

**Univerzita Karlova v Praze**

**1. lékařská fakulta**

Autoreferát disertační práce



Studium specifické protinádorové imunitní reakce u pacientů s  
karcinomem plic

Dagmar Myšíková

2018

## **Doktorské studijní programy v biomedicině**

*Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky*

Obor: Experimentální chirurgie

Předseda oborové rady:

prof. MUDr. Jaroslav Živný, DrSc

Školící pracoviště:

III.chirurgická klinika 1.LF UK a FNM

Školitel: prof. MUDr. Robert Lischke Ph.D.

Konzultant: prof. MUDr. Radek Špíšek Ph.D.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

## *Obsah*

1	Úvod .....	4
1.1	Specifická humorální odpověď proti karcinomu plic .....	4
1.2	Vakcíny z dendritických buněk ( DCVAC) u pacientů s NSCLC.....	5
2	Hypotézy a cíle práce .....	6
2.1	Humorální protinádorová imunitní odpověď: frekvence specifických protilátek.....	6
2.2	Celulární protinádorová imunitní odpověď: in vitro imungenicita a stabilita vakcíny z dendritických buněk .....	7
3	Materiál a metodika.....	8
3.1	Metody ve studii specifické humorální protinádorové imunitní odpovědi .....	8
3.1	Metody ve studii specifické celulární protinádorové imunity .....	8
4	Výsledky .....	9
4.1	Výsledky ve studii specifické humorální protinádorové odpovědi ...	9
4.2	Výsledky ve studii specifické celulární protinádorové odpovědi ....	12
5	Diskuse .....	14
5.1	Diskuse specifické protinádorové humorální odpovědi.....	14
5.2	Diskuse specifické protinádorové celulární odpovědi .....	15
6	Závěry.....	16
6.1	Závěry týkající se specifické protinádorové humorální odpovědi ..	16
6.2	Závěry týkající se specifické protinádorové celulární odpovědi .....	16
7	Použitá literatura .....	17
8	Seznam publikací doktoranda:.....	19

## *Abstrakt*

Karcinom plic je celosvětově vedoucí příčinou úmrtí pro maligní onemocnění. Pochopení biologických procesů specifické protinádorové imunitní odpovědi zůstává prioritním zájmem a nezbytností pro navržení úspěšných imunoterapeutických strategií. V teoretické části této práce se zabýváme složkami imunitního systému, které se účastní protinádorové odpovědi, a jejich rolí v imunoterapii. V praktické části popisujeme dvě studie studující různé aspekty protinádorové imunitní odpovědi. První ze dvou studií je zaměřena na humorální složku specifické protinádorové odpovědi a prospektivně analyzuje sérové frekvence protinádorových protilátek NY-ESO-1, Her2/*neu* and MAGE-A4 u 121 pacientů s NSCLC. V této studii poprvé prokazujeme, že kouření tabáku významně ovlivňuje specifickou humorální imunitní odpověď, frekvence NY-ESO-1 protilátek je signifikantně vyšší v séru kuřáků a ex-kuřáků. Druhá ze dvou studií je více zaměřena na T buněčnou složku specifické protinádorové odpovědi a testuje vakcínu připravenou z dendritických buněk prezentujících antigeny buněk karcinomu plic, usmrcených vysokým hydrostatickým tlakem (DC-HHP vakcína). Vysoký hydrostatický tlak (HHP) indukuje v nádorových buňkách imunogenní smrt, která je stěžejní pro navození účinné protinádorové imunitní odpovědi.

## *Abstract*

Lung cancer is the leading cause of cancer mortality worldwide. Understanding biological processes of specific antitumor immune response remains of an eminent interest and represents necessity for designing successful antitumor immunotherapeutic strategies. The theoretical part of the thesis describes components of the immune system that are involved in antitumor response and discusses their role in immunotherapy. In the practical part of the thesis, two studies studying different aspects of anticancer immune response are described. The first study is focused on the humoral component of the specific antitumor response and prospectively analyses serum frequency of antitumor antibodies against NY-ESO-1, Her2/*neu* and MAGE-A4 antigens in 121 patients with NSCLC. Here it was shown for the first time that tobacco smoking significantly increases the frequency of NY-ESO-1 antibodies in sera of smokers in comparison to ex-smokers and non-smokers. The second study is focused on the cellular component of the specific antitumor response investigating the activity of the dendritic cell-based vaccine to present antigens of lung cancer cells killed by high hydrostatic pressure (DC-HHP vaccine) to T cells. High hydrostatic pressure (HHP) induces immunogenic death in tumor cells, which is crucial for induction of an effective antitumor immune response.

# 1 Úvod

Karcinom plic je nejčastější příčinou úmrtí na maligní onemocnění s hodnotou pětiletého přežití 5% až 15%. S počtem nových případů rakoviny plic stoupajícím každý rok o 3% je kouření tabákových výrobků hlavním rizikovým faktorem odpovědným za bezmála 90% nově diagnostikovaných karcinomů.

## 1.1 *Specifická humorální odpověď proti karcinomu plic*

Sérologická detekce autoprotilátek proti nádorově specifickým (TSA) nebo s nádorem asociovaným antigenům (TAA) představuje jednoduchý nástroj nejen pro identifikaci prognostických markerů, ale také pro hodnocení imunitní odpovědi na terapii u pacientů s karcinomem (Kobold S et al, 2010). U karcinomu plic je jediný komerčně dostupný test na autoprotilátky, test skládající se ze sedmi antigenů (p53, NY-ESO-1, CAGE, GBU4-5, SOX2, HuD and MAGE-A4), který byl nedávno ověřen ve studii případů-kontrol (1613 pacientů) a může být použit jako doplňkový nástroj k CT antigenům (cancer testis antigens, CTA) k detekci časných stádií onemocnění. Nicméně, i když tento test dosahuje vynikající 90% specifity, jeho sensitivita zůstává stále relativně nízká (přibližně 41%) (Jett JR et al, 2014). Přes kontroverzní výsledky prognostického nebo diagnostického významu autoprotilátek, pochopení vlastností a důležitosti nádorově specifické humorální nebo buněčné imunitní odpovědi zůstává

nezbytnou podmínkou pro rozvoj strategií k časně detekci a cílené terapii plicního karcinomu.

## 1.2 *Vakcíny z dendritických buněk (DCVAC) u pacientů s NSCLC*

Podstatou je separace pacientových dendritických buněk a jejich následná aktivace ex vivo pomocí nádorových antigenů. Aktivované buňky jsou zpětně aplikovány pacientovi. V klinických studiích bylo hodnoceno několik imunoterapeutických přístupů s různou úspěšností, včetně imunoterapie s dendritickými buňkami (DC) generovanými ex vivo, které byly stimulovány rekombinantními antigeny asociovanými s nádory (TAA) nebo syntetickými peptidy pocházejícími z TAA, celými usmrcenými nádorovými buňkami, buněčnými lyzáty nebo TAA-kódující mRNA). DC mají významnou roli při vyvolání a přizpůsobování imunitní odpovědi a ukázaly se jako klíčové při indukci protinádorové imunity. Bylo popsáno několik protinádorových chemoterapeutik a fyzikálních modalit indukujících imunogenní buněčnou smrt (ICD). Nádorové buňky podstupující ICD aktivují různé imunitní buňky včetně DC ke stimulaci protinádorové imunitní odpovědi. Lidské DC odvozené z monocytů a pulsované s nádorovými buňkami usmrcenými HHP zvýšily expresi molekul spojených s dozráváním a produkcí cytokinů, které vedly ke stimulaci CD8<sup>+</sup> a CD4<sup>+</sup> T buněk produkujících IFN- $\gamma$  in vitro (Fučíková J et al., 2014).

## 2 Hypotézy a cíle práce

### 2.1 *Humorální protinádorová imunitní odpověď: frekvence specifických protilátek*

Cíl : určit frekvence specifických protinádorových protilátek NY-ESO-1, Her2/*neu* a MAGE-A4 v séru pacientů s NSCLC a zjistit zda tyto frekvence korelují s některou z klinicko-patologických charakteristik souboru pacientů.

#### Hypotézy:

- Frekvence protilátek NY-ESO-1, Her2/*neu* a MAGE-A4 jsou vyšší v séru pacientů oproti frekvencím u kontrolních pacientů.
- Frekvence protilátek NY-ESO-1, Her2/*neu* a MAGE-A4 v séru pacientů korelují s některou z klinicko-patologických charakteristik souboru pacientů s NSCLC: věk, pohlaví, histologický subtyp NSCLC, stupeň diferenciacie nádoru, stádium onemocnění, anamnéza kouření.
- Séropozitivita protilátek NY-ESO-1, Her2/*neu* a MAGE-A4 v séru pacientů s NSCLC se vyskytuje v přítomnosti nádorů s mRNA expresí odpovídajících antigenů.



## 2.2 *Celulární protinádorová imunitní odpověď: in vitro imunogenicita a stabilita vakcíny z dendritických buněk*

Cílem: ověřit imonogenicitu a stabilitu vakcíny z dendritických buněk prezentující antigeny nádorových buněk NSCLC usmrcených hydrostatickým tlakem (DC-HHP vakcína proti karcinomu plic).

### Hypotézy:

- Vysoký hydrostatický tlak navozuje v nádorových buňkách NSCLC imunogenní buněčnou smrt.
- DC-HHP vakcína proti karcinomu plic manifestuje zralý fenotyp, produkuje prozánětlivé cytokiny a zvyšuje chemotaktickou migraci
- DC-HHP vakcína proti karcinomu plic vykazuje vyšší maturaci a cytokinovou produkci v mediu obsahujícím sérum po následné LPS a CD40L stimulaci
- DC-HHP vakcína proti karcinomu plic stimuluje efektorové T lymfocyty
- DC-HHP vakcína proti karcinomu plic individualizovaná u konkrétních pacientů s NSCLC indukuje nádor specifické buněčné odpovědi

### 3 Materiál a metodika

Podrobně jsou materiál a metody popsány v textu disertační práce.

#### 3.1 *Metody ve studii specifické humorální protinádorové imunitní odpovědi*

Přítomnost protilátek proti třem nádorovým antigenům HER2/*neu*, NY-ESO-1 a MAGE-A4 v séru pacientů s NSCLC ( 121) a v séru kontrolních pacientů (57) byla detekována metodou ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Kompletní sada vzorků pro qPCR analýzu exprese antigenů NY-ESO-1, HER2/*neu*, MAGE-A4, která obsahuje sérum, nádorovou a nenádorovou tkáň byla získána pouze od 40 pacientů v kohortě II (podrobný popis qPCR analýzy v disertační práci). Data byla zpracována profesionálním statistikem v programu StatSoft STATISTICA (verze 12)

#### 3.1 *Metody ve studii specifické celulární protinádorové imunity*

Popisujeme generování vakcíny proti NSCLC založené na dendritických buňkách s použitím imunogenních buněčných linií NSCLC H520 a H522, které jsou usmrceny HHP, jako zdroje TAA a tato data představují preklinické údaje pro probíhající klinickou studii fáze I / II NSCLC, která kombinuje aktivní buněčnou imunoterapii na bázi DC s chemoterapií a imunitními enhancery (NCT02470468). Dendritické buňky byly získány z PBMC zdravých dárců a 8 pacientů s

NSCLC, maturovány, pulzovány s nádorovými líniami usmrčenými vysokým hydrostatickým tlakem. Dozrávaní DC buněk po pulzaci nádorovými líniami usmrčenými HHP a po stimulaci poly (I: C) byla hodnocena průtokovou cytometrií. Migrační kapacita DC-HHP vakcíny směrem k chemokinům CCL19 a CCL21 byla hodnocena 24 hodin po zrání za použití testů transwell. Data byla zpracována profesionálním statistikem v programu GraphPad PRISM 6.

## 4 Výsledky

### 4.1 *Výsledky ve studii specifické humorální protinádorové odpovědi*

Nejprve jsme hodnotili frekvenci autoprotilátek proti NY-ESO-1, HER2/*neu* a MAGE-A4 u pacientů s NSCLC kohorty I (n = 57) a kontrolních vzorků (n = 57). Pouze protilátky proti NY-ESO-1, ale nikoliv proti HER2/*neu* a MAGE-A4 byly signifikantně zvýšeny u 26,3% (15/57) pacientů s NSCLC ve srovnání s 3,5% (2/57) u kontrolní skupiny (tabulka 7). Také jsme zjistili, že signifikantně vyšší seropozitivita NY-ESO-1 byla u pacientů s NSCLC a zároveň aktivních kuřáků (tabulka 7). **Jelikož se jedná o první zprávu o prevalenci protilátek NY-ESO-1 u pacientů aktivních kuřáků s NSCLC,** rozhodli jsme se potvrdit výsledky u pacientů s NSCLC v kohortě II (n = 64). NY-ESO-1 autoprotilátky byly signifikantně zvýšeny u 14% (9/64) pacientů s NSCLC z kohorty II ve srovnání s re-analyzovanou

1,8% (1/57) kontrolní skupinou (tabulka 7). **Celkem bylo 19,8% (24/121) pacientů s NSCLC pozitivní na protilátky NY-ESO-1.** Vzhledem k nízkému počtu seropozitivních pacientů NY-ESO-1 (7 kuřáků, 2 ex-kuřáci, 0 nekuřáků) v kohortě II jsme nebyli schopni zjistit významnou korelaci s aktivní historií kouření. Statistické vyhodnocení seropozitivních kuřáků NY-ESO-1 z celkového počtu 121 pacientů s NSCLC (kohorta I + II) však potvrdilo, že **přítomnost NY-ESO-1 autoprotilátek pozitivně koreluje s aktivní historií kouření u pacientů s NSCLC.** Z 65 kuřáků s NSCLC bylo 27,7% (18/65) pacientů NY-ESO-1 pozitivních, na rozdíl od 17,6% (6/34) ex-kuřáků a 0% (0/19) nekuřáků (obrázek 2A).

**Obrázek 2:** A) Rozdíl ve frekvenci NY-ESO-1 autoprotilátek mezi skupinou 121 pacientů s NSCLC a kontrolami vzhledem k historii kouření B) Relativní exprese HER2/*neu*, NY-ESO-1 a MAGE-A4 antigenů v nádoru a nenádorové tkáni u NSCLC pacientů detekované pomocí qPCR. Tu = nádor; nTu = nenádorová tkáň.



**Tabulka 7:** Seropozitivita autoprotilátek proti NY-ESO-1, HER2/*neu* and MAGE-A4

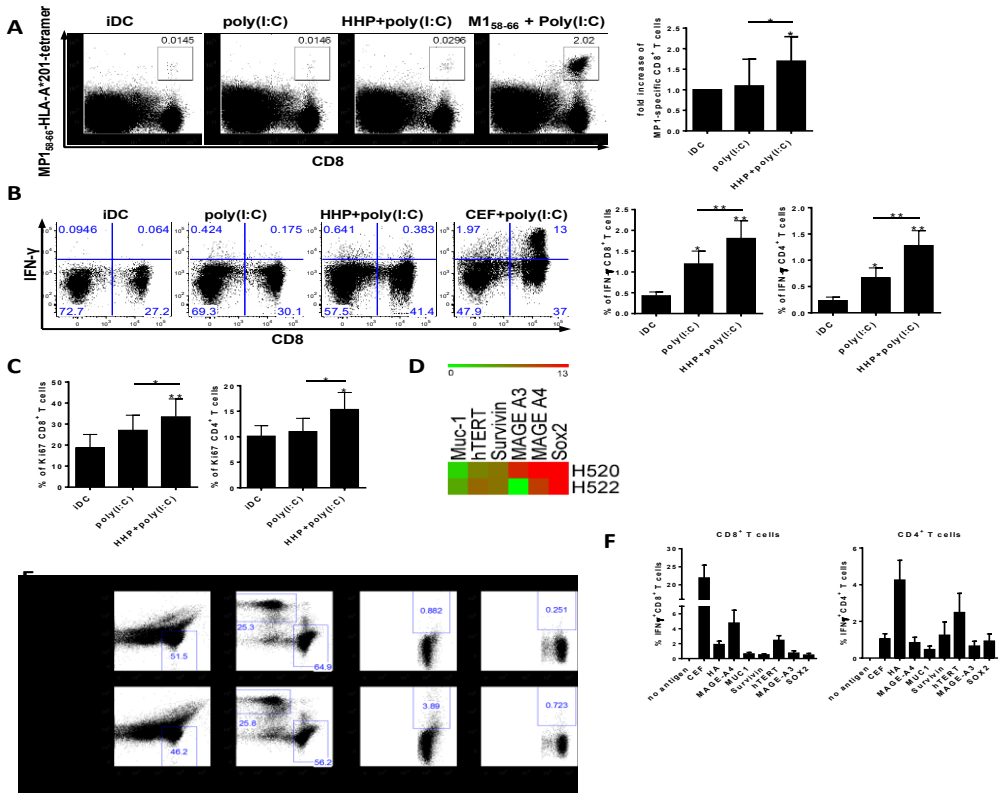
Skupina NSCLC pacientů		NSCLC	Kontroly	Hladina významnosti	
NY-ESO-1 +					
Kohorta I	n=57	n=15/57 (26.3%)	n=2/57 (3.5%)	<b>p=0.00063</b>	
Kohorta II	n=64	n=9/64 (14%)	n=1/57 (1.8%)	<b>p=0.009</b>	
Celkem	n=121	n=24/121 (19.8%)	n=3/114 (2.6%)	<b>p=0.00084</b>	
HER2/ <i>neu</i> +					
Kohorta I	n = 57	n=3/57 (5.3%)	n=2 /57(3.5%)	p=0.647	
MAGE-A4 +					
Kohorta I	n = 57	n=5/57 (8.8%)	n=2/57 (3.5%)	p=0.242	
Skupina NSCLC pacientů		Kuřák	Ex-kuřák	Nekuřák	Hladina významnosti
NY-ESO-1 +					
Kohorta I	n=57	n=11/30 (36.7%)	n=4/18 (22.2%)	n=0/9 (0%)	<b>p=0.027</b>
Kohorta II	n=64	n= 7/35 (20%)	n=2/16 (12.5%)	n=0/10 (0%)	p=0.27
Celkem	n=121	n= 18/65 (27.7%)	n= 6/34(17.6%)	n=0/19 (0%)	<b>p=0.028</b>
HER2/ <i>neu</i> +					
Kohorta I	n = 57	n=1/30 (3.3%)	n=2/18 (11.1%)	n=0/9 (0%)	p=0.518
MAGE-A4 +					
Kohorta I	n = 57	n=3/30 (10%)	n=2/18 (11.1%)	n=0/9 (0%)	p=0.780

Dále jsme analyzovali expresi antigenů NY-ESO-1, HER2/*neu* a MAGE-A4 pomocí qPCR v nádorových a ne-nádorových tkáních od pacientů s NSCLC (obrázek 2B). Byla zjištěna **statisticky významně vyšší exprese NY-ESO-1 u 6,3% (4/64) a MAGE-A4 u 35,1% (20/57) u pacientů se SCC** oproti pacientům s AC (tabulka 8). Pouze exprese MAGE-A4 byla **silně asociována s historií kouření a s mužským pohlavím** (45,5% mužů oproti 19,2% žen)

Zjistili jsme **pozitivní korelaci mezi expresí NY-ESO-1 mRNA a přítomností NY-ESO-1 autoprotilátek u 5% (2/40) pacientů** paralelně analyzovaných na přítomnost NY-ESO-1 autoprotilátek v séru a NY-ESO-1 exprese mRNA v nádorech.

#### 4.2 *Výsledky ve studii specifické celulární protinádorové odpovědi*

- DC-HHP vakcína manifestuje zralý fenotyp, produkuje prozánětlivé cytokiny a zvyšuje chemotaktickou migraci.
- DC-HHP vakcína vykazuje vyšší maturaci a cytokinovou produkci v mediu obsahujícím sérum po následné LPS a CD40L stimulaci
- DC-HHP vakcína stimuluje antigen-specifické CD8<sup>+</sup> T lymfocyty a zvyšuje počet CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg lymfocytů
- DC-HHP vakcína připravená z monocytů pacientů s NSCLC indukuje nádor specifické CD8<sup>+</sup> a CD4<sup>+</sup> T lymfocyty ( Obr. 7)



**Obrázek 7:** DC-HHP vakcína připravená z monocytů pacientů s NSCLC indukuje nádor specifické CD8<sup>+</sup> a CD4<sup>+</sup> T lymfocyty  $4 \times 10^4$  IDC, DC pulzovaných s rozmraženými buňkami karcinomu plic usmrčených HHP nebo MP1 exprimujících A549 a poly (I: C) [HHP + poly (I: C)] nebo stimulovaných pouze poly (I: C) [Poly (I: C)] po dobu 24 hodin byly následně přidány k  $2 \times 10^5$  autologním T buňkám od pacientů s NSCLC a následně kultivovány po dobu 7 dnů. **(A)** MP1<sub>58-66</sub>-specifické CD8<sup>+</sup> T buňky byly bez restimulace detekovány průtokovou cytometrií barvením MP1<sub>58-66</sub>-HLA-A\*201 Tetramer Staining. Bodové grafy zobrazují 4 dárců. Grafy představují průměr  $\pm$  směrodatná odchylka ze 4 dárců n = 2. **(B)** Buňky CD8<sup>+</sup> a CD4<sup>+</sup> produkující IFN- $\gamma$  byly hodnoceny průtokovou cytometrií po jednom kole restimulace s čerstvě připravenými DC od pacientů s NSCLC. Procento je zobrazeno jako procento buněk produkujících IFN- $\gamma$  z CD8<sup>+</sup> nebo CD4<sup>+</sup> buněk, proto neodpovídá procentům v bodových grafech. **(C)** Proliferace T buněk (Ki-67) byla stanovena bez restimulace průtokovou cytometrií. Bodové grafy zobrazují 6 pacientů. Grafy ukazují průměr  $\pm$  směrodatnou odchylku u 6 dárců v duplikacích. Výsledky byly považovány za statisticky významné, pokud \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 nebo \*\*\* p < 0,001. **(D)** qPCR analýza exprese Mucin-1, hTERT, Survivinu, MAGE-A3 a MAGE-A4 u buněčných linií H520 a H522 (n = 3, v duplikacích) **(E)** Strategie gatingu pro detekci T buněk produkujících IFN- $\gamma$  specifických pro nádorový antigen u pacientů s NSCLC. Obrázek ukazuje jeden reprezentativní vzorek od pacienta s NSCLC a T-buňky specifické pro MAGE-A4. **(F)** Kvantitativní vyhodnocení T buněk specifických pro nádorový antigen a produkujících IFN- $\gamma$  u 36 pacientů s NSCLC. Procento negativních kontrol (žádný antigen) bylo odečteno od vzorků stimulovaných antigenními peptidy.

## 5 Diskuse

### 5.1 *Diskuse specifické protinádorové humorální odpovědi*

Zjistili jsme statisticky významně vyšší frekvence protilátek NY-ESO-1, ale už ne protilátek HER2/*neu* a MAGE-A4 u pacientů s NSCLC oproti pacientům z kontrolní skupiny bez nádorového onemocnění. Zjistili jsme, že frekvence specifických protilátek proti NY-ESO-1 (19,8%, n = 24) zjištěné v naší studii u 121 pacientů s NSCLC byly srovnatelné s frekvencemi 20% a 23% pro NY-ESO-1 publikovanými v předchozích dvou studiích u pacientů s karcinomem plic (Chapman et al, 2008; Tureci et al., 2006). Pozitivní korelace mezi NY-ESO-1 mRNA expresí v nádorech a přítomností NY-ESO-1 autoprotiátek byla zjištěna pouze u 5% (2/40) pacientů, kde byly provedeny paralelně sérové a nádorové analýzy. Nebyla zjištěna NY-ESO-1 mRNA exprese u zbývajících 3 NY-ESO-1 seropozitivních pacientů s dostupnými vzorky nádorové tkáně. Ukázalo se, že také u nádorů s obvykle vysokou expresí NY-ESO-1 jako je karcinom vaječníků nebo melanom, 5-15% pacientů nemá detekovatelnou úroveň exprese NY-ESO-1 v nádorových buňkách navzdory NY-ESO-1 séropozitivitě (Stockert et al, 1998; Gnjatic et al., 2006). **Korelace frekvence autoprotiátek a anamnézy kouření ukázala signifikantně vyšší frekvenci protilátek NY-ESO-1 u aktivních kuřáků oproti ex-kuřákům a nekuřákům u pacientů s NSCLC ve srovnání s kontrolní skupinou.** Ve dvou studiích byla zjištěna významná asociace



CT antigenů (cancer testis antigenů) s anamnézou kouření (Gure et al., 2005; Kim et al., 2012), ale tvorba protilátek NY-ESO-1, která by mohla být indukována kouřením, **nebyla dosud popsána.**

## 5.2 *Diskuse specifické protinádorové celulární odpovědi*

Aktivní buněčná imunoterapie založená na DC představuje velké pole imunoterapeutických přístupů k léčbě malignit, nicméně její použití je poměrně omezené v imunoterapii plicního karcinomu. V naší studii jsme prokázali, že **DC- HHP vakcína proti karcinomu plic, připravená v médiu bez séra s imunogenními buněčnými liniemi plicního karcinomu usmrcenými HHP a stimulovaná poly(I:C) vykazuje funkční plasticitu a schopnost stimulovat nádorově specifické a IFN- $\gamma$  produkující CD8<sup>+</sup> a CD4<sup>+</sup> T buňky pacientů s NSCLC.** Úloha CD8<sup>+</sup> T buněk v protinádorové imunitě je dobře známa, avšak v současné době není jasné, zda CD4<sup>+</sup> T buňky indukované CD-HHP vakcínou proti karcinomu plic mohou zprostředkovat určitý protinádorový účinek (Perez-Diez et al., 2007). Pozorovali jsme produkci IFN- $\gamma$  a proliferaci CD4<sup>+</sup> T buněk od pacientů s NSCLC a proto je lákavé spekulovat, že tyto T buňky mohou hrát roli při formování protinádorových odpovědí po imunoterapii DC-HHP vakcínou proti karcinomu plic.

## 6 Závěry

### 6.1 *Závěry týkající se specifické protinádorové humorální odpovědi*

Poprvé jsme zde ukázali, že autoprotilátky proti CT antigenu NY-ESO-1 korelují s historií kouření u pacientů s NSCLC.

### 6.2 *Závěry týkající se specifické protinádorové celulární odpovědi*

Ukázali jsme, že DC-HHP vakcína proti karcinomu plic je imunologicky aktivní a vykazuje funkční plasticitu vůči imunostimulačnímu T<sub>H</sub>1 polarizujícímu fenotypu in vitro.

## 7 Použitá literatura

1. Kobold S, Luetkens T, Cao Y, Bokemeyer C, Atanackovic D. Prognostic and diagnostic value of spontaneous tumor-related antibodies. *Clin Dev Immunol.* 2010;2010:721531
2. Jett JR, Peek LJ, Fredericks L, Jewell W, Pingleton WW, Robertson JF. Audit of the autoantibody test, EarlyCDT(R)-lung, in 1600 patients: an evaluation of its performance in routine clinical practice. *Lung Cancer.*2014;83:51–55.
3. Fucikova J, Moserova I, Truxova I, Hermanova I, Vancurova I, Partlova S, et al. High hydrostatic pressure induces immunogenic cell death in human tumor cells. *International journal of cancer Journal international du cancer.* 2014 Sep 1;135(5):1165-77. PubMed PMID: 24500981.
4. Chapman CJ, Murray A, McElveen JE, Sahin U, Luxemburger U, Tureci O, et al. Autoantibodies in lung cancer: possibilities for early detection and subsequent cure. *Thorax* 2008; 63:228-33.
5. Tureci O, Mack U, Luxemburger U, Heinen H, Krummenauer F, Sester M, et al. Humoral immune responses of lung cancer patients against tumor antigen NY-ESO-1. *Cancer letters* 2006; 236:64-71.
6. Stockert E, Jager E, Chen YT, Scanlan MJ, Gout I, Karbach J, et al. A survey of the humoral immune response of cancer patients to a panel of human tumor antigens. *The Journal of experimental medicine* 1998; 187:1349-54.

7. Gnjatic S, Nishikawa H, Jungbluth AA, Gure AO, Ritter G, Jager E, et al. NY-ESO-1: review of an immunogenic tumor antigen. *Advances in cancer research* 2006; 95:1-30.
8. Gure AO, Chua R, Williamson B, Gonen M, Ferrera CA, Gnjatic S, et al. Cancer-testis genes are coordinately expressed and are markers of poor outcome in non-small cell lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2005; 11:8055-62.
9. Kim YD, Park HR, Song MH, Shin DH, Lee CH, Lee MK, et al. Pattern of cancer/testis antigen expression in lung cancer patients. *International journal of molecular medicine* 2012; 29:656-62.
10. Perez-Diez A, Joncker NT, Choi K, Chan WF, Anderson CC, Lantz O, et al. CD4 cells can be more efficient at tumor rejection than CD8 cells. *Blood*. 2007 Jun 15;109(12):5346-54. PubMed PMID: 17327412. Pubmed Central PMCID: 1890845.

## 8 Seznam publikací doktoranda:

1. publikace in extenso, které jsou podkladem disertace s IF

Myšíková D, Adkins I, Nad'a H, Palata O, Šimonek J, Pozniak J, Kolařík J, Skallová-Fialová A, Špíšek R, Lischke R. Case-control study: *Smoking history affects the production of tumor antigen specific antibodies NY-ESO-1 in patients with lung cancer in comparison with cancer disease free group.* J Thorac Oncol. 2017 Feb;12(2):249-257. **IF 6.595 (2016), Cena Purkyňova nadačního fondu 2016**

Hradilova N, Sadilkova L, Palata O, Mysikova D, Mrazkova H, Lischke R, Spisek R, Adkins I. *Generation of dendritic cell-based vaccine using high hydrostatic pressure for non-small cell lung cancer immunotherapy.* PLoS One. 2017 Feb 10;12(2):e0171539. **IF 2.806 (2016)**

2. publikace in extenso bez vztahu k tématu disertace s IF

Myšíková D., Svobodová T., Lischke R. *Tracheal diverticulum with decompensation after 8 years of conservative therapy requiring surgical solution.* Pediatr Pulmonol, 2015, 50(12), E44-7 (ISSN: 8755-6863). **IF = 2.85 (2015), Jedličkova cena České chirurgické společnosti 2015**

3. publikace in extenso bez vztahu k tématu disertace bez IF

Myšíková, D., Šimonek, J., Stolz, A., Lischke, R.: *Reexpansion pulmonary oedema after drainage of a long-term spontaneous pneumothorax - a case report.* Rozhl Chir. 2013; 92(6):333-6 (ISSN: 0035-9351)

Kolařík J; Myšíková D; Pozniak J; Simonek J; Schützner J; Lischke R: *Thoracic sarcoma, is indication for surgery sensible? Case reports*. Rozhl Chir. 2014; 93(8):432-5 (ISSN: 0035-9351)

Pozniak J; Kolařík J; Myšíková D; Šimonek J; Schützner J; Pafko P; Lischke R. *The first lung re-transplantation in the Czech Republic*. Rozhl Chir. 2015; 94(3):135-8 (ISSN: 0035-9351)