mol Genet Metab* . **67**(3), 183-93. Dostupné z: doi:10.1006/mgme.1999.2864.

29. \*DEMKOW, U., 2021. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Cancer Invasion, Evasion and Metastasis. *Cancers*. **13**(17), 4495. Dostupné z: doi:10.3390/cancers13174495
30. DI MICCO, A., G. FRERA, J. LUGRIN et al., 2016. AIM2 inflammasome is activated by pharmacological disruption of nuclear envelope integrity. *Proc Natl Acad Sci U S A* . **113**(32), 4671-80. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1602419113.
31. \*DUVVURI, B. a CH. LOOD, 2019. Cell-Free DNA as a Biomarker in Autoimmune Rheumatic Diseases. *Frontiers*. **10**(502). Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2019.00502
32. ELZINGA, S., R. HENN, B. MURDOCK et al., 2022. CGAS/STING and innate brain inflammation following acute high-fat feeding. *Frontiers: In immunology*. **13**(1012594). Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2022.1012594
33. FANG, Ch., X. WEI a Y. WEI, 2015. Mitochondrial DNA in the regulation of innate immune responses. *Protein Cell*. **7**(1), 11-16. Dostupné z: doi:10.1007/s13238-015-0222-9
34. FARSHCHIAN, M., L. NISSINEN, E. SILJAMÄKI et al., 2017. Tumor cell-specific AIM2 regulates growth and invasion of cutaneous squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. **8**(28), 45825–45836. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.17573
35. FENG, X., Z. SONG, Q. HUANG, J. JIA, L. ZHANG, M. ZHU a J. QIAN, 2022. AIM2 Promotes Gastric Cancer Cell Proliferation via the MAPK Signaling Pathway. *J Healthc Eng*. **2022**(8756844). Dostupné z: doi:10.1155/2022/8756844
36. FERNANDES-ALNEMRI, T., J. WU, P. DATTA, B. MILLER, W. JANKOSKI, S. ROSENBERG, J. ZHANG a E. ALNEMRI, 2007. The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. *Cell Death Differ* . **14**(9), 1590-604. Dostupné z: doi:10.1038/sj.cdd.4402194.
37. FERNANDES-ALNEMRI, T., J. YU, P. DATTA, J. WU a E. ALNEMRI, 2009. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature*. **458**(7237), 509-13. Dostupné z: doi:10.1038/nature07710
38. FERNANDO, M.R., Ch. JIANG a W. RYAN, 2017. New evidence that a large proportion of human blood plasma cell-free DNA is localized in exosomes. *PLoS One*. **12**(8), 0183915. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0183915.
39. FIDLER, T., CH. XUE, B. HARDAWAY et al., 2021. The AIM2 inflammasome exacerbates atherosclerosis in clonal haematopoiesis. *Nature*. **592**(7853), 296-301. Dostupné z: doi:10.1038/s41586-021-03341-5.
40. \*FILLATREAU, S., B. MANFROI a T. DÖRNER, 2021. Toll-like receptor signalling in B cells during systemic lupus erythematosus. *Nature Reviews Rheumatology volume*. **17**, 98-108. Dostupné z: doi:10.1038/s41584-020-00544-4
41. FISCHER, A., S. ABDOLLAHI.ROODSAZ, , BÖHM et al., 2018. The involvement of Toll-like receptor 9 in the pathogenesis of erosive autoimmune arthritis. *J Cell Mol Med*. **22**(9), 4399-4409. Dostupné z: doi:10.1111/jcmm.13735
42. FUKUDA, D., S. NISHIMOTO, K. AINI et al., 2019. Toll-Like Receptor 9 Plays a Pivotal Role in Angiotensin II-Induced Atherosclerosis. *J Am Heart Assoc* . **8**(7), 10860. Dostupné z: doi:10.1161/JAHA.118.010860.
43. FUKUI, R., Ch. YAMAMOTO, F. MATSUMOTO et al., 2018. Cleavage of Toll-Like Receptor 9 Ectodomain Is Required for In Vivo Responses to Single Strand DNA. *Frontiers: In immunology*. **9**, 1491. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2018.01491

44. GAHAM, P. a M. STROUN, 2010. The virtosome—a novel cytosolic informative entity and intercellular messenger. *Cell Biochemistry and Function*. **28**(7), 529-538. Dostupné z: doi:10.1002/cbf.1690
45. GAHAN, P., 2013. Circulating nucleic acids: possible inherited effects. *Biological Journal of the Linnean Society*,. **110**(4), 931-948. Dostupné z: doi:10.1111/bij.12160
46. GAO, D., T. LI, X.-D. LI, X. CHEN, Q.-Z. LI, M. WIGHT-CARTER a T. CHEN, 2015. Activation of cyclic GMP-AMP synthase by self-DNA causes autoimmune diseases. *PNAS*. **112**(42), 5699-5705. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1516465112
47. GAO, J., S. PENG, X. SHAN et al., 2019. Inhibition of AIM2 inflammasome-mediated pyroptosis by Andrographolide contributes to amelioration of radiation-induced lung inflammation and fibrosis. *Cell Death & Disease volume*. **10**(957). Dostupné z: doi:10.1038/s41419-019-2195-8
48. GARCÍA-OLMO, D., D. GARCÍA-OLMO, J. ONTAÑÓN, E. MARTINEZ a M. VALLEJO, 1999. Tumor DNA circulating in the plasma might play a role in metastasis. The hypothesis of the genomestasis. *Histol Histopathol* . **14**(4), 1999. Dostupné z: doi:10.14670/HH-14.1159
49. GERMIC, N., T. FETTRELET, D. STOJKOV, A. HOSSEINI, M. HORN, D. SIMON, S. YOUSEFI a H.-U. SIMON, 2021. The Release Kinetics of Eosinophil Peroxidase and Mitochondrial DNA Is Different in Association with Eosinophil Extracellular Trap Formation. *Cells*. **10**(2), 306. Dostupné z: doi:10.3390/cells10020306
50. GRATIA, M., M. RODERO, C. CONDRAD et al., 2019. Bloom syndrome protein restrains innate immune sensing of micronuclei by cGAS. *J Exp Med*. **216**(5), 1199-1213. Dostupné z: doi:10.1084/jem.20181329
51. GUIMARãES-COSTA, A.B., M. NASCIMENTO, A. WARDINI, L. PINTO-DA-SILVA a E. SARAIVA, 2012. ETosis: A Microbicidal Mechanism beyond Cell Death. *J Parasitol Res*. **2012**(929743). Dostupné z: doi:10.1155/2012/929743
52. GUI, X., H. YANG, T. LI, X. TAN, P- SHI, M. LI, F. DU a Z. CHEN, 2019. Autophagy induction via STING trafficking is a primordial function of the cGAS pathway. *Nature*. **567**, 262-266. Dostupné z: doi:10.1038/s41586-019-1006-9
53. \*HÄSLER, J. a K. STRUB, 2006. Alu elements as regulators of gene expression. *Nucleic Acids Res*. **34**(19), 5491-5497. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkl706
54. HAUSER, C. a L. OTTERBEIN, 2018. Danger signals from mitochondrial DAMPS in trauma and post-injury sepsis. *European Journal of Trauma and Emergency Surgery*. **44**, 317-324. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1007/s00068-018-0963-2
55. HAUSER, C., T. SURSAL, P. APPLETON, Q. ZHANG a K. ITAGAKI, 2010b. Mitochondrial Damage Associated Molecular Patterns From Femoral Reamings Activate Neutrophils Through Formyl Peptide Receptors and P44/42 MAP Kinase. *Journal of Orthopaedic Trauma*. **24**(9), 534-538. Dostupné z: doi:10.1097/BOT.0b013e3181ec4991
56. HAUSER, Carl J., 2010a. Mitochondrial Damage Associated Molecular Patterns From Femoral Reamings Activate Neutrophils Through Formyl Peptide Receptors and P44/42 MAP Kinase. *Journal of Orthopaedic Trauma*. **24**(9), 534-538. Dostupné z: doi:10.1097/BOT.0b013e3181ec4991
57. HEMMI, H., O. TAKEUCHI, T. KAWAI et al., 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*. **408**, 740-745. Dostupné z: doi:10.1038/35047123

58. HONG, Ch., CH. YUN, G. LEE, A. PARK, Y. KIM a M. JANG, 2015. TLR9 regulates adipose tissue inflammation and obesity-related metabolic disorders. *Obesity*. **23**(11), 2199-2206. Dostupné z: doi:10.1002/oby.21215
59. HUANG, L., Z. HONG, W. WU, S. XIONG, M. ZHONG, X. GAO, J. REHMAN a A. MALIK, 2020. Mitochondrial DNA Activates cGAS Signaling and Suppresses YAP-Mediated Endothelial Cell Proliferation Program to Promote Inflammatory Injury. *Immunity*. **52**(3), 475-486. Dostupné z: doi:10.1016/j.immuni.2020.02.002.
60. HU, B., Ch. JIN, H. LI et al., 2016. The DNA-sensing AIM2 inflammasome controls radiation-induced cell death and tissue injury. *Science*. **354**(6313), 765-768. Dostupné z: doi:10.1126/science.aaf7532
61. CHANDRANANDA, D., N. THORNE a M. BAHLO, 2015. High-resolution characterization of sequence signatures due to non-random cleavage of cell-free DNA. *BMC medicinal genomics*. **17**(8), 29. Dostupné z: doi:10.1186/s12920-015-0107-z.
62. \*CHAN, K., S. LEUNG, S. YEUNG, A. CHAN a Y. LO, 2008. Persistent Aberrations in Circulating DNA Integrity after Radiotherapy Are Associated with Poor Prognosis in Nasopharyngeal Carcinoma Patients. *Clinical Cancer Research*. **14**(13), 4141-4145. Dostupné z: doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0182
63. CHEN, W., X. LIU, M. LV et al., 2014. Exosomes from Drug-Resistant Breast Cancer Cells Transmit Chemoresistance by a Horizontal Transfer of MicroRNAs. *PLoS One*. **9**(4), 95240. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0095240
64. CHOUBEY, D., S. WALTER, Y. GENG a H. XIN, 2000. Cytoplasmic localization of the interferon-inducible protein that is encoded by the AIM2 (absent in melanoma) gene from the 200-gene family. *FEBS letters*. **474**(1), 38-42. Dostupné z: doi:10.1016/S0014-5793(00)01571-4
65. JAHR, S., H. HENTZE, S. ENGLISCH, D. HARDT, F. FACKELMAYER a R. HESCH, 2001. *DNA Fragments in the Blood Plasma of Cancer Patients: Quantitations and Evidence for Their Origin from Apoptotic and Necrotic Cells*. **61**(4), 1659-1665. Dostupné z: doi:1659-65. PMID: 11245480.
66. JAKOBS, Ch., S. PERNER a V. HORNING, 2015. AIM2 Drives Joint Inflammation in a Self-DNA Triggered Model of Chronic Polyarthritis. *PLoS One*. **10**(6), 0131702. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0131702
67. JANEWAY, C.A., 1989. Approaching the Asymptote? Evolution and Revolution in Immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. **54**, 1-13. Dostupné z: doi:10.1101/SQB.1989.054.01.003
68. JANSEN, M., D. EMAL, G. TESKE, M. DESSING, S. FLORQUIN a J. ROELOFS, 2017. Release of extracellular DNA influences renal ischemia reperfusion injury by platelet activation and formation of neutrophil extracellular traps. *Kidney International*. **91**(2), 352-364. Dostupné z: doi:10.1016/j.kint.2016.08.006
69. JIANG, P., C. CHAN, K. CHAN a Y. LO, 2015. Lengthening and shortening of plasma DNA in hepatocellular carcinoma patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **112**(11), 1317-1325. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1500076112
70. JIANG, P. a Y. LO, 2016. The Long and Short of Circulating Cell-Free DNA and the Ins and Outs of Molecular Diagnostics. *Trends in Genetics*. **32**(6), 360-371. Dostupné z: doi:10.1016/j.tig.2016.03.009
71. JIN, T., A. PERRY, J. JIANG et al., 2012. Structures of the HIN Domain:DNA Complexes Reveal Ligand Binding and Activation Mechanisms of the AIM2

- Inflammasome and IFI16 Receptor. *Immunity*. **36**(4), 561-571. Dostupné z: doi:10.1016/j.immuni.2012.02.014
72. KANG, T., Ch.-P. MAO, Y. KIM et al., 2019. TLR9 acts as a sensor for tumor-released DNA to modulate anti-tumor immunity after chemotherapy. *J. Immunotherapy Cancer*. **7**(260). Dostupné z: doi:10.1186/s40425-019-0738-2
  73. KANNEGANTI, T.-D., M. KUNDU a D. GREEN, 2015. Innate Immune Recognition of mtDNA—An Undercover Signal?. *Cell Metabolism*. **21**(6), 793-794. Dostupné z: doi:10.1016/j.cmet.2015.05.019
  74. KERUR, N., M. VEETIL, N. SHARMA-WALIA, V. BOTTERO, S. SADAGOPAN, P. OTAGERI a B. CHANDRAN, 2011. IFI16 Acts as a Nuclear Pathogen Sensor to Induce the Inflammasome in Response to Kaposi Sarcoma-Associated Herpesvirus Infection. *Cell Host & Microbe*. **9**(5), 363-375. Dostupné z: doi:10.1016/j.chom.2011.04.008
  75. KIM, H.-Y., S.-J. KIM a S.-M. LEE, 2014. Activation of NLRP3 and AIM2 inflammasomes in Kupffer cells in hepatic ischemia/reperfusion. *The FEBS Journal*. **282**(2), 259-270. Dostupné z: doi:10.1111/febs.13123
  76. KOMADA, T., H. CHUNG, A. LAU et al., 2018. Macrophage Uptake of Necrotic Cell DNA Activates the AIM2 Inflammasome to Regulate a Proinflammatory Phenotype in CKD. *J Am Soc Nephrol*. **29**(4), 1165-1181. Dostupné z: doi:10.1681/ASN.2017080863
  77. KRIEG, A., A.K. YI, S. MATSON, T. WALDSCHMIDT, G. BISHOP, R. TEASDALE, G. KORETZKY a D. KLINMAN, 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*. **374**, 546-549. Dostupné z: doi:10.1038/374546a0
  78. \*KUMARI, P., A. RUSSO, S. SHIVCHARAN a V. RATHINAM, 2020. AIM2 in health and disease: inflammasome and beyond. *Immunological Reviews*. **279**(1), 83-95. Dostupné z: doi:10.1111/imr.12903
  79. \*KUMAR, V., 2019. A STING to inflammation and autoimmunity. *J Leukoc Biol*. **106**(1), 171-185. Dostupné z: doi:10.1002/JLB.4MIR1018-397RR
  80. \*KUMAR, V., 2020. Toll-like receptors in sepsis-associated cytokine storm and their endogenous negative regulators as future immunomodulatory targets. *International Immunopharmacology*. **89**. Dostupné z: doi:10.1016/j.intimp.2020.107087
  81. \*KUMAR, V., 2021. The Trinity of cGAS, TLR9, and ALRs Guardians of the Cellular Galaxy Against Host-Derived Self-DNA. *Frontiers*. **11**(2), 31. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2020.624597
  82. KUSTANOVICH, A., R. SCHWARTZ, T. PARETZ a A. GRINSHPUN, 2019. Life and death of circulating cell-free DNA. *Cancer Biology and Therapy*. **20**(8), 1057-1067. Dostupné z: doi:10.1080/15384047.2019.1598759
  83. LARKIN, B., V. IYUKHA, M. SOROKIN, A. BUZDIN, E. VANNIER a A. POLTORAK, 2017. Cutting Edge: Activation of STING in T Cells Induces Type I IFN Responses and Cell Death: Activation of STING in T Cells Induces Type I IFN Responses and Cell Death. *Journal of Immunology*. **199**(2), 397-402. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.1601999.
  84. LATZ, E., A. SCHOEPNEMEYER, A. VISINTIN et al., 2004. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nature Immunology*. **5**, 190-198. Dostupné z: doi:doi.org/10.1038/ni1028
  85. LEON, S., G. EHRLICH, B. SHAPIRO a V. LABBATE, 1977a. Free DNA in the serum of rheumatoid arthritis patients. *The Journal of rheumatology*. **4**(2), 139-43.

86. LEON, S., B. SHAPIRO, D. SKLAROFF a M. YAROS, 1977b. *Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy*. **37**(3), 645-50.
87. \*LEVY, J. a A. THORBURN, 2020. Autophagy in cancer: moving from understanding mechanism to improving therapy responses in patients. *Cell Death Differ.* **27**, 843-857. Dostupné z: doi:10.1038/s41418-019-0474-7
88. LIANG, Q., G. SEO, Y. CHOI, T. HA, B.-H. OH a J. JUNG, 2014. Crosstalk between the cGAS DNA Sensor and Beclin-1 Autophagy Protein Shapes Innate Antimicrobial Immune Responses. *Cell Host & Microbe*. **15**(2), 228-238. Dostupné z: doi:doi.org/10.1016/j.chom.2014.01.009
89. LIAN, Q., J. XU, S. YAN et al., 2017. Chemotherapy-induced intestinal inflammatory responses are mediated by exosome secretion of double-strand DNA via AIM2 inflammasome activation. *Cell Research*. **27**, 784-800. Dostupné z: doi:10.1038/cr.2017.54
90. LI, C., W. LIU, F. WANG, T. HAYASHI, K. MIZUNO, S. HATTORI a T. IKEJIMA, 2021a. DNA damage-triggered activation of cGAS-STING pathway induces apoptosis in human keratinocyte HaCaT cells. *Molecular Immunology*. **131**, 180-190. Dostupné z: doi:10.1016/j.molimm.2020.12.037
91. LI, H., J. WANG, J. WANG, L.-S. CAO, Z.-X. WANG a J.-W. WU, 2014. Structural mechanism of DNA recognition by the p202 HINa domain: insights into the inhibition of Aim2-mediated inflammatory signalling. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*. **70**(1), 21-29. Dostupné z: doi:10.1107/S2053230X1303135X
92. LI, J., L. HUYNH, W. CORNWELL et al., 2021b. Electronic Cigarettes Induce Mitochondrial DNA Damage and Trigger TLR9 (Toll-Like Receptor 9)-Mediated Atherosclerosis. *Thrombosis, and Vascular Biology*. **41**, 839-853. Dostupné z: doi:10.1161/ATVBAHA.120.315556
93. LIM, J., H. KIM, K. NGUYEN a K. CHO, 2016. The role of TLR9 in stress-dependent autophagy formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **481**(3-4), 219-226. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2016.10.105
94. LI, P., M. SHI, J. MAIQUE, J. SHAFFER, S. YAN, O. MOE a M. HU, 2020a. Beclin 1/Bcl-2 complex-dependent autophagy activity modulates renal susceptibility to ischemia-reperfusion injury and mediates renoprotection by Klotho. *Am J Physiol Renal Physiol*. **318**(3), 772-792. Dostupné z: doi:10.1152/ajprenal.00504.2019.
95. LI, Q., Y. CAO, Ch. DANG, B. HAN, R. HAN, H. MA, J. HAO a L. WANG, 2020b. Inhibition of double-strand DNA-sensing cGAS ameliorates brain injury after ischemic stroke. *EMBO Mol Med*. **12**(4), 11002. Dostupné z: doi:10.15252/emmm.201911002
96. LIU, X., Z. ZHANG, J. RUAN, Y. PAN, V. MAGUPALLI, H. WU a J. LIEBERMAN, 2016. Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature*. **535**, 153-158. Dostupné z: doi:10.1038/nature18629
97. LI, W., L. LU, J. LU et al., 2020c. CGAS-STING-mediated DNA sensing maintains CD8+ T cell stemness and promotes antitumor T cell therapy. *Sci Transl Med*. **12**(549), 2013. Dostupné z: doi:10.1126/scitranslmed.aay9013
98. LI, Y., S. JAMES, D. WYLLIE et al., 2019. TMEM203 is a binding partner and regulator of STING-mediated inflammatory signaling in macrophages. *PNAS*. **116**(33), 16479-16488. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1901090116.
99. LOOD, Ch., L. BLANCO, M. PURMALEK, C. CARMONA-RIVERA, S. DE RAVIN a C. SMITH, 2016. Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA

- are interferogenic and contribute to lupus-like disease. *Nature Medicine*. **22**, 156-153. Dostupné z: doi:10.1038/nm.4027
100. LO, Y., N. CORBETTA, P. CHAMBERLAIN a V. RAI, 1997. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *The Lancet*. **350**(9076), 485-487. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(97)02174-0
  101. LO, Y., J. WAINSCOAT, M.D.G. GILLMER, P. PATEL, M. SAMPIERTO a K.A. FLEMING, 1989. Prenatal sex determination by DNA amplification from maternal peripheral blood. *The Lancet*. **334**(8676), 1363-1365. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(89)91969-7
  102. LO, Y.M. a K. CHAN, 2010. Maternal Plasma DNA Sequencing Reveals the Genome-Wide Genetic and Mutational Profile of the Fetus. *Science*. **2**(61), 61-91. Dostupné z: doi:10.1126/scitranslmed.3001
  103. LUI, Y., K.-W. CHIK, Ch.-Y. HO, Ch. LAM a Y. LO, 2002. Predominant hematopoietic origin of cell-free DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Clinical Chemistry*. **48**(3), 421-427. Dostupné z: doi:10.1093/clinchem/48.3.421
  104. MAO, Y., W. LUO, L. ZHANG et al., 2017. STING–IRF3 Triggers Endothelial Inflammation in Response to Free Fatty Acid-Induced Mitochondrial Damage in Diet-Induced Obesity. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. **37**, 920-929. Dostupné z: doi:10.1161/ATVBAHA.117.309017
  105. MATZINGER, P., 1994. Tolerance, Danger, and the Extended Family. *Annual Review in Immunology*. **12**, 991-1045. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.iy.12.040194.005015
  106. MA, Z. a B. DAMANIA, 2016. The cGAS-STING Defense Pathway and Its Counteraction by Viruses. *Cell Host & Microbe*. **19**(2), 150-158. Dostupné z: doi:10.1016/j.chom.2016.01.010
  107. MEDDEB, R., Z. DACHE a S. THEZENAS, 2019. Quantifying circulating cell-free DNA in humans. *Scientific Reports*. **9**(5220). Dostupné z: doi:10.1038/s41598-019-41593-4
  108. MITTRA, I., N. KHARE, G. RAGHURAM et al., 2015. Circulating nucleic acids damage DNA of healthy cells by integrating into their genomes. *J Biosci*. **40**, 91-111. Dostupné z: doi:10.1007/s12038-015-9508-6
  109. MOREIRA, V., T. DE LA CERA MARTÍNEZ, E. GONZÁLEZ, B. GARCÍA a F. MENÉNDEZ, 2006. Increase in and clearance of cell-free plasma DNA in hemodialysis quantified by real-time PCR. *Clin Chem Lab Med*. **44**(12), 1410-5. Dostupné z: doi:10.1515/CCLM.2006.252.
  110. MORRONE, S., M. MATYSZEWSKI, X. YU, M. DELANNOY, E. EGELMAN a J. SOHN, 2015. Assembly-driven activation of the AIM2 foreign-dsDNA sensor provides a polymerization template for downstream ASC. *Nature Communications*. **6**(7827). Dostupné z: doi:10.1038/ncomms8827
  111. MORSHED, M., R. HLUSHCHUK, D. SIMON et al., 2014. NADPH oxidase-independent formation of extracellular DNA traps by basophils. *Clinical Trial*. **192**(11), 5314-23. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.1303418.
  112. MOULIERE, F., S. MESSAOUDI, C. GONGORA, A. GUEDJ, B. ROBERT, M. RIO a Franck MOLINA, 2013. Circulating Cell-Free DNA from Colorectal Cancer

- Patients May Reveal High KRAS or BRAF Mutation Load. *Translational Oncology*. **6**(3), 319-328. Dostupné z: doi:doi.org/10.1593/tlo.12445
113. MOULIERE, F., B. ROBERT a E. PEYROTTE, 2011. High Fragmentation Characterizes Tumour-Derived Circulating DNA. *PLoS One*. **6**(9). Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0023418
114. MOULIERE, F., S. E. MESSAOUDI, D. PANG, A. DRITSCHILO a A. R. THIERRY. Multi-marker analysis of circulating cell-free DNA toward personalized medicine for colorectal cancer. *Molecular oncology*. 2014, **8**(5), 927-41. Dostupné z: doi:10.1016/j.molonc.2014.02.005
115. \*MÜZES, G., B. BARTA, V.. HORGAS a F. SIPOS, 2022. Cell-Free DNA in the Pathogenesis and Therapy of Non-Infectious Inflammations and Tumors. *Biomedicines*. **10**(11), 2853. Dostupné z: doi:10.3390/biomedicines10112853
116. MUZIO, M., N. POLENTARUTTI, D. BOSISIO, P. MANOJ KUMAR a A. MANTOVANI, 2000. Toll-like receptor family and signalling pathway. *Biochemical Society Transactions*. **28**(5), 563-566. Dostupné z: doi:doi.org/10.1042/bst0280563
117. NIU, Z., W. TANG, T. LIU et al., 2018. Cell-free DNA derived from cancer ahopardcells facilitates tumor malignancy through Toll-like receptor 9 signaling-triggered interleukin-8 secretion in colorectal cancer. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. **50**(10), 1007-1017. Dostupné z: doi:10.1093/abbs/gmy104
118. NÜNDEL, K., N. GREEN, A. SHAFFER et al., 2015. Cell-Intrinsic Expression of TLR9 in Autoreactive B Cells Constrains BCR/TLR7-Dependent Responses. *J Immunol*. **194**(6), 2504-2512. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.1402425
119. OHTO, U., T. SHIBATA, H. TANJI, H. ISHIDA, E. KRAYUKHINA, S. UCHIYAMA, K. MIYAKE a T. SHIMIZU, 2015. Structural basis of CpG and inhibitory DNA recognition by Toll-like receptor 9. *Nature*. **520**, 702-706. Dostupné z: doi:10.1038/nature14138
120. PARK, S., A. SEO, H. JUNG, J. GWAK, N. JUNG, N.-Y. CHO a G. KANG, 2014. Alu and LINE-1 hypomethylation is associated with HER2 enriched subtype of breast cancer. *PLoS One*. **9**(6), 100429. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0100429.
121. PAUNEL-GÖRGÜLÜ, A., M. WACKER, M. AITA et al., 2017. CfDNA correlates with endothelial damage after cardiac surgery with prolonged cardiopulmonary bypass and amplifies NETosis in an intracellular TLR9-independent manner. *Scientific Reports*. **7**(1), 17421. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-017-17561-1
122. PERDAS, E., R. STAWSKI, K. KACZKA, D. NOWAK a M. ZUBRYCKA, 2019. Altered levels of circulating nuclear and mitochondrial DNA in patients with Papillary Thyroid Cancer. *Scientific Reports*. **9**(14438). Dostupné z: doi:10.1038/s41598-019-51000-7
123. PETERS, D. a P. PRETORIUS, 2011. Origin, translocation and destination of extracellular occurring DNA — A new paradigm in genetic behaviour. *Clinica Chimica Acta*. **412**(11-12), 806-811. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2011.01.026
124. PICCA, A., F. GUERRA, R. CALVANI, R. ROMANO a H. COELHO-JUNIOR, 2022. Circulating Mitochondrial DNA and Inter-Organellar Contact Sites in Aging and Associated Conditions. *Cells*. **11**(4), 675. Dostupné z: doi:10.3390/cells11040675.
125. POHAR, J., A. KRAJNIK, R. JERALA a M. BENČINA, 2015. Minimal Sequence Requirements for Oligodeoxyribonucleotides Activating Human TLR9. *The Journal of immunology*. **194**(8), 3901-3908. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.1402755

126. POHAR, J., D. LAINŠČEK, K. IVIČAK-KOCJAN, R. JERALA a M. BENČINA, 2017. Short single-stranded DNA degradation products augment the activation of Toll-like receptor 9. *Nature Communications*. **8**(15363). Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1038/ncomms15363>
127. POH, L., D. FANN, P. WONG et al., 2021. AIM2 inflammasome mediates hallmark neuropathological alterations and cognitive impairment in a mouse model of vascular dementia. *Mol Psychiatry*. **26**, 4544-4560. Dostupné z: doi:[10.1038/s41380-020-00971-5](https://doi.org/10.1038/s41380-020-00971-5)
128. PONOMAREVA, L., X. DUAN, E. DICKERSON, H. SHEN, R. PANCHANATHAN a D. CHOUBEY, 2013. AIM2, an IFN-Inducible Cytosolic DNA Sensor, in the Development of Benign Prostate Hyperplasia and Prostate Cancer. *Mol Cancer Res*. **11**(10), 1193-1202. Dostupné z: doi:[10.1158/1541-7786.MCR-13-0145](https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-13-0145)
129. PRABAKARAN, T., Ch BODDA, Ch. KRAP et al., 2018. Attenuation of cGAS-STING signaling is mediated by a p62/SQSTM1-dependent autophagy pathway activated by TBK1. *The EMBO Journal*. **37**(8), 97958. Dostupné z: doi:[10.15252/embj.201797858](https://doi.org/10.15252/embj.201797858)
130. \*PROSKURYAKOV, S. Y., A. G. KONOPLYANNIKOV a V. L. GABAI. Necrosis: a specific form of programmed cell death?. *Exp Cell Res*. 2003, 283(1), 1-16. Dostupné z: doi:[10.1016/s0014-4827\(02\)00027-7](https://doi.org/10.1016/s0014-4827(02)00027-7).
131. QI, J., L.-Y. CHEN, X.-J. SCHEN a S.-Q. JU, 2019. Analytical Value of Cell-Free DNA Based on Alu in Psychiatric Disorders. *Front Psychiatry*. **10**(992). Dostupné z: doi:[10.3389/fpsy.2019.00992](https://doi.org/10.3389/fpsy.2019.00992)
132. QI, M., D. DAI, J. LIU et al., 2020. AIM2 promotes the development of non-small cell lung cancer by modulating mitochondrial dynamics. *Oncogene*. **39**, 2707-2703. Dostupné z: doi:[10.1038/s41388-020-1176-9](https://doi.org/10.1038/s41388-020-1176-9)
133. RILEY, J., G. QUARATO, C. CLOIX et al., 2018. Mitochondrial inner membrane permeabilisation enables mtDNA release during apoptosis. *The EMBO Journal*. **37**(99238). Dostupné z: doi:[10.15252/embj.201899238](https://doi.org/10.15252/embj.201899238)
134. ROBERTS, T., A. IDRIS, J. DUNN et al., 2009. HIN-200 Proteins Regulate Caspase Activation in Response to Foreign Cytoplasmic DNA. *Science*. **323**(5917), 1057-1060. Dostupné z: doi:[10.1126/science.1169841](https://doi.org/10.1126/science.1169841).
135. SAGAN, L., B. SHAPIRO, D. SKLAROFF a M. YAROS, 1967. In the origin of mitosing cells. *Journal of Theoretical Biology*. **14**(3), 225-274. Dostupné z: doi:[10.1016/0022-5193\(67\)90079-3](https://doi.org/10.1016/0022-5193(67)90079-3)
136. SHARMA, M., S. RAJENDRARAO, N. SHAHAMI a S. SUBRAMANIAM, 2020. Cyclic GMP-AMP synthase promotes the inflammatory and autophagy responses in Huntington disease. *PNAS*. **117**(27), 15989-15999. Dostupné z: doi:[10.1073/pnas.2002144117](https://doi.org/10.1073/pnas.2002144117)
137. \*SHEPARD, Ch. R., 2020. TLR9 in MAFLD and NASH: At the Intersection of Inflammation and Metabolism: At the Intersection of Inflammation and Metabolism. *Front Endocrinol (Lausanne)*. **11**(613639). Dostupné z: doi:[10.3389/fendo.2020.613639](https://doi.org/10.3389/fendo.2020.613639)
138. SHI, S., C. XU, X. FANG, Y. ZHANG, H. LI, W. WEN a G. YANG, 2020. Expression profile of Toll-like receptors in human breast cancer. *Mol Med Rep*. **21**(2), 786-794. Dostupné z: doi:[10.3892/mmr.2019.10853](https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10853)
139. SCHEDEL, F., S. MAYER-HAIN, K. PAPPELBAUM, D. METZE, M. STOCK, T. GOERGE, C. SUNDERKÖTTER a C. WEISHAUPT, 2020. Evidence and impact of neutrophil extracellular traps in malignant melanoma. *Pigment Cell & Melanoma Research*. **33**(1), 63-73. Dostupné z: doi:[10.1111/pcmr.12818](https://doi.org/10.1111/pcmr.12818)

140. \*SIPOS, F., B. BARTA, A. SIMON et al., 2022. Survival of HT29 Cancer Cells Is Affected by IGF1R Inhibition via Modulation of Self-DNA-Triggered TLR9 Signaling and the Autophagy Response. *Pathol Oncol Res* . **28**(1610322). Dostupné z: doi:10.3389/pore.2022.1610322.
141. SIPOS, F., L. NAGY, B. BARTA, T. DANKÓ, A. SEBESTYÉN, A. KISS a G. MÚZES, 2019. 2016P - Modulation of TLR9-dependent autophagy response via inhibition of c-Met signaling influences the survival of HT29 cancer cells. *Annals of Oncology*. **30**(5), 807. Dostupné z: doi:10.1093/annonc/mdz269.034
142. STEPHAN, F., G. MARSMAN, L. BAKKER, I. BULDER, F. STAVENUITER, L. AARDEN a S. ZEERLEDER, 2013. Cooperation of Factor VII–Activating Protease and Serum DNase I in the Release of Nucleosomes From Necrotic Cells. *Arthritis & Rheumatology*. **66**(3), 686-693. Dostupné z: doi:10.1002/art.38265
143. STROUN, M., P. ANKER, P. MAURICE a J. LYAUTEY, 1989. Neoplastic Characteristics of the DNA Found in the Plasma of Cancer Patients. *Oncology*. **46**, 318-322. Dostupné z: doi:10.1159/000226740
144. STROUN, M., J. LEDERREY, A. OLSON-SAND a P. ANKER, 2001. About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. *Clin Chim Acta* . **313**(1-2), 139-42. Dostupné z: doi:10.1016/s0009-8981(01)00665-9.
145. STRZYŻ, P., 2019. STINGing revelations. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **20**(266). Dostupné z: doi:10.1038/s41580-019-0117-3
146. SUN, H., Y. HUANG, S. MEI et al., 2021. A Nuclear Export Signal Is Required for cGAS to Sense Cytosolic DNA. *Cell Reports*. **34**(1), 108586. Dostupné z: doi:10.1016/j.celrep.2020.108586
147. SUN, L., J. WU, F. DU, X. CHEN a Z. CHEN, 2012. Cyclic GMP-AMP Synthase Is a Cytosolic DNA Sensor That Activates the Type I Interferon Pathway. *Science*. **339**(6121), 786-91. Dostupné z: doi:10.1126/science.1232458
148. TADIE, J., H.-B. BAE, S. JIANG et al., 2013. HMGB1 promotes neutrophil extracellular trap formation through interactions with Toll-like receptor 4. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* . **304**(5), 342-9. Dostupné z: doi:10.1152/ajplung.00151.2012
149. \*TAKEDA, K. a S. AKIRA, 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*. **17**(1), 1-14. Dostupné z: doi:10.1093/intimm/dxh186
150. \*TAKEUCHI, O. a S. AKIRA, 2007. Recognition of viruses by innate immunity. *Immunological Reviews*. **220**(1), 214-224. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-065X.2007.00562.x
151. TAN, E. M., P. H. SCHUR, H. G. KUNKEL a R. I. CARR. Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 1966, 45(11), 1732-1740
152. [cit. 2023-03-12]. Dostupné z: doi:10.1172/JCI105479THIM-UAM, A., T.
153. PRABAKARAN, M. TANSAKUL et al., 2020. STING Mediates Lupus via the Activation of Conventional Dendritic Cell Maturation and Plasmacytoid Dendritic Cell Differentiation. *IScience*. **23**(9), 101530. Dostupné z: doi:10.1016/j.isci.2020.101530
154. TSUCHIDA, T., J. ZOU, T. SAITOH, H. KUMAR, MATSUURA, T. KAWAI a S. AKIRA, 2010. The ubiquitin ligase TRIM56 regulates innate immune responses to intracellular double-stranded DNA. *Immunity*. **33**(5), 765-76. Dostupné z: doi:10.1016/j.immuni.2010.10.013

155. TUMURKGUU, G., S. CHEN, E. MONTANO et al., 2020. Oxidative DNA Damage Accelerates Skin Inflammation in Pristane-Induced Lupus Model. *Frontiers: In immunology*. **11**. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2020.554725
156. VE, T., S. WILLIAMS a B. KOBE, 2015. Structure and function of Toll/interleukin-1 receptor/resistance protein (TIR) domains. *Apoptosis*. **20**, 250-261. Dostupné z: doi:10.1007/s10495-014-1064-2
157. VOLKMAN, H., S. CAMBIER, E. GRAY a D. STETSON, 2019. Tight nuclear tethering of cGAS is essential for preventing autoreactivity. *Elife*. **8**(47491). Dostupné z: doi:10.7554/eLife.47491.
158. WANG, H., Ch. ZANG, M. REN et al., 2020. Cellular uptake of extracellular nucleosomes induces innate immune responses by binding and activating cGMP-AMP synthase (cGAS). *Scientific Reports*. **10**(15385). Dostupné z: doi:10.1038/s41598-020-72393-w
159. WANG, J., M. DAI, Y. CUI et al., 2018. Association of Abnormal Elevations in IFIT3 With Overactive Cyclic GMP-AMP Synthase/Stimulator of Interferon Genes Signaling in Human Systemic Lupus Erythematosus Monocytes. *Arthritis Rheumatol*. **70**(12), 2036-2045. Dostupné z: doi:10.1002/art.40576.
160. \*WANG, J., J. GAO, C. HUANG et al., 2022b. Roles of AIM2 Gene and AIM2 Inflammasome in the Pathogenesis and Treatment of Psoriasis. *Frontiers: In Genetics*. **13**. Dostupné z: doi:10.3389/fgene.2022.929162
161. WANG, L., S. LI, N. WANG et al., 2022a. DNA mechanical flexibility controls DNA potential to activate cGAS-mediated immune surveillance. *Nature Communications*. **13**(7107). Dostupné z: doi:10.1038/s41467-022-34858-6
162. WEST, A., G. SHADEL a S. GHOSH, 2011. Mitochondria in innate immune responses. *Nature reviews Immunology*. **11**(6), 389-402. Dostupné z: doi:10.1038/nri2975.
163. WOEZFELD, T., F. FINKERNAGEL, S. REINARTZ et al., 2018. Proteotranscriptomics Reveal Signaling Networks in the Ovarian Cancer Microenvironment. *Mol Cell Proteomics*. **17**(2), 270-289. Dostupné z: doi:10.1074/mcp.RA117.000400.
164. WORTHMANN, M., M. ARSHAD, M. HAKIMI, D. BÖCKLER a S. DIHLMANN, 2020. Deficiency in Aim2 affects viability and calcification of vascular smooth muscle cells from murine aortas and angiotensin-II induced aortic aneurysms. *Mol Med*. **26**(87). Dostupné z: doi:10.1186/s10020-020-00212-z
165. WU, J., L. SUN, X. CHEN, F. DU, H. SHI, Ch. CHEN a Z. CHEN, 2013. Cyclic GMP-AMP Is an Endogenous Second Messenger in Innate Immune Signaling by Cytosolic DNA. *Science*. **339**(6121), 826-30. Dostupné z: doi:10.1126/science.1229963.
166. WU, Q., H. TSAI, H. ZHU a D. WANG, 2022. The Entanglement between Mitochondrial DNA and Tumor Metastasis. *Cancers*. **14**(8), 1862. Dostupné z: doi:10.3390/cancers14081862
167. WU, W., M. SAMOSZUK, S. COMHAIR et al., 2000. Eosinophils generate brominating oxidants in allergen-induced asthma. *Journal of Clinical Investigation*. **105**(10), 1455-1463. Dostupné z: doi:10.1172/JCI9702
168. XU, L., J. ZHOU, J. CHE, H. WANG, W. YANG, W. ZHOU a H. ZHAO, 2021. Mitochondrial DNA enables AIM2 inflammasome activation and hepatocyte pyroptosis

- in nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* . **320**(6), 1034-1044. Dostupné z: doi:10.1152/ajpgi.00431.2020
169. YAN, Y., Q. GUO, F. WANG et al., 2021. Cell-Free DNA: Hope and Potential Application in Cancer: Hope and Potential Application in Cancer. *Frontiers*. **9**. Dostupné z: doi:10.3389/fcell.2021.639233
170. YONEYAMA, M., K. ONOMOTO, M. JOGI, T. AKABOSHI a Takashi FUJITA, 2015. Viral RNA detection by RIG-I-like receptors. *Current Opinion in Immunology*. **32**, 48-53. Dostupné z: doi:10.1016/j.coi.2014.12.012
171. YOUSEFI, S., J. GOLD, N. ANDINA et al., 2008. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nature Medicine*. **14**, 949-953. Dostupné z: doi:doi.org/10.1038/nm.1855
172. YOUSEFI, S., M. MORSHED, P. AMINI, D. STOJKOV, D. SIMON, S. VON GUNTEN, T. KAUFMANN a H.-U. SIMON, 2015. Basophils exhibit antibacterial activity through extracellular trap formation. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **70**(9), 1184-1188. Dostupné z: doi:doi.org/10.1111/all.12662
173. YUAN, L., Y. MAO, W. LUO, W. WU, H. XU, X. WANG a Y. SHEN, 2017. Palmitic acid dysregulates the Hippo–YAP pathway and inhibits angiogenesis by inducing mitochondrial damage and activating the cytosolic DNA sensor cGAS–STING–IRF3 signaling mechanism. *Signal Transduction*. **292**(36), 15002-15015. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M117.804005
174. YU, E., P. CALVERT, J. MERCER et al., 2013b. Mitochondrial DNA Damage Can Promote Atherosclerosis Independently of Reactive Oxygen Species Through Effects on Smooth Muscle Cells and Monocytes and Correlates With Higher-Risk Plaques in Humans. *Circulation*. **128**, 702-712. Dostupné z: doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.002271
175. \*YU, L. a P. LIU, 2021. Cytosolic DNA sensing by cGAS: regulation, function, and human diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy volume*. **6**(170). Dostupné z: doi:10.1038/s41392-021-00554-y
176. YU, S.C.Y., S. LEE, P. JIANG, T. LEUNG, K. CHAN, R. CHIU a Y. LO, 2013a. High-resolution profiling of fetal DNA clearance from maternal plasma by massively parallel sequencing. *Clinical Chemistry*. **59**(8), 1228-37. Dostupné z: doi:10.1373/clinchem.2013.203679.
177. ZHANG, J.-Z., Z. LIU, J. LIU, J.-X. REN a T.-S. SUN. Mitochondrial DNA induces inflammation and increases TLR9/NF-κB expression in lung tissue. *International journal of molecular medicine*. 2014, 33(4), 817-24. Dostupné z: doi:10.3892/ijmm.2014.1650.
178. ZHANG, R., K. NAKAHIRA, X. GUO, A. CHOI a Z. GU, 2016. Very Short Mitochondrial DNA Fragments and Heteroplasmy in Human Plasma. *Scientific Reports*. **6**(36097). Dostupné z: doi:10.1038/srep36097.
179. ZHAO, S., Y. ZHANG, Q. ZHANG, F. WANG a D. ZHANG, 2014. Toll-Like Receptors and Prostate Cancer. *Frontiers: In immunology*. **5**(352). Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2014.00352
180. ZHENG, Y., K. CHAN, H. SUN et al., 2011. Nonhematopoietically derived DNA is shorter than hematopoietically derived DNA in plasma: a transplantation model: a transplantation model. *Clinical Chemistry*. **58**(3), 549-58. Dostupné z: doi:10.1373/clinchem.2011.169318.

181. ZHIVOTOSKY, B. a S. ORRENIUS, 2001. Assessment of apoptosis and necrosis by DNA fragmentation and morphological criteria. *Current protocols in cell biology*. (18). Dostupné z: doi:10.1002/0471143030.cb1803s12
182. \*ZHOU, W., D. RICHMOND-BUCCOLA, Q. WANG a P. KRANTUSCH, 2022. Structural basis of human TREX1 DNA degradation and autoimmune disease. *Nature Communications*. **13**(4277). Dostupné z: doi:10.1038/s41467-022-32055-z
183. \*ZHU, H., M. ZHAO, Ch. CHANG, V. CHAN, Q. LU a H. WU, 2021. The complex role of AIM2 in autoimmune diseases and cancers. *Immunity, Inflammation and Disease*. **9**(3), 649-665. Dostupné z: doi:10.1002/iid3.443

\* originální citace převzata ze sekundárního zdroje