

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie



Linda Kobosilová

**Expres markerů imunogenní buněčné smrti na buňkách karcinomu plic**  
Expression of immunogenic cell death markers on lung cancer cells

Diplomová práce

Vedoucí práce: **Prof. MUDr. Špišek Radek, Ph.D.**

Praha, 2014

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracovala samostatně pod vedením Prof. MUDr. Radka Špíška, Ph.D., a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze,

.....  
Linda Kobosilová

Děkuji svému školiteli Prof. MUDr. Radku Špíškovi, Ph.D. za čas a trpělivost, které mi při sepisování této práce věnoval. Dále bych chtěla poděkovat celému výzkumnému týmu společnosti Sotio za vytvoření příjemného pracovního kolektivu a ochoty při zasvěcování do pracovního procesu. Mé díky pak patří především RNDr. Ireně Moserové, PhD. bez jejíž pomoci by tato práce snad ani nevznikla. V neposlední řadě děkuji své rodině a příteli za psychickou podporu.

## Abstrakt

Imunogenní buněčná smrt (ICD) je charakterizována přítomností specifických molekul, mezi které patří na povrchu exprimovaný kalretikulin (CRT) a proteiny teplotního šoku HSP70 a HSP90. Dalším charakteristickým znakem je uvolnění ATP a HMGB1 do extracelulárního prostoru. Pro indukci ICD v plicních nádorových buňkách byl použit vysoký hydrostatický tlak (HHP), HHP indukuje povrchovou expresi imunogenních markerů CRT, HSP70 a HSP90, a sekreci ATP do extracelulárního prostředí. Pulzací dendritických buněk (DC) nádorovými buňkami ošetřenými HHP dochází k fenotypické maturaci charakteristické zvýšenou expresí maturační molekuly CD83, kostimulačních molekul CD80 a CD86, chemokinového receptoru CCR7 a MHC glykoproteinu II. třídy HLA-DR. Pulzované DC současně vykazují zvýšenou fagocytózu nádorových buněk ošetřených HHP a indukují výrazně nižší procento regulačních T lymfocytů oproti nematurovaným DC. V plicních nádorových buňkách dochází po ošetření HHP k aktivaci kaspáz (-8, -9, -3) a dalších proteinů (fosforylace eIF2 $\alpha$ ), které hrají klíčovou roli v apoptotické dráze spouštěné stresem endoplazmatického retikula.

Pomocí širokého spektra metod se podařilo potvrdit, že ošetření HHP je schopno indukovat ICD u buněk plicních nádorových linií. Byla popsána fenotypová a funkční charakteristika dendritických buněk a prokázána snížená indukce regulačních T lymfocytů pulzovaných s dendritickými buňkami. To představuje základ pro využití při přípravě autologní vakcíny zaměřené na karcinom plic.

**Klíčová slova:** imunogenní buněčná smrt (ICD), vysoký hydrostatický tlak (HHP), kalretikulin (CRT), dendritická buňka (DC), protinádorová imunoterapie, nemalobuněčný karcinom plic (NSCLC)

## **Abstract**

Immunogenic cell death (ICD) is characterized by presence of specific molecules including surface exposed calreticulin (CRT) and the heat shock proteins HSP70 and HSP90. Release of ATP and high-mobility group box protein 1 (HMGB1) belongs to other typical characteristics. For induction of ICD in lung cancer cells high-hydrostatic pressure (HHP) was used. Treatment by HHP induces expression of immunogenic markers CRT, HSP70 and HSP90 on the cell surface. HHP also induces secretion of ATP to the extracellular milieu. Dendritic cells (DC) pulsed with HHP-treated tumor cells showed phenotypic maturation characterized by upregulation of maturation molecule CD83, costimulation molecules CD80 and CD86, chemokine receptor CCR7 and MHC class II molecule HLA-DR. Pulsed DCs have also higher rate of phagocytosis of HHP-treated tumor cells and they induce lower numbers of regulatory T cells compared to immature DCs. Moreover, activation of caspases (-8, -9, -3) and other proteins (phosphorylation of eIF2 $\alpha$ ) which are crucial in ER-stress mediated apoptotic pathway, was observed after HHP treatment.

Using wide range of methods it was confirmed that HHP treatment is able to induce ICD in lung cancer cell lines, phenotypic and functional characteristics were described and the decreased induction of regulatory T-lymphocytes pulsed with DCs was verified. This constitutes the basis for functional use in the preparation of autologous vaccines aiming lung cancer.

**Key words:** immunogenic cell death (ICD), high hydrostatic pressure (HHP), calreticulin (CRT), dendritic cell (DC), cancer immunotherapy, non-small cell lung cancer (NSCLC)

## Obsah

1	Seznam použitých zkratk	9
2	Úvod a cíle práce	11
3	Literární přehled	12
3.1	Karcinom plic	12
3.1.1	Nádorové antigeny	13
3.2	Imunogenní buněčná smrt	14
3.2.1	Molekuly definující imunogenní buněčnou smrt- DAMPs	15
3.2.1.1	Kalretikulin	16
3.2.1.2	Proteiny teplotního šoku	18
3.2.1.3	HMGB1	19
3.2.1.4	ATP	19
3.2.2	Aktivátory imunogenní buněčné smrti	21
3.2.2.1	Chemoterapeutika vyvolávající ICD	21
3.2.2.2	Fyzikální modalitty vyvolávající ICD	22
3.2.2.2.1	Vysoký hydrostatický tlak	23
3.3	Typy buněčné smrti	24
3.3.1	Apoptóza	24
3.3.1.1	Vnější apoptotická dráha	25
3.3.1.2	Vnitřní apoptotická dráha	26
3.3.2	Nekróza	26
3.3.3	Autofágie	27
3.3.4	Další typy buněčné smrti	28
3.3.4.1	Mitotická katastrofa	29
3.3.4.2	Pyroptóza	29
3.3.4.3	Anoikis	29
3.4	Aktivace imunitního systému	30
3.4.1	Dendritické buňky	30
3.4.1.1	Subpopulace dendritických buněk	31
3.4.1.2	Maturace a migrace dendritických buněk	32
3.4.1.3	Zpracování a prezentace antigenu	34
3.4.1.4	Aktivace a typ imunitní odpovědi	34

3.4.1.4.1	Aktivace CD4+ T lymfocytů.....	34
3.4.1.4.2	Aktivace CD8+ T lymfocytů.....	35
3.5	Terapie nádorových onemocnění.....	36
3.5.1	Protinádorová imunoterapie .....	36
3.5.1.1	Proteinové a peptidové vakcíny.....	37
3.5.1.2	Celobuněčné nádorové vakcíny.....	38
3.5.1.3	Imunoterapie založená na dendritických buňkách.....	38
3.5.1.3.1	DCVAC.....	39
4	Materiály a metody .....	41
4.1	Materiály .....	41
4.1.1	Přístroje.....	41
4.1.2	Roztoky a chemikálie .....	41
4.1.3	Média a roztoky pro tkáňové kultury .....	44
4.1.4	Protilátky .....	44
4.1.5	Použité buněčné linie.....	45
4.2	Metody .....	46
4.2.1	Práce s buněčnými kulturami .....	46
4.2.2	Příprava vzorků pro ošetření vysokým hydrostatickým tlakem .....	46
4.2.3	Příprava lyzátů pro Western Blot .....	46
4.2.3.1	Stanovení koncentrace proteinu.....	47
4.2.3.2	Příprava lyzátů pro stanovení fosforylovaných proteinů.....	47
4.2.4	SDS-PAGE elektroforéza.....	47
4.2.5	Western Blot.....	47
4.2.6	Analýza viability a imunogenních molekul pomocí průtokové cytometrie .....	49
4.2.6.1	Detekce viability buněk pomocí AnnexinV/DAPI barvení.....	49
4.2.6.2	Detekce imunogenních molekul .....	49
4.2.7	Příprava preparátů pro mikroskopii.....	50
4.2.8	Stanovení intracelulární a extracelulární koncentrace ATP .....	50
4.2.9	Příprava dendritických buněk in vitro .....	50
4.2.10	Sběr DC a pulzace nádorovými buňkami.....	51
4.2.10.1	Stanovení maturace.....	52

4.2.10.2	Stanovení fagocytózy DC .....	52
4.2.10.2.1	Příprava preparátů pro mikroskopii .....	53
4.2.10.3	Cross-prezentační test (T regulační buňky) .....	53
4.2.11	Klonogenní esej .....	55
5	Výsledky .....	56
5.1	Aktivace apoptózy ošetřením buněk vysokým hydrostatickým tlakem .....	56
5.1.1	Aktivace kaspázy-8, -9 a -3 po ošetření plicních nádorových linií HHP .....	56
5.1.2	Fosforylace eIF2 $\alpha$ .....	58
5.1.3	HHP vyvolává v plicních nádorových liniích H520 a H522 apoptózu ..	58
5.2	HHP indukuje expresi imunogenních molekul na povrchu nádorových buněk .....	60
5.3	HHP snižuje intracelulární a zvyšuje extracelulární koncentraci ATP .....	64
5.4	Dendritické buňky pulzované nádorovými buňkami ošetřenými HHP vykazují zvýšenou expresi maturačních molekul .....	65
5.5	Nádorové buňky ošetřené HHP jsou více fagocytovány dendritickými buňkami .....	67
5.6	Dendritické buňky pulzované nádorovými buňkami usmrcenými HHP indukují méně regulačních T lymfocytů .....	70
5.7	Růst v klonogenních esejích .....	71
6	Diskuze .....	73
7	Souhrn .....	79
8	Seznam literatury .....	80



# 1 Seznam použitých zkratek

APC	antigen prezentující buňka (antigen presenting cell)
APS	persíran amonný
ATP	adenosintrifosfát
BCR	B buněčný receptor
BSA	bovinní sérový albumin
CD	diferenciační skupina (cluster of differentiation)
CRT	kalretikulin
CTL	cytotoxický T lymfocyt
DAMP	molekula nebezpečí (damage-associated molecular pattern)
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DC	dendritická buňka (dendritic cell)
DMSO	dimethylsulfoxid
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ER	endoplazmatické retikulum
FBS	fetální bovinní sérum
FDA	úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)
GAPDH	glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)
GM-CSF	faktor stimulující granulocyty a makrofágy (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)
H520	plicní nádorová linie- skvamózní karcinom plic
H522	plicní nádorová linie- adenokarcinom plic
HHP	vysoký hydrostatický tlak (high hydrostatic pressure)
HMGB1	amphoterin (high-mobility group box 1)
HSP70	protein teplotního šoku (heat shock protein 70)
HSP90	protein teplotního šoku (heat shock protein 90)
ICD	imunogenní buněčná smrt (immunogenic cell death)
iDC	nematurovaná dendritická buňka (immature dendritic cell)
IFN	interferon
IL	interleukin
LPS	lipopolysacharid
MFI	průměrná intenzita fluorescence (mean fluorescence intensity)
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (major histocompatibility complex)
NF- $\kappa$ B	jaderný faktor- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B)
NK	přirození zabíječi, NK buňky (natural killers)
NSCLC	nemalobuněčný karcinom plic (non-small cell lung cancer)
PAF	faktor aktivující destičky (platelet-activating factors)
PAMP	molekuly charakteristické pro patogeny (pathogen-associated molecular patterns)
PBMC	mononukleární buňky periferní krve (peripheral blood mononuclear cell)
PBS	fosfáty pufovaný fyziologický roztok (phosphate buffered saline)

poly I:C	polyinosinová polycytosinová kyselina (polyriboinosinic polyribocytidylic acid)
PRR	receptor rozeznávající určitou strukturu (pattern recognition receptor)
PS	fosfatidylserin (phosphatidylserine)
ROS	volné radikály (reactive oxygen species)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS	dodecylsulfát sodný
TBS	Tris pufovaný fyziologický roztok (Tris buffered saline)
TCR	T buněčný receptor
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TGF- $\beta$	transformující růstový faktor $\beta$ (transforming growth factor $\beta$ )
TLR	receptor podobný genu Toll (Toll-like receptor)
TNF- $\alpha$	faktor nádorové nekrózy $\alpha$ (tumor necrosis factor $\alpha$ )
Treg	regulační T lymfocyt (regulatory T cell)
UNTR	neošetřené (untreated)

## 2 Úvod a cíle práce

Terapie nádorových onemocnění je důležitým předmětem studia, protože se týká čím dál tím většího počtu lidí. Využití tradiční léčby jako je operativní odstranění nádoru, radioterapie a chemoterapie není zcela účinné v eliminaci všech nádorových buněk a má vážné vedlejší účinky, a tak je třeba využít a podpořit potenciál vlastního imunitního systému v boji proti nádorovým buňkám.

Současné imunoterapeutické vakcíny používají různá adjuvans ke zvýšení účinku skrze stimulaci imunitního systému. Poměrně novou možností je stimulace imunitního systému zvýšením imunogenicity nádorových buněk, která je založená na aktivaci tzv. imunogenní buněčné smrti. V průběhu posledního desetiletí se značné množství studií začalo zajímat právě konceptem imunogenní buněčné smrti a od té doby bylo identifikováno několik jejích aktivátorů a detailněji popsána molekulární charakteristika.

Tato práce se zaměřuje na aktivaci imunogenní buněčné smrti buněk karcinomu plic vysokým hydrostatickým tlakem. Jelikož je toto nádorové onemocnění jedno z nejčastějších a vyznačuje se velmi vysokou úmrtností, pokládáme za velmi důležité soustředit se na nové možnosti protinádorové terapie. V našem případě používáme k aktivaci protinádorové imunity autologní DC pulzované nádorovými buňkami ošetřenými vysokým hydrostatickým tlakem za předpokladu aktivace imunogenní buněčné smrti nádorových buněk a aktivace imunitního systému skrze prezentaci antigenů dendritickými buňkami naivním T lymfocytům.

Cílem této práce je:

- Určit, zda vysoký hydrostatický tlak indukuje imunogenní buněčnou smrt u karcinomu plic
  - Stanovit expresi imunogenních markerů
  - Detekovat aktivaci klíčových molekul účastnících se translokace kalretikulinu
- Popsat charakteristiku antigen prezentujících buněk po inkubaci s buňkami karcinomu plic ošetřenými vysokým hydrostatickým tlakem
  - Popsat fenotypovou a funkční charakteristiku dendritických buněk
  - Stanovit indukci regulačních T lymfocytů pulzovanými dendritickými buňkami

## 3 Literární přehled

### 3.1 Karcinom plic

Karcinom plic patří spolu s karcinomem prostaty, prsu a kolorektálním karcinomem k nejčastějším nádorovým onemocněním. Co se týká úmrtnosti, karcinom plic se drží na prvním místě. Plicní nádory se dělí především na základě histologického obrazu, a to na malobuněčné karcinomy plic (SCLC; small cell lung cancer), které představují asi 15-20 % těchto nádorů a nemalobuněčné karcinomy plic (NSCLC; non-small cell lung cancer), které tvoří 80-85 % všech plicních nádorů. Toto rozdělení je důležité především z hlediska léčby, jelikož nemalobuněčný karcinom plic lze v časných stádiích léčit chirurgicky, kdežto malobuněčný karcinom plic lépe odpovídá na léčbu radioterapií, nebo chemoterapií.

Základními subtypy nemalobuněčného karcinomu plic jsou adenokarcinomy tvořící asi 40 % všech plicních nádorů, skvamózní karcinomy plic tvořící asi 30 % všech plicních nádorů a velkobuněčné karcinomy plic. Nemalobuněčný karcinom se od malobuněčného liší biologickým chováním, klinickým průběhem i léčbou, z tohoto důvodu se tato práce zabývá pouze NSCLC, především adenokarcinomem a skvamózním karcinomem.

Nejčastější příčinou vzniku karcinomu plic je kouření tabákových výrobků, vyskytuje se ale i u nekuřáků, u kterých se z převážné většiny jedná o nemalobuněčný adenokarcinom. Kromě kouření jsou dalšími rizikovými faktory vdechování karcinogenních látek (částice azbestu, radioaktivní plyny, sloučeniny azbestu a niklu), pasivní kouření, znečištěné ovzduší, složení stravy a genetické predispozice ke zvýšené vnímavosti karcinogenních látek.

Dlouhou dobu se myslelo, že nádory plic nejsou imunosenzitivní a tak se pro jejich léčbu používala pouze chirurgická léčba, chemoterapie, nebo radioterapie v závislosti na typu a stádiu nádoru. Vývoj a testování aktivních imunoterapeutických postupů tak časově zaostal za podobnými postupy léčby melanomu, karcinomu prostaty a ovárií. Nutnost zavedení nových léčebných postupů pramení z faktu, že karcinom plic má za následek nejvíce úmrtí ze všech nádorových onemocnění, kdy po chirurgickém odstranění nádoru dochází zhruba u 40 % pacientů k relapsu. V pokročilých stádiích onemocnění se k léčbě používá radioterapie a chemoterapie, tato léčba má však jen malý účinek pro prodloužení přežití, slouží spíše jako paliativní léčba. Pětiletá doba přežití u pacientů s pokročilými stádii karcinomu plic (stádium IIIB a IV) se pohybuje okolo 3,9 % a 1,3 % (Sugimura et

al., 2007). Kombinace imunoterapie a standardní léčby by mohla mít příznivý vliv na přežití pacientů, především díky cirkulaci imunitních buněk a možným zacílením vzdálených mikrometastáz.

Imunoterapie nádorových onemocnění využívá autologních buněk imunitního systému k eliminaci nádorových buněk a to pomocí cílových molekul, kterými jsou nádorové antigeny. V případě imunoterapie karcinomu plic jsou nejčastějšími testovanými cíli antigeny CEA (carcinoembryonic antigen), který je ve větší míře exprimován přibližně u 70 % NSCLC (Thompson et al., 1991), MAGE-A3 (melanoma-associated antigen E-A3), Her-2 (human epidermal growth factor receptor-2) a MUC1 (mucin-1). Další možnou variantou je použití celobuněčných vakcín, které obsahují široké spektrum nádorových antigenů a snižuje se tak riziko, že nádorová buňka unikne imunitnímu dohledu potlačením exprese určitého antigenu nádorovými buňkami (Kakimi et al., 2009). Více o protinádorové imunoterapii bude uvedeno v kapitole 3.5.1.

### **3.1.1 Nádorové antigeny**

Nádorové antigeny se dělí na dvě základní skupiny, specifické nádorové antigeny (TSA; tumor specific antigens) a antigeny asociované s nádory (TAA; tumor associated antigens). TSA jsou přítomny pouze na nádorových buňkách a nevyskytují se u normálních buněk. Tyto antigeny většinou vznikají bodovými mutacemi normálních genů. TAA jsou antigeny, které se vyskytují na nádorových buňkách, ale jsou přítomny i u normálních buněk během fetálního vývoje (onkofetální antigeny), nebo ve specifických tkáních a orgánech. Tato skupina je mnohem častější než TSA. Nádorové antigeny se ještě rozdělují do různých skupin podle molekulární struktury a jejich původu na „cancer-testis“ (CT) antigeny, onkofetální a diferenciační antigeny, virové antigeny, široce exprimované a overexprimované normální antigeny a nakonec antigeny specifické pro určitý nádor (Renkvist et al., 2001).

Mezi nejčastější nádorové antigeny vyskytující se u karcinomu plic patří MAGE-A3. Tento antigen patří mezi CT antigeny a vyskytuje se přibližně u 55 % NSCLC (Gure et al., 2005). Kromě karcinomu plic se tento nádorově specifický antigen vyskytuje u celé řady nádorových onemocnění, jako u melanomu, karcinomu prsu a ovariálního karcinomu (Caballero and Chen, 2009).

Dalším nádorovým antigenem vyskytujícím se přibližně u 25 % případů karcinomu (Gure et al., 2005) plic je NY-ESO-1 (New York- esophageal cancer-1), který také patří do

skupiny CT antigenů. Výskyt tohoto nádorového antigenu není opět omezen pouze na karcinom plic, ale je přítomen i u melanomu, karcinomu prsu, karcinomu prostaty, hepatocelulárního karcinomu a dalších (Chen et al., 1997).

Běžným proteinem vyskytujícím se na apikální straně epitelových buněk je mucin-1 (MUC1). U mnoha nádorových onemocnění včetně karcinomu plic je tento protein exprimován ve zvýšené míře a je aberantně glykosylován (Ho et al., 1993). MUC-1 tedy slouží jako cíl při výrobě protinádorových vakcín podobně jako MAGE-A3 a NY-ESO-1.

Zvláštním typem nádorového antigenu je p53. Tento nádorový supresor, který v buňce reguluje mnoho dějů včetně apoptózy, opravy DNA a angiogeneze, je u většiny nádorů mutovaný. Mutace nádorového supresoru p53 se projevuje nekontrolovaným dělením a akumulací chyb v DNA. Protein p53 je mutovaný zhruba u 75 % NSCLC (Mitsudomi et al., 1992).

### **3.2 Imunogenní buněčná smrt**

Během života dochází u některých buněk k mutacím, které mohou vést ke vzniku nádorového onemocnění. Imunitní systém vyvíjí na nově vznikající nádorové buňky jistý selekční tlak, kterému se díky mutacím snaží tyto nádorové buňky uniknout. Tento proces se nazývá editace nádoru imunitním systémem („Cancer immune editing“) (Dunn et al., 2004).

Editace nádoru imunitním systémem má tři stádia- eliminace transformované buňky („elimination“), stav rovnováhy mezi transformovanou buňkou a imunitním systémem („equilibrium“) a únik transformované buňky před imunitním systémem („escape“). Většina zmutovaných nebo poškozených buněk se však k vytvoření klinicky významného nádoru nedostane, protože je v časných fázích imunitním systémem rozeznána a zlikvidována. Nádorové buňky, které jsou ve stádiu eliminace odstraněny imunitním systémem, jsou často velmi imunogenní a tudíž dobře rozeznatelné NK buňkami (natural killer), dendritickými buňkami a T buňkami podílejícími se na tomto stádiu editace nádoru. Některé nádorové buňky se ale mohou vyvinout ve varianty, které ztrácí imunogenicitu, a které nejsou rozpoznány a eliminovány imunitním systémem. Tento stav imunitního systému a nádorových buněk se označuje jako rovnováha a imunitní systém zde působí selekčním tlakem na vytváření méně imunogenních variant nádorových buněk. Stav rovnováhy může trvat velmi dlouho a z klinického hlediska na něj lze pohlížet jako na preneoplastické onemocnění, které nejčastěji zůstává nedagnostikované. Pokud jsou

nádorové buňky neimunogenní, uniknou imunitnímu systému a vytvoří solidní nádor, který může dále metastazovat (Dunn et al., 2002; Zitvogel et al., 2006).

Editované nádorové buňky jsou většinou odolné vůči protinádorové imunitě. Mezi jejich taktiky úniku imunitnímu systému patří: snížení imunogenicity (aktivace regulačních T lymfocytů, variabilita v povrchových antigenech, ztráta exprese MHC I molekuly), aktivní imunoprese (produkce imunopresivních cytokinů IL-10 a TGF- $\beta$ ) a schopnost odolat lytickým procesům (proteiny inhibující granzym B, mutace receptorů smrti) (Garg et al., 2010).

Nízká imunogenicita nádorových buněk je velkým problémem pro navození dlouhotrvající protinádorové imunitní odpovědi. V posledním desetiletí se značné množství studií věnuje otázce jak zvýšení imunogenicity nádorových buněk. Ukazuje se, že poškození a stres nádorových buněk v nich vyvolá uvolňování signálů nebezpečí, tzv. „damage associated molecular patterns“ (DAMPs), které zvyšují jejich imunogenicitu. Takto vyvolaná smrt buněk, při které dochází k uvolňování DAMPs, se označuje jako imunogenní buněčná smrt, nebo imunogenní apoptóza (Krysko et al., 2012). Imunogenní buněčná smrt má biochemické charakteristiky jako běžná fyziologická tolerogenní apoptóza. Dochází zde k vystavování fosfatidylserinu (PS) na povrch cytoplazmatické membrány, depolarizaci mitochondrií i aktivaci kaspáz (Casares et al., 2005), ale na rozdíl od fyziologické apoptózy zde dochází k uvolňování DAMPs.

### **3.2.1 Molekuly definující imunogenní buněčnou smrt- DAMPs**

Termín DAMPs (damage associated molecular patterns) poprvé použila v roce 2004 Polly Matzinger (Seong and Matzinger, 2004). Jedná se o endogenní molekuly, které jsou za fyziologických podmínek uvnitř buňky, například v jádře, endoplazmatickém retikulu (ER), nebo v cytozolu. Tyto molekuly se v případě poškození nebo smrti buňky dostávají na její povrch, nebo jsou sekretovány do extracelulárního prostředí, kde působí různými způsoby na antigen-prezentující buňky (APC), např. dendritické buňky (DC). Sekretované nebo na povrchu vystavené DAMPs napomáhají maturaci dendritických buněk, jejich aktivaci, zpracování antigenu a jeho následnou prezentaci efektorovým T lymfocytům. DAMPs interagují s tzv. pattern recognition receptory (PRR), které jsou exprimovány mimo jiné i na dendritických buňkách. Poškozená nebo umírající nádorová buňka, která na svém povrchu vystavuje DAMPs se tedy stává pro dendritickou buňku, exprimující PRR, viditelnou, a tak může být zahájena protinádorová imunitní odpověď.

V posledních letech bylo identifikováno několik klíčových DAMPs hrajících důležitou roli při imunogenní buněčné smrti. Mezi tyto molekuly patří chaperon kalretikulín (CRT), dva proteiny teplotního šoku (HSP70 a HSP90), chromatinový protein HMGB1 (high-mobility group box 1, známý také jako amphoterin) a ATP (adenosintrifosfát) (Krysko et al., 2012).

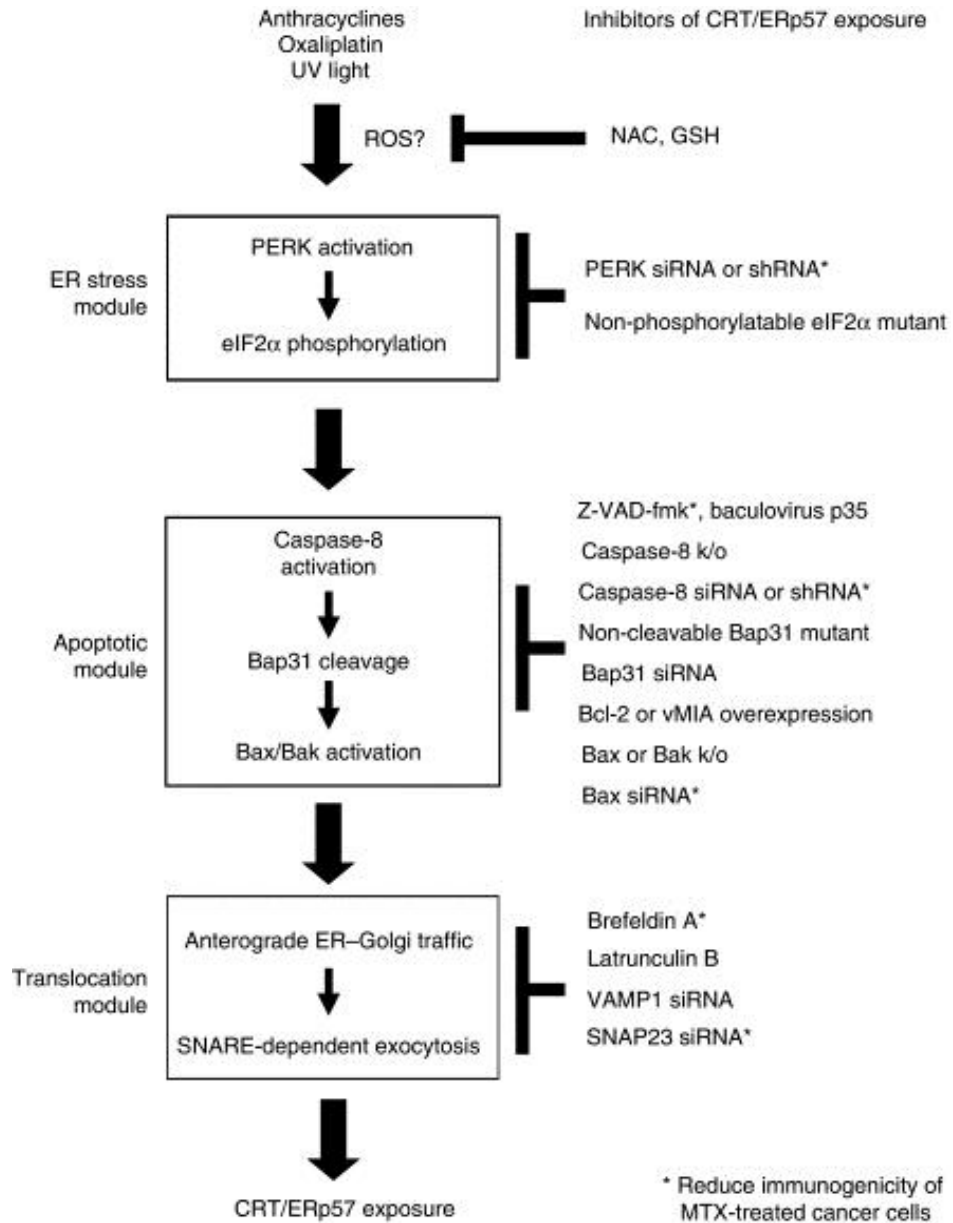
### 3.2.1.1 Kalretikulín

Kalretikulín představuje jednu z nejdůležitějších molekul drah imunogenní buněčné smrti. Je to multifunkční protein endoplazmatického retikula, který je schopen vázat  $\text{Ca}^{2+}$  a tak se významně podílet na signalizaci. Má také funkci molekulárního chaperonu (váže se na špatně sbalené glykosylované proteiny do doby, než se správně zabalí). V ER se CRT podílí také na skládání MHC molekuly I. třídy a na navázání peptidu na tuto molekulu. Kalretikulín se v menší míře nachází i mimo ER a to v jádře, cytoplazmě nebo extracelulární matrix, odkud reguluje mnoho biologických procesů. Např.: zpracovávání antigenu a jeho prezentaci buňkám imunitního systému, pohlcování nádorových buněk-vystavujících na svém povrchu CRT- dendritickými buňkami, fagocytózu apoptotických buněk, adhezi a migraci buněk nebo buněčnou proliferaci (Gold et al., 2010). Pokud je u nádorových buněk vyvolána imunogenní buněčná smrt, kalretikulín je z ER translokován na vnější cytoplazmatickou membránu, kde slouží jako „eat-me“ signál pro dendritické buňky (obr. 3.2.1 a). DC mají na svém povrchu receptor LRP1 (LDL-receptor-related protein, CD91), který rozeznává CRT na povrchu umírajících nádorových buněk a podněcuje pohlcení takto označených nádorových buněk (Garg et al., 2012b; Obeid et al., 2007).

Translokační dráhy CRT se mění v závislosti na fázi probíhající apoptózy a na použitém aktivátoru imunogenní buněčné smrti, ale ve většině bodů se tyto dráhy překrývají. Před-apoptotická translokace kalretikulínu způsobená různými chemoterapeutiky (mitoxantron a oxaliplatin) a UVC zářením je závislá na klasické sekreční dráze (ER-Golgi) (obr. 3.2.1.1), aktivaci PERK (proteinová kináza v ER; eIF2 $\alpha$  kináza) s následnou fosforylací eukaryotického iniciačního faktoru 2 alfa (eIF2 $\alpha$ ) a aktivaci kaspázy-8 s následnou aktivací pro-apoptotických proteinů BAX (bcl-2 associated X protein) a BAK (Bcl-2 homologous antagonist/killer) zprostředkovanou proteinem BAP31 (B-cell receptor-associated protein 31) (Panaretakis et al., 2009). Při translokaci CRT vyvolané fotodynamickou terapií (photodynamic therapy; PDT), je nezbytná pouze sekreční dráha, PERK, BAX a BAK (Garg et al., 2012b). Fosforylace eIF2 $\alpha$  a aktivace kaspázy-8 není v tomto případě zapotřebí. V obou případech se této translokace účastní PI3



kináza (PI3K), která je zodpovědná za umístění CRT na plazmatickou membránu, a to do míst s LRP1 receptory (Krysko et al., 2012).



Obr. 3.2.1.1 Předpokládané schéma translokace CRT na povrch buňky. V odpovědi na různé aktivátory ICD (antracykliny, oxaliplatina, UV záření) je v buňce aktivovaná signalizace, kterou můžeme rozdělit na tři části: stres ER, apoptóza a translokace. Nejprve je aktivována PERK kináza, která fosforyluje eukaryotický iniciační faktor 2 $\alpha$ , poté dochází k aktivaci kaspázy-8, která štěpí protein Bap31. Štěpený Bap31 dále aktivuje pro-apoptotické proteiny Bax a Bak. Aktivace těchto proteinů vede ke klasickému anterográdnímu transportu CRT (ER-Golgi) a jeho exocytóze na povrch buňky. V pravé části schématu jsou vypsány specifické inhibitory inhibující jednotlivé kroky translokace CRT (inhibitory snižující imunogenicitu buněčné smrti *in vivo* jsou označeny hvězdičkou) (převzato z (Panaretakis et al., 2009)).

### 3.2.1.2 *Proteiny teplotního šoku*

Rodina proteinů teplotního šoku (heat-shock proteins; HSPs) obsahuje proteiny, které se běžně vyskytují v buňkách, ale jejich exprese narůstá při vysokých teplotách, nebo za jiných stresových podmínek. Jsou to chaperony, které se účastní správného skládání jak nově syntetizovaných proteinů, tak proteinů, které byly ovlivněny nějakými stresovými podmínkami (vysoká teplota, pH, vystavení těžkým kovům). V případě navození imunogenní buněčné smrti u nádorových buněk jsou tyto intracelulární proteiny, translokovány na povrch buňky, kde se podílí na aktivaci imunitního systému (Tesniere et al., 2008).

HSP70 je ATP-dependentní chaperon, který reguluje skládání nově syntetizovaných proteinů a jejich transport do dalších buněčných kompartmentů. Za fyziologických podmínek tento protein zabraňuje apoptóze buněk na různých úrovních - váže se na Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1) a brání tak vzniku apoptozómu, zabraňuje translokaci apoptotického iniciačního faktoru (AIF) do jádra a zabraňuje translokaci Bax do vnější mitochondriální membrány (Stankiewicz et al., 2005).

HSP90 také patří do rodiny ATP-dependentních chaperonů a má podobné funkce jako HSP70. Podobně jako HSP70 se účastní správného skládání a transportu proteinů v buňce a signalizačních procesů. Stejně jako HSP70 má i HSP90 anti-apoptotické vlastnosti (interakce s Apaf-1 a interakce s fosforylovanou Akt kinázou (= protein kináza B; PKB), což má za následek jak vznik signálů pro přežití buňky, tak vznik signálů pro inhibici apoptózy) (Pandey et al., 2000).

Proteiny teplotního šoku, které jsou na povrchu umírajících nádorových buněk, slouží k jejich rozeznání buňkami imunitního systému a pomáhají k jejich následné eliminaci. Oba tyto proteiny teplotního šoku mohou být při indukci imunogenní apoptózy nádorových buněk translokovány na vnější cytoplazmatickou membránu, kde hrají důležitou roli v cross-prezentaci nádorových antigenů dendritickým buňkám na MHC molekulách I. třídy a následné aktivaci specifické CD8<sup>+</sup> T buněčné odpovědi (obr 3.2.1 a). Tato interakce je zprostředkována komplexem CD14 a TLR4 receptorů na dendritické buňce (Asea et al., 2002). Signál vedoucí přes TLR4 je zodpovědný za aktivaci imunitního systému skrze NF-κB (nukleární faktor kappa B) signalizační dráhu doplněnou produkcí prozánětlivých cytokinů (TNF-α (faktor nádorové nekrózy α), IL-1β, IL-6, IL-12 a GM-CSF (faktor stimulující granulocyty a makrofágy) (obr. 3.2.1 a). HSP70 dále napomáhá

maturaci dendritických buněk, protože u nich zvyšuje expresi CD86 a CD40 (Singh-Jasuja et al., 2000).

### **3.2.1.3 HMGB1**

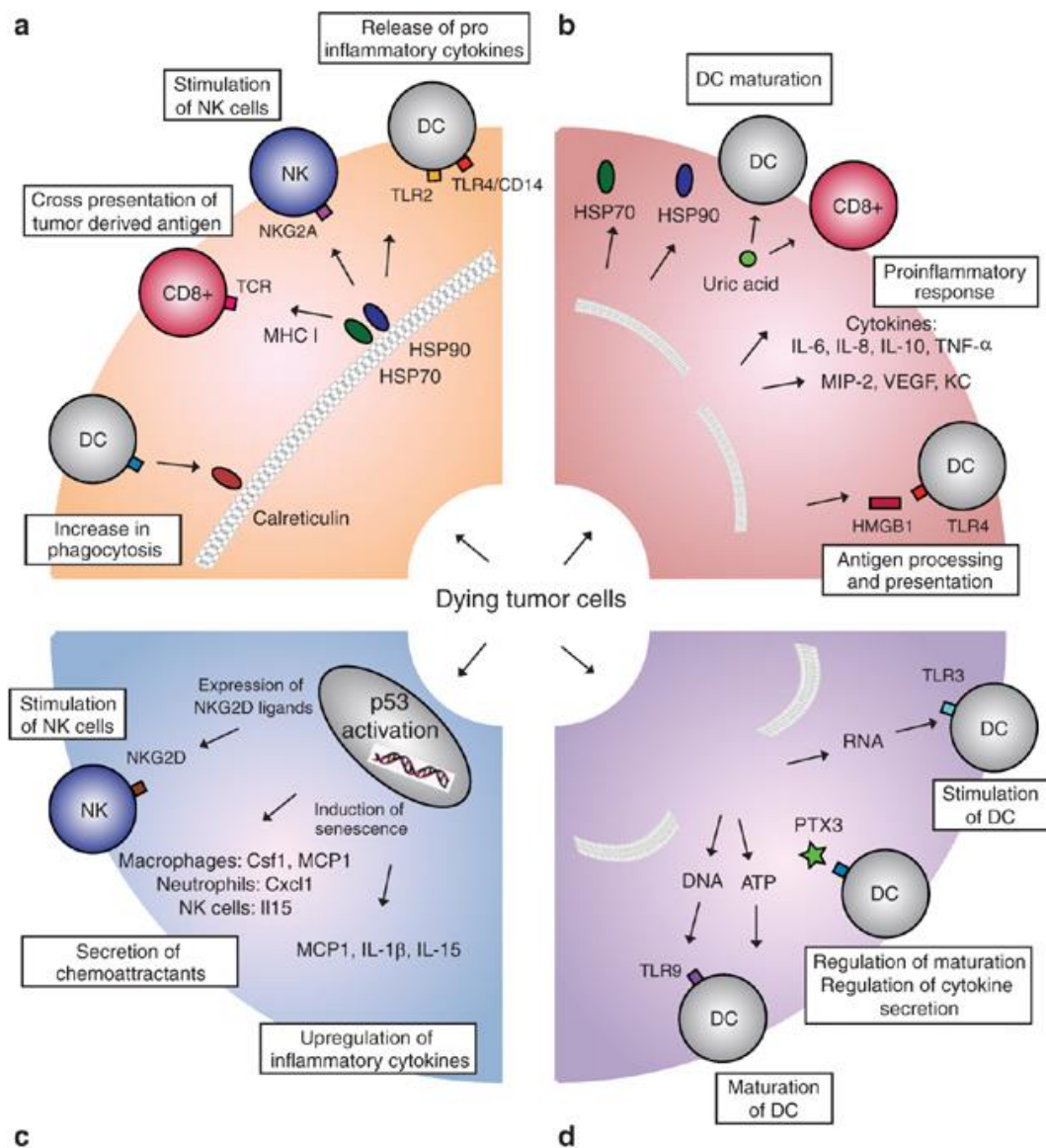
HMGB1 neboli amphoterin je důležitý chromatinový protein, který v jádře interaguje s nukleozómy, transkripčními faktory a histony, čímž má vliv na organizaci DNA a regulaci transkripce. Makrofágy a monocyty aktivované IL-1 $\beta$ , TNF nebo LPS (lipopolysacharid) a umírající buňky (převážně nekrotické) mohou produkovat HMGB1 také jako cytokin s prozánětlivými účinky, nikoli jako DAMP. Produkce HMGB1 nekrotickými buňkami může mít za následek aktivaci imunitní odpovědi proti těmto nekrotickým buňkám (obr. 3.2.1 b). Je zde ale třeba zmínit, že aktivně sekretovaný HMGB1 některými imunitními buňkami se molekulárně liší od toho, který je pasivně vylučován umírajícími buňkami. Aktivně sekretovaný HMGB1 protein je acetylovaný na několika jeho lysinových zbytcích (Palumbo et al., 2004).

Role HMGB1 při nekróze je známá již delší dobu, ale v posledních letech se ukazuje, že se extracelulární HMGB1 nachází i u apoptotických buněk, a to ve fázi sekundární nekrózy. Nádorové buňky, u kterých je navozena imunogenní buněčná smrt vylučují v pozdějších fázích apoptózy extracelulární HMGB1. Ten se váže hlavně na Toll-like receptor 4 (TLR4) na povrchu dendritických buněk (obr. 3.2.1 b) a přispívá tak ke zpracování antigenu a antigenní prezentaci na DC (Apetoh et al., 2007). Význam HMGB1 *in vivo* je stále předmětem diskuzí, protože se jeho funkční vlastnosti mění v závislosti na oxidačně-redukčních vlastnostech prostředí, ve kterém se nachází (Venereau et al., 2012). Další pochybnosti o HMGB1 jako o důležitém DAMP určujícím imunogenicitu imunogenní buněčné smrti podporuje fakt, že ho nádorové buňky usmrcené imunogenní buněčnou smrtí translokují na svůj povrch v časných fázích CRT. To má za následek rychlé pohlcení apoptotických nádorových buněk dendritickými buňkami a tudíž nepřítomnost sekundárně nekrotických buněk v tkáních *in vivo*.

### **3.2.1.4 ATP**

Adenosintrifosfát (ATP) je důležitý nukleotid vyskytující se uvnitř buněk, kde slouží jako zdroj energie pro nesčetné buněčné pochody, jako například membránový transport, syntézu RNA a proteinů a celou řadu dalších. V rámci jednotlivých buněčných typů se jeho koncentrace mění, ale platí, že intracelulární množství ATP je mnohonásobně vyšší než extracelulární. Extracelulární ATP se váže na purinoreceptor P2X<sub>7</sub> na

dendritických buňkách a spouští tak agregaci a aktivaci NLRP3 inflamazómu a následnou produkci prozánětlivého cytokinu IL-1 $\beta$ . Tento cytokin je zapotřebí ke vzniku nádorově specifických CD8<sup>+</sup> T lymfocytů produkujících interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ). IFN $\gamma$  podporuje specifickou protinádorovou odpověď takto aktivovaných T lymfocytů. Ghiringhelli a kol. poukazuje na možnou interakci extracelulárního ATP a HMGB1 při aktivaci NLRP3 inflamazómu a produkci IL-1 $\beta$  dendritickými buňkami (Ghiringhelli et al., 2009).



Obr. 3.2.1 Přehled hlavních znaků imunogenní buněčné smrti. (a) Charakteristické membránové molekuly při ICD. Po vyvolání ICD nádorové buňky je na její povrch translokován CRT, který podporuje fagocytózu dendritickými buňkami. Na povrch plazmatické membrány jsou také translokovány proteiny teplotního šoku HSP70 a HSP90, které crossprezentují nádorové peptidy CD8<sup>+</sup> T lymfocytům, což vede k cytotoxické odpovědi. HSP70 a HSP90 dále stimulují NK buňky přes NKG2A (inhibiční receptory na NK buňkách) ligandy a podporují maturaci a produkci prozánětlivých cytokinů dendritickými buňkami. (b) Uvolnění prozánětlivých cytokinů

z umírajících nádorových buněk. Nekrotické buňky do svého okolí vylévají velké množství molekul s prozánětlivým účinkem, jako HSPs a kyselinu močovou, které stimulují DC a zvyšují cytotoxickou odpověď, IL-6, IL-8, IL-10 a TNF- $\alpha$ , dále HMGB1, které se váže na TLR4 a reguluje zpracování antigenu a jeho prezentaci na povrchu DC. Některé z těchto molekul, jako např. HMGB1, jsou vylévány i během apoptotické smrti nádorové buňky a vyvolávají imunitní odpověď. (c) Aktivace p53 v nádorových buňkách a jeho imunologické následky. Poškození DNA vyvolá v buňce různé signalizační dráhy, mezi které patří i signalizace přes p53, která vede k apoptóze nádorové buňky a zároveň k lýzi buňky zprostředkovanou NK buňkami (přes expresi NKG2D (aktivační receptor na NK buňkách) ligandu). Aktivace p53 také vede k buněčné senescenci, která je doprovázená sekrecí různých chemoatraktantů a zvýšenou produkcí prozánětlivých cytokinů. (d) Koncové degradační produkty s prozánětlivými účinky. V pozdních fázích buněčné smrti se z buněčného debrisu uvolňují molekuly s prozánětlivými účinky. Mezi tyto molekuly patří RNA, která je rozpoznávána TLR3 receptory na DC a tím je stimulována, molekuly DNA a nukleotidy, které interagují s TLR9 receptory na DC a zvyšují tak jejich maturaci. Během pozdních fází apoptózy dochází také k indukci pentaxinu-3 (PTX3), který moduluje imunitní odpověď proti apoptotické buňce (převzato z (Tesniere et al., 2008)).

### **3.2.2 Aktivátory imunogenní buněčné smrti**

Do dnešního dne bylo identifikováno několik aktivátorů imunogenní buněčné smrti, které se dají rozdělit do dvou skupin, a to na chemoterapeutika a fyzikální modalitu. Výsledkem působení všech těchto faktorů je vyvolání imunogenní buněčné smrti u nádorových buněk a následná aktivace imunitního systému. Tyto dráhy působení se však lehce mění.

#### **3.2.2.1 Chemoterapeutika vyvolávající ICD**

Mezi prvními objevenými chemoterapeutiky vyvolávajícími ICD byly antracykliny (Casares et al., 2005; Fucikova et al., 2011; Obeid et al., 2007). Tato léčiva, používající se při léčbě leukémií, lymfomů, sarkomů, ovariálních nádorů a dalších malignit, zahrnují například doxorubicin a idarubicin. Hlavním mechanismem účinku antracyklinů je jejich včleňování mezi párové báze na DNA a inhibice topoizomerázy II. Mezi antracykliny se někdy řadí jejich analog, mitoxantron, který má podobné účinky a použití. Antracykliny vyvolávají v nádorových buňkách produkci HMGB1 a rychlou translokaci kalretikulinu, HSP70 a HSP90 na buněčný povrch, což má za následek fagocytózu těchto buněk dendritickými buňkami a následnou prezentaci nádorových antigenů specifickým T lymfocytům.

Dalším významným chemoterapeutikem vyvolávajícím ICD je bortezomib (Demaria et al., 2005; Spisek et al., 2007). Tento specifický inhibitor proteozomální podjednotky 26S indukuje v primárních myelomových buňkách expresi HSP90 na jejich

povrch a následnou specifickou aktivaci dendritických buněk bez nutnosti použití dalších adjuvantních látek.

Také oxaliplatina patří mezi významná chemoterapeutika vyvolávající ICD (Tesniere et al., 2010). Tento lék se využívá především k léčbě kolorektálního karcinomu a to ve všech stádiích tohoto onemocnění. Oxaliplatina blokuje v buňkách syntézu DNA a vyvolává translokaci kalretikulinu a sekreci HMGB1.

Všechna výše zmíněná chemoterapeutika působí na specifické cíle v buňce a vyvolávají tak apoptózu nádorové buňky. Vedlejším efektem je aktivace stresu endoplazmatického retikula (ER) a produkce volných radikálů (reactive oxygen species; ROS), což je předpoklad pro vyvolání ICD (Ghiringhelli et al., 2009; Tesniere et al., 2010). Pokud chemoterapeutika nejsou schopna v buňkách aktivovat stres ER a produkci ROS, nedochází k indukci imunogenní buněčné smrti, jako je tomu v případě použití cisplatinu (Tesniere et al., 2010), nebo etoposidu (Fucikova et al., 2011).

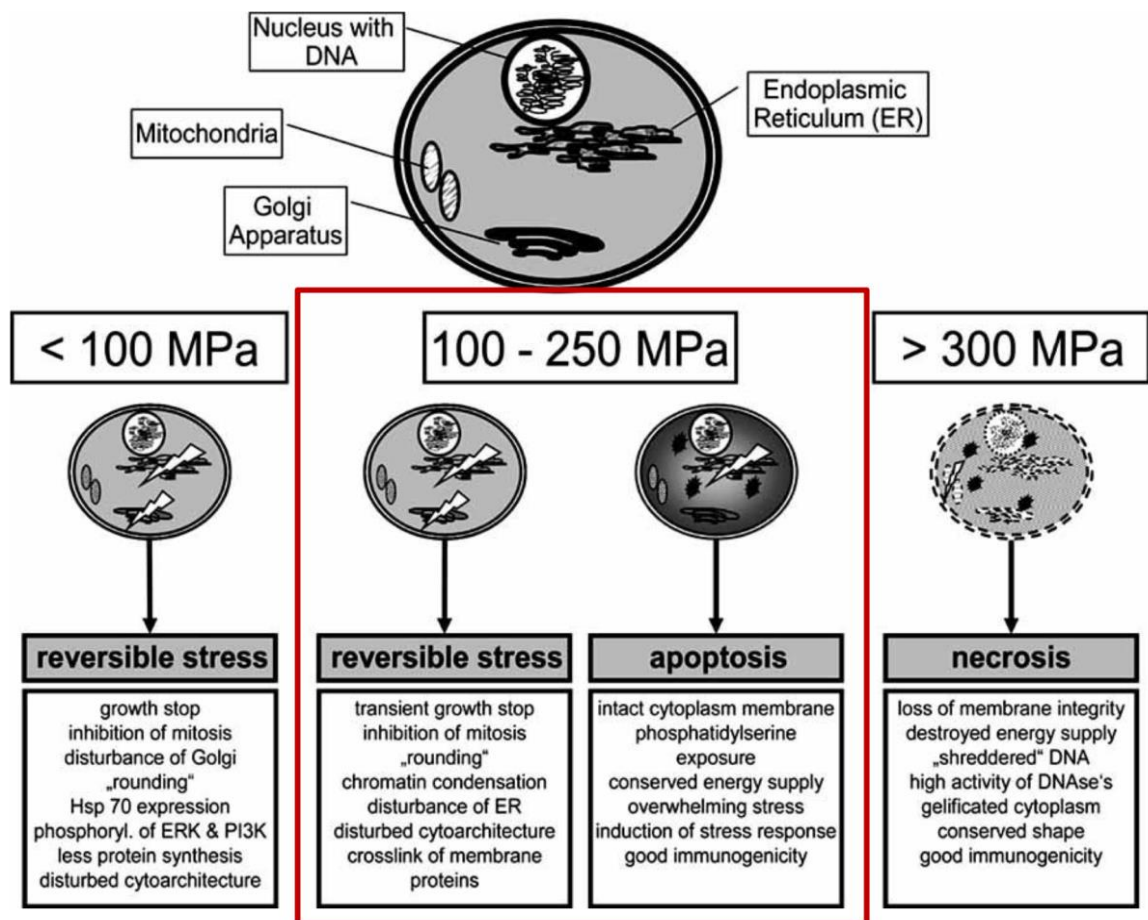
### **3.2.2.2 Fyzikální modalities vyvolávající ICD**

Zajímavým příkladem indukce imunogenní buněčné smrti je fotodynamická terapie (photodynamic therapy; PDT) (Garg et al., 2012b; Moserova and Kralova, 2012). PDT je známá již více než století a používá se k léčbě malých nádorů (Abulafi and Williams, 1992). Tento přístup je založen na aktivaci specifické fotosenzitivní látky, např. hypericinu (extrakt z třezalky tečkované) dopravené do ER (Garg et al., 2012b). Po aktivaci hypericinu světelným paprskem dojde v ER k produkci volných radikálů, poškození ATPázové SERCA (sarco/endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  ATPase) pumpy a narušení  $Ca^{2+}$  homeostázy v ER a následné aktivací vnitřní apoptotické dráhy. PDT tedy oproti výše zmíněným chemoterapeutikům cílí přímo ER a efektivněji tak indukuje ICD (Garg et al., 2012a).

Také specifické druhy záření mohou vést k indukci ICD v nádorových buňkách (Obeid et al., 2007), a to jak UVC záření, tak především ionizující gama záření, používající se v radioterapii (Weiss et al., 2012). Ačkoli se radioterapie používá zejména k léčbě lokalizovaných nádorů, ukazuje se, že také působí systémově a podporuje signalizaci mezi buňkami imunitního systému (Frey et al., 2014). UVC a gama záření působí podobnou cestou jako chemoterapeutika, primárně cílí jádro, kde způsobuje poškození DNA a teprve vedlejším efektem je aktivace stresu ER a tedy méně účinná aktivace ICD.

### 3.2.2.2.1 Vysoký hydrostatický tlak

Nejnovější objevenou modalitou indukující v nádorových buňkách imunogenní buněčnou smrt je vysoký hydrostatický tlak (high hydrostatic pressure; HHP), jehož použití bylo patentováno naší laboratoří a momentálně zkoumáme jeho účinky na různé nádorové linie (Fucikova et al., 2014). Prozatímní výsledky na nádorových liniích (prostatické nádorové linii LNCap, ovariální nádorové linii OV-90 a linii akutní lymfoblastické leukémie REH) a primárních nádorových buňkách poukazují na schopnost vysokého hydrostatického tlaku (v rozmezí 150-250 MPa) indukovat v nádorových buňkách imunogenní buněčnou smrt.



Obr. 3.2.2.2.1 Vliv HHP na eukaryotickou buňku. HHP o hodnotě nižší než 100 MPa (fyziologický HHP) působí v eukaryotických buňkách reverzibilní stres. HHP v rozmezí 100-200 MPa způsobuje buď reverzibilní stres, jako v případě fyziologického HHP, nebo může v buňkách vyvolávat apoptózu. Účinek HHP v rozmezí 100-200 MPa závisí na živočišném druhu a typu buněk vystavených HHP. Při HHP nad 300 MPa dochází k nekrotické smrti buněk již během ošetření. Tato nekróza má ale speciální znaky, které mohou zvyšovat imunogenicitu (převzato z (Frey et al., 2008)).

### 3.3 Typy buněčné smrti

Smrt eukaryotické buňky může probíhat různými způsoby. Podle klasifikace z roku 1973 se podle morfologických znaků dělí buněčná smrt na 3 typy - na apoptózu (typ I.), autofágii (typ II.) a nekrózu (typ III.) (Schweichel and Merker, 1973). Apoptóza je charakteristická kondenzací chromatinu, fragmentací buněčného jádra, ztrátou objemu cytoplazmy a formováním tzv. apoptotických tělísek. Autofágie se vyznačuje formováním vakuol a autofagozómů, které později splývají s lysozomy a dochází tak k degradaci vlastních cytoplazmatických komponent. Při nekróze dochází k degradaci DNA, zvětšování buněk, kolapsu cytoplazmatické membrány a vylití cytoplazmy do extracelulárního prostředí. Od tohoto původního rozdělení, založeného na morfologii buněk, se pomalu opouští, protože v dnešní době existují nové technologie monitoringu a různé biochemické eseje, a tak se dnes buněčná smrt klasifikuje podle biochemických znaků a dochází tak k definování dalších specifických typů a podtypů (Galluzzi et al., 2012).

#### 3.3.1 Apoptóza

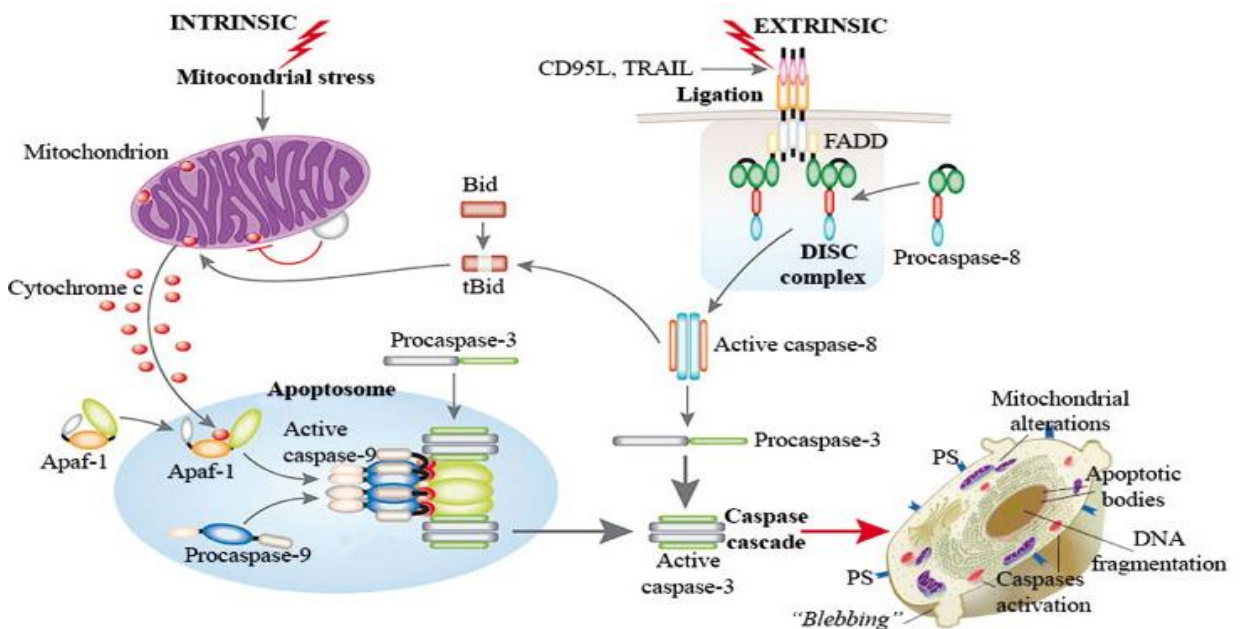
Apoptóza je hlavním typem fyziologické buněčné smrti běžně probíhající v organismu, a tak je považována za imunologicky „tichou“ nebo dokonce tolerogenní buněčnou smrt. Fyziologická apoptóza patří k důležitým a běžným procesům. Například při embryonálním vývoji mozku prodělá apoptózu až 50 % vzniklých buněk, podobně je tomu při vývoji prstů, nebo vývoji T lymfocytů v thymu a B lymfocytů v kostní dřeni. V dospělém životě je apoptóza nezbytná při obnově tkání a udržování homeostázy organismu. Apoptotické buňky jsou většinou rychle rozpoznány a odstraněny fagocyty (makrofágy, nezralé DC, endoteliální buňky, fibroblasty). Fagocyty rozpoznají apoptotické buňky podle různých signálů, které jsou uvolňovány do prostředí apoptotickými buňkami („find me“ signály), nebo vystavovány na jejich povrchu („eat me“ signály). Zároveň také dochází k potlačení exprese tzv. „don't eat me“ signálů. Apoptotické buňky vylučují protizánětlivé cytokiny jako transformující růstový faktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), prostaglandin E2, nebo faktory aktivující destičky (platelet activating factor; PAF). Při jejich fagocytóze tak není aktivována imunitní odpověď, což je při fyziologické tolerogenní apoptóze velmi důležité (Tesniere et al., 2008). Jak se ale ukazuje, apoptotické nádorové buňky zabité různými chemoterapeutiky nebo fyzikálními modalitami jsou schopné vyvolat imunitní odpověď *in vivo* (viz kapitola 3.2.2), a tak se původní označení apoptózy jako



neimunogenní buněčné smrti mění v závislosti na aktivované biochemické dráze. Běžně se apoptóza dělí podle místa aktivace na vnitřní a vnější dráhu.

### 3.3.1.1 Vnější apoptotická dráha

Vnější apoptotická dráha je iniciována aktivací tzv. receptorů smrti (death receptors; DRs). Na tyto receptory se váží různé extracelulární ligandy jako například TNF, nebo FasL (Fas ligand). Po navázání ligandu na extracelulární doménu receptoru dojde ke konformační změně intracelulární části receptoru, která vede k sestavení multiproteinového komplexu obsahujícího adaptorové proteiny. Tento komplex se nazývá DISC (death-inducing signaling complex) a může aktivovat iniciační kaspázu-8, nebo -10. Aktivovaná iniciační kaspáza-8 pak může aktivovat efektorovou kaspázu-3 a spustit tak apoptózu nezávisle na mitochondriích (= buňky typu I, např. lymfocyty), nebo dále proteolyticky štěpit Bid protein za vzniku fragmentu tBid, který vede k aktivaci pro-apoptotických proteinů Bax a Bak, permeabilizaci vnější mitochondriální membrány a aktivaci vnitřní apoptotické dráhy blíže popsané v další kapitole (= buňky II. typu, které potřebují k plné aktivaci apoptózy spuštění vnitřní signální dráhy, např. hepatocyty) (Galluzzi et al., 2012) (obr. 3.3.1.1).



Obr. 3.3.1.1 Základní dráhy aktivace apoptózy. Vnější apoptotická dráha je aktivována navázáním ligandu (CD95L=FasL, TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand)) na receptor smrti, po kterém následuje vytvoření DISC komplexu, na který se váže pokaspáza-8, čímž vzniká aktivní kaspáza-8. Aktivní kaspáza-8 může buď aktivovat efektorovou kaspázu-3, nebo štěpením proteinu Bid na tBid aktivovat vnitřní dráhu apoptotické signalizace iniciované permeabilizací vnější mitochondriální membrány (MOMP). Uvolněný cytochrom c se dostává do cytozolu, kde se váže

na Apaf-1 a indukuje tak vznik apoptozómu a aktivaci kaspázy-9, která dále aktivuje efektorové kaspázy a spouští tak apoptotickou signalizaci (převzato z (Calvino Fernandez and Parra Cid, 2010)).

### **3.3.1.2 Vnitřní apoptotická dráha**

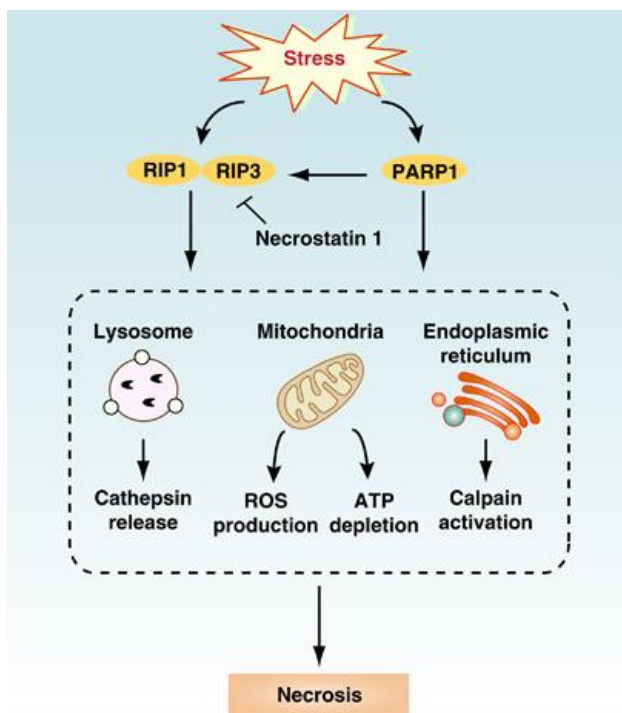
Aktivace vnitřní apoptotické dráhy není na rozdíl od té vnější spouštěna vazbou ligandu na receptor, ale je závislá na intracelulárních stresových podnětech, jako například poškození DNA, oxidativním stresu, nadbytku  $\text{Ca}^{2+}$ , akumulaci nesbalených proteinů v ER a dalších dějích. Po aktivaci vnitřní apoptotické dráhy dochází k aktivaci pro-apoptotických proteinů Bcl-2 rodiny (Bax a Bak), které způsobují permeabilizaci vnější mitochondriální membrány (mitochondrial outer membrane permeabilization; MOMP). Po MOMP dochází k vylití různých proteinů z mezimembránového prostoru do cytoplazmy, kde tyto proteiny aktivují efektorové kaspázy a iniciují tak apoptózu. Nejdůležitějším proteinem účastnícím se této signalizace je cytochrom c (cyt c), který se za přítomnosti dATP váže na adaptorový protein Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor 1) a indukuje tím jeho oligomerizaci a vznik apoptozómu. Apoptozóm na sebe váže prokaspázu-9, čímž zapříčiní její aktivaci. Pro-kaspáza se mění na aktivní kaspázu-9, která dále aktivuje efektorové kaspázy-3 a -7 a spouští tak apoptózu buňky (Tait and Green, 2010) (obr. 3.3.1.1).

Regulace apoptózy probíhá na několika úrovních. V cytozolu se nacházejí proteiny inhibující apoptózu (inhibitor of apoptosis family proteins; IAPs), což jsou vysoce konzervované proteiny, jejichž BIR doména (Baculovirus IAP repeat) inhibuje kaspázy. Nejlépe popsáným IAP je XIAP, který se váže na kaspázu-3, -7 a -9 a inhibuje tak apoptózu (Deveraux and Reed, 1999). Po MOMP se z mezimembránového prostoru kromě cytochromu c dostávají další proteiny a multienzymové komplexy, které se účastní regulace apoptózy (DIABLO, HTRA2, AIF, ENDOG). Apoptózu indukující faktor (apoptosis-inducing factor; AIF) a endonukleáza G (ENDOG) se po vylití do cytozolu translokují do jádra, kde působí fragmentaci DNA nezávislou na kaspázách. Proteiny Smac/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP-binding protein with low pI) a HTRA2 (high temperature requirement protein 2) usnadňují aktivaci kaspáz tím, že degradují IAPs, a tak napomáhají k rozvoji apoptózy (Galluzzi et al., 2012).

### **3.3.2 Nekróza**

Dlouhou dobu byla nekróza klasifikována jako náhodná buněčná smrt, která může vést k zánětům, protože se intracelulární obsah dostává do extracelulárního prostředí. To

vede k chemoatrakci různých buněk s fagocytární aktivitou, které dále produkují prozánětlivé cytokiny jako TNF- $\alpha$  a IL-8. Nekrotické buňky také samy produkují prozánětlivé cytokiny IL-1 $\alpha$  a IL-6 (obr. 3.2.1 b), čímž podporují chemoatrakci a aktivaci fagocytárních buněk (Garg et al., 2010). Je popsán i regulovaný poddruh nekrózy, tzv. nekroptóza, která probíhá u buněk se zablokovanou kaspázou-8, kdy po navázání ligandu na DR dojde k aktivaci RIP1/RIP3 (receptor-interacting serine/threonine-protein kinase) kináz (tato aktivace může být specificky inhibována necrostatinem 1) a další signalizaci vedoucí k nekróze buňky (Vandenabeele et al., 2010). Nekróza buněk může být za určitých podmínek vyvolaná alkylačními činidly, fotodynamickou terapií (PDT), excitotoxiny, nebo navázáním ligandu na DR. Po aktivaci nekrotické dráhy dochází k produkci ROS, uvolňování katepsinu, destabilizaci lysozomů a vyčerpání energie z buňky (Hou et al., 2013) (obr. 3.3.2).



Obr.3.3.2 Základní dráhy nekrózy. Nekróza může být aktivovaná celou řadou stimulů, především stresového charakteru, nebo navázáním ligandu na DR, po kterém se aktivují RIP1 a RIP3 kinázy. Nekróza může být aktivovaná i přes PARP-1 (poly ADP-ribose polymerase) a dále pokračovat buď přes aktivaci RIP kináz, nebo přes další signální dráhu. Aktivace nekrózy přes RIP kinázy, nebo PARP-1 se děje za současného uvolnění katepsinu z lysozomů, zvýšené produkce ROS, vyčerpání ATP a aktivace kalpainu (převzato z (Hou et al., 2013)).

### 3.3.3 Autofágie

Autofágie je evolučně konzervovaný proces, při kterém eukaryotické buňky degradují intracelulární komponenty za účelem udržení homeostázy, a to třemi základními

způsoby, mezi které patří makroautofágie, mikroautofágie a autofágie zprostředkovaná chaperony (Klionsky and Emr, 2000). Nejběžnějším typem autofágie je makroautofágie, při které je složka v cytozolu určená k degradaci pohlcena fagoforem, čímž vznikne autofagozóm. Autofagozóm dále splyne s lysozomem za vzniku autofagolysozómu, ve kterém jsou pohlcené složky rozloženy lysozomálními enzymy na aminokyseliny a mastné kyseliny. Autofágie však neslouží pouze jako odpověď na hladovění buňky, ale reguluje také likvidaci patogenů, debris a starých a poškozených organel.

Autofágie je regulována Atg geny (autophagy-related genes) a u savců je iniciována ULK1 komplexem (Unc51-like kinase 1), který je pod kontrolou mTOR1 kinázy (mammalian target of rapamycin complex 1). mTOR1 funguje jako negativní regulátor autofágie, který je za normálních podmínek aktivovaný. Pokud nastane hladovění buňky, hypoxie, nebo působení rapamycinu, dojde k inaktivaci mTOR1 a indukci autofágie skrze aktivaci ULK1 komplexu a formování autofagozómu (Jung et al., 2009).

V nádorové transformaci má autofágie dvojí funkci. V časných fázích onkogeneze funguje jako supresor a v pokročilých stádiích spíše podporuje růst nádorových buněk. Antionkogenní funkce autofágie byla demonstrována na myších modelech s deletovaným genem esenciálním pro autofágii (beclin-1), kde u těchto myší došlo k vyššímu výskytu nádorů (Yue et al., 2003). V pozdějších stádiích nádorové transformace však vzniká v nádorovém mikroprostředí ischemie (nedostatek kyslíku a živin) a nádorové buňky díky autofágii přežívají (Degenhardt et al., 2006).

Autofágie většinou doprovází jak apoptotickou, tak nekrotickou smrt buňky a zajišťuje tak přežití těchto buněk ve stresových podmínkách. Při všech těchto typech buněčné smrti jsou v jisté míře uvolňovány signály nebezpečí (DAMPs), které napomáhají stimulovat imunitní odpověď. Imunogenicita buněčné smrti tedy závisí na způsobu aktivace buněčné smrti a signálních drahách, které se jí účastní (Hou et al., 2013).

#### **3.3.4 Další typy buněčné smrti**

Jak již bylo zmíněno výše, můžeme rozlišit více typů buněčných smrtí než jen apoptózu, nekrózu a autofágii. V kapitole 3.3.2 byla zmíněna nekroptóza jako podtyp nekrózy, která ale na rozdíl od nekrózy probíhá regulovaně a podobně jako apoptóza je označována za programovanou buněčnou smrt. Nekroptóza se účastní řady patologických dějů jako ischemie, virové infekce a neurodegenerativních onemocnění (Vandenabeele et al., 2010).

#### **3.3.4.1 Mitotická katastrofa**

Dalším typem buněčné smrti je mitotická katastrofa. V buňkách dochází k mitotické katastrofě v případě abnormální mitózy. Mitotická katastrofa byla doposud definována jako onkosupresivní mechanismus, který je vyvolán poruchou mitotického aparátu buňky (např. nesprávnou segregací chromozomů) v průběhu M fáze, je doprovázen určitým pozastavením buněčného cyklu a vede k buněčné smrti, nebo buněčné senescenci (buňka se již dále nedělí) (Galluzzi et al., 2012).

#### **3.3.4.2 Pyroptóza**

Pyroptóza byla původně popsána jako smrt makrofágů napadených bakteriemi *Salmonella typhimurium* (Brennan and Cookson, 2000). Dnes se ale ví, že pyroptóza není specifická jen pro makrofágy, ale děje se i u jiných buněk v odpovědi na jiné stresové situace, než jen bakteriální infekce. Klíčovým prvkem pyroptotické dráhy je kaspáza-1, tato kaspáza je aktivována multiproteinovým komplexem zvaným inflamazóm. Inflamazóm je sestaven z adaptorového proteinu ASC, NOD-like receptoru a prokaspázy-1. Kaspáza-1 může být alternativně aktivovaná i tzv. pyroptozómem, který se skládá z dimeru ASC proteinů a prokaspázy-1. V obou případech způsobuje kaspáza-1 proteolytické štěpení a maturaci prozánětlivých cytokinů IL-1 $\beta$  a IL-18 (Galluzzi et al., 2012). V některých případech může vést aktivace kaspázy-1 k aktivaci kaspázy-7 a následné signalizaci vedoucí ke smrti buňky. Stále ale není jisté, proč v některých případech dojde pouze k sekreci prozánětlivých cytokinů a v jiných k buněčné signalizaci vedoucí ke smrti buňky.

#### **3.3.4.3 Anoikis**

Zajímavým typem buněčné smrti je anoikis. Anoikis je způsobena ztrátou interakce buňky s extracelulární matrix (ECM). Normální netransformované buňky jsou totiž závislé na signálech přicházejících z ECM, a to například na růstových faktorech přijímaných přes EGFR (epidermal growth factor receptor). Pokud buňka tyto signály nedostává, dochází ke spuštění signalizace vedoucí ke smrti buňky a to především vnitřní apoptotickou dráhou. Rozdílné chování mají epiteliální nádorové buňky, které jsou vůči anoikis rezistentní, což je podstatou jejich invazivity a tvorby metastáz. Výzkum molekul účastnících se iniciace této signalizace je tedy důležitý k případnému potlačení invazivity nádorových buněk (Reginato et al., 2003).

Galluzi a kol. navrhli v roce 2012 nejnovější klasifikaci různých typů buněčné smrti, mezi které patří všechny výše zmíněné a ještě několik dalších jako entosis, parthanotos a kornifikace (Galluzzi et al., 2012). V této práci jsou ale tyto typy buněčné smrti nevýznamné a tak se jimi dále nebude zabírat.

### **3.4 Aktivace imunitního systému**

Hlavní funkcí imunitního systému je obrana proti infekcím. Obratlovci mají k tomuto úkolu dvě složky, a to přirozenou (nespecifickou) a adaptivní (specifickou). Mezi nesespecifické složky imunity patří buněčné (fagocyty, NK buňky, granulocyty) a humorální (komplement, antimikrobiální peptidy, cytokiny) komponenty a jejím úkolem je rychlá detekce a nesespecifická eliminace patogenů, tvoří tak první obrannou linii v organismu. Reakce nesespecifické imunity má většinou za následek eliminaci patogenu, ale pokud tomu tak není, aktivuje se specifická imunitní reakce, která je namířená přesně na určitý druh patogenu. Nevýhodou nesespecifické imunitní odpovědi je, že při ní nevzniká imunologická paměť.

Specifická imunita je aktivována skrze nesespecifické složky a jejím klíčovým mechanismem je vznik antigen-specifických T a B lymfocytů a následná produkce specifických protilátek. V těle je připravena obrovská diverzita antigenně specifických receptorů TCR (T cell receptor) na T lymfocytech a BCR (B cell receptor) na B lymfocytech (řádově  $10^{11}$  různých variant). Takové obrovské množství různých receptorů má ale za následek jejich nízkou frekvenci pro určitý antigen (přibližně  $10^{-5}$ ). Je tedy potřeba, aby došlo ke klonální expanzi buněk s požadovaným specifickým receptorem. To mají za úkol právě buňky nesespecifické imunity a to antigen prezentující buňky (APC). APC jsou schopny zpracovat pohlcený antigen, který následně vystaví na svém povrchu v komplexu s MHC (major histocompatibility complex) molekulou II. třídy (v případě crossprezentace s MHC molekulou I. třídy). Tento komplex je poté spolu s kostimulačními molekulami rozeznáván TCR, čímž dojde k proliferaci a diferenciaci na klon zralých efektorových T lymfocytů. Klonální expanze však trvá přibližně 4-7 dní a tak je potřeba, aby do té doby fungovaly složky nesespecifické imunity. APC tak představují spojovací článek mezi přirozenou a adaptivní imunitou (Hořejší a Bartůňková, 2009).

#### **3.4.1 Dendritické buňky**

Dendritické buňky patří stejně jako makrofágy a B lymfocyty mezi buňky prezentující antigen (APC), ale jako jediné APC mohou aktivovat naivní T lymfocyty

(Steinman et al., 1983). První zmínka o DC pochází z roku 1868, kdy byly popsány Langerhansovy buňky v kůži, charakterizace DC však proběhla až v roce 1973, kdy Steinman a Cohn našli a definovali nový buněčný typ v periferních lymfoidních orgánech myši, který podle výběžků (dendritů) pojmenovali „dendritic cell“ (Steinman and Cohn, 1973).

DC se v těle vyskytují jak v nezralé, tak ve zralé formě. Nezralé DC se vyskytují téměř ve všech tkáních, ale nejvíce jich je v kůži a sliznicích trávicího a dýchacího traktu (na rozhraní s vnějším prostředím), kde fagocytují vše ze svého okolí, především odumřelé buňky. Nezralá DC není schopná aktivovat T lymfocyty, ale naopak je tlumí a vytváří regulační T lymfocyty, aby nedocházelo k reakci proti vlastním antigenům. Jakmile ale DC pohltní nějaké molekuly typické pro patogeny (pathogen-associated molecular patterns; PAMPs), které rozeznává skrze určité receptory (pattern recognition receptors; PRR), dochází ke zrání (maturaci) DC a jejímu přesunu z tkání do lymfatických uzlin, nebo jiných sekundárních lymfatických orgánů, kde dochází k aktivaci T lymfocytů.

Přeměna na zralou DC, prezentující antigen je doprovázena ztrátou fagocytární aktivity, zvýšenou expresí MHC molekuly II. třídy, zvýšenou expresí kostimulačních molekul (hlavně CD80, CD86), zvýšenou expresí adhezivní molekuly CD83, zvýšenou expresí chemokinového receptoru CCR7 (receptor pro chemokin MIP-3 $\beta$ , který se vyskytuje v lymfatických uzlinách) a dalších (Banchereau et al., 2000). Pouze zralé DC jsou schopny aktivovat naivní T lymfocyty.

#### **3.4.1.1 Subpopulace dendritických buněk**

Existují dvě základní subpopulace lidských DC, myeloidní DC (mDC) a plazmacytoidní DC (pDC). Obě tyto populace pocházejí z CD34<sup>+</sup> hematopoetické kmenové buňky z kostní dřeně. Z myeloidního prekurzoru vznikají mDC, pro které jsou hlavními růstovými faktory GM-CSF a IL-4 a z lymfoidního prekurzoru vznikají pDC, které se morfologicky i funkčně liší od mDC a vznikají za přítomnosti CD40L a IL-3. Hlavní úlohou mDC je stimulace a aktivace antigen-specifických T lymfocytů, kdežto pDC se účastní hlavně obrany proti virovým infekcím skrze rozpoznání endogenními receptory TLR-7 a TLR-9 a produkci interferonu  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ). Plazmacytoidní DC také v souvislosti s obranou proti virům a produkcí IFN- $\alpha$  aktivují NK a NKT buňky, které napomáhají v obraně proti těmto infekcím. Hlavními identifikačními znaky těchto subpopulací je exprese CD11c u mDC a exprese receptoru pro IL-3 (CD123) u pDC. Langerhansovy

buňky představují subpopulaci mDC a vyznačují se expresí molekuly CD1a, langerinu a E-cadherinu. Mezi nejpočetnější subpopulaci mDC patří intestinální DC, které se nejvíce podobají dendritickým buňkám připraveným *in vitro* diferenciací z monocytů za přítomnosti GM-CSF a IL-4 (Shortman and Liu, 2002; Špíšek a kol., 2009).

#### **3.4.1.2 Maturace a migrace dendritických buněk**

Jak již bylo zmíněno výše, nezralé DC vyskytující se v periferních tkáních a na sliznicích pohlcují vše, co najdou ve svém okolí. Tyto fagocytární buňky na svém povrchu exprimují nejrůznější receptory, kterými rozpoznávají mikrobiální komponent a další signály nebezpečí.

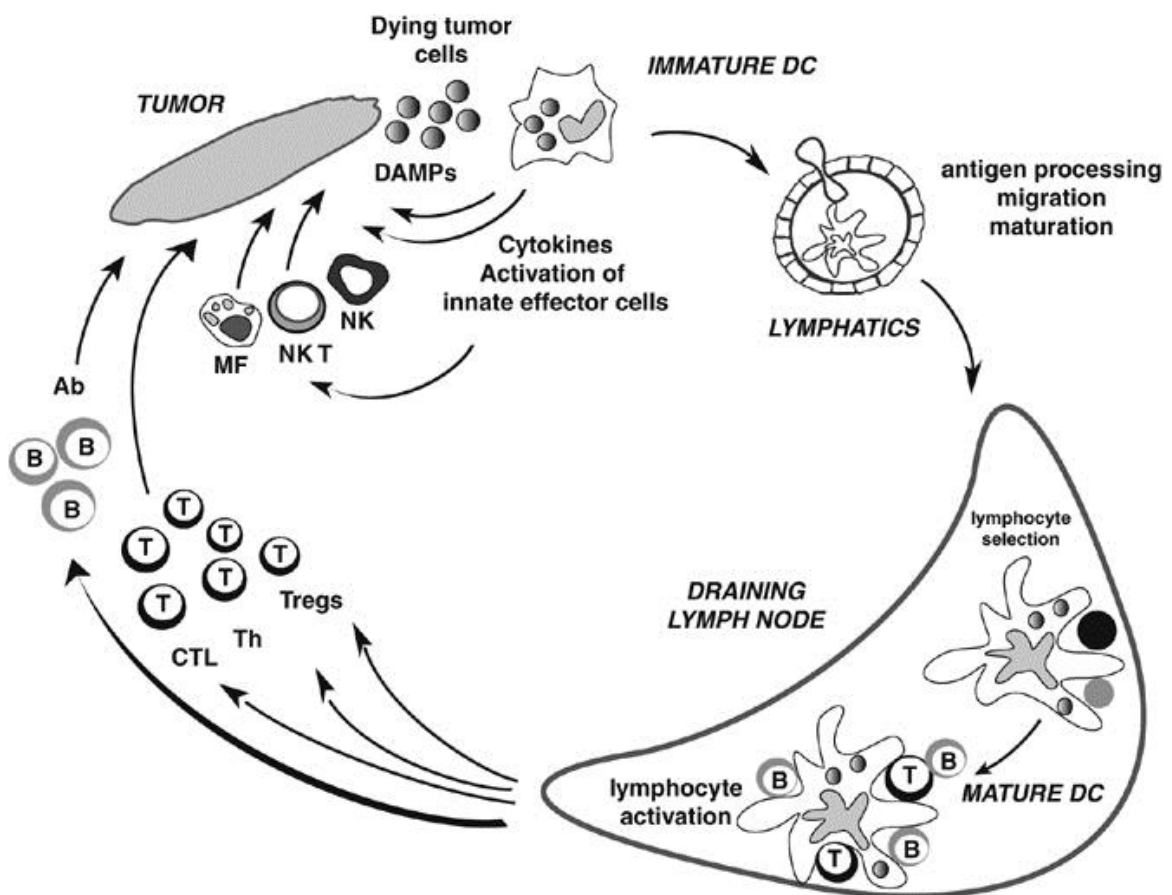
Hlavní skupinou těchto receptorů jsou Toll-like receptory (TLR), které jsou specifické pro širokou škálu ligandů. Bakteriální komponenty jako LPS, peptidoglykan a flagelin jsou rozpoznávány TLR4, 2 a 5. Molekuly specifické pro plísně a houby jako zymozan a manan jsou rozpoznávány TLR 2 a 4 a virové komponenty jako ssRNA, dsRNA a proteiny obalu jsou rozpoznávány TLR7, 8, 3 a 4. Toll-like receptory na DC jsou ale schopné rozpoznat i endogenní signály, což je předpokladem indukce imunogenní buněčné smrti. Například HMGB1 uvolňovaný z nekrotických a apoptotických nádorových buněk je rozpoznáván TLR4 na DC a kontroluje tak zahájení imunitní reakce skrze zpracování a prezentaci nádorových antigenů (Apetoh et al., 2007) (obr. 3.2.1 b). HSP70 a HSP90 jsou dalšími endogenními proteiny vázající se na TLR, konkrétně na komplex TLR4/CD14, kterému crossprezentují nádorové antigeny v asociaci s MHC molekulou I. třídy (Asea et al., 2002). Tato signalizace přes TLR4 vyvolaná proteiny teplotního šoku také aktivuje v dendritických buňkách NF- $\kappa$ B signalizační dráhu a následnou produkci prozánětlivých cytokinů (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 a IL-12) a aktivaci imunitní odpovědi (Lehner et al., 2004) (obr. 3.2.1 a). Kromě TLR exprimují DC ještě další receptory, jako intracelulární NOD-like receptory (NLR), Fc receptory pro rozeznání imunokomplexů, nebo podpůrné cytokinové receptory, kterými DC detekují přítomnost nebezpečí na dálku.

Maturace DC je vyvolaná maturačním signálem (obr. 3.4.1.2), nejčastěji navázáním ligandu na TLR, který spustí signalizační kaskádu, která vede k transkripci různých genů. Signalizace přes TLR spouští podobné signalizační kaskády, kdy po navázání ligandu dojde k dimerizaci receptorů, na jejichž intracelulární domény se naváží adaptorové proteiny (nejčastěji MyD88), které kaskádovitě aktivují další proteiny a kinázy až dojde k aktivaci transkripčních faktorů (nejčastěji NF- $\kappa$ B), které v jádře indukují expresi



cílových genů. Výsledkem této signalizace je tedy mimo jiné i produkce prozánětlivých cytokinů, chemokinů a indukce exprese kostimulačních molekul jako CD40, CD80 a CD86 (Kaisho and Akira, 2006).

Migrace DC je závislá na expresi chemokinových receptorů na jejich povrchu. Během maturace DC dochází ke změně exprese povrchových chemokinových receptorů, a jako dominantní se na jejich povrchu objevuje receptor CCR7, jehož ligandem je MIP-3β (ELC) a 6CKine (secondary lymphoid-tissue chemokine; SLC). ELC a SLC jsou exprimovány v lymfatických uzlinách a přitahují jak zralé DC, tak naivní T lymfocyty, čímž zajišťují jejich setkání (Banchereau et al., 2000).



Obr. 3.4.1.2 Životní cyklus DC při protinádorové imunitě. Nezralé DC vstupují do tkání, kde se setkávají s nádorovými buňkami a jejich produkty. Pokud DC rozpozná svými receptory signály nebezpečí (DAMPs), začíná docházet k maturaci a migraci DC do lymfatických uzlin. DC produkuje množství cytokinů, které aktivují složky přirozené imunity (eozinofily, makrofágy a NK buňky). Zralé DC poté v sekundárních lymfoidních orgánech prezentují pohlcené peptidy v komplexu s MHC gp I. a II. třídy a aktivují tak antigen specifické T lymfocyty. Aktivované T lymfocyty dále podporují DC v aktivaci B lymfocytů s následnou produkcí protilátek. Nádorové mikroprostředí a umírající nádorové buňky však mohou potlačit maturaci DC, a tím indukovat vznik regulačních T lymfocytů (převzato z (Dhodapkar et al., 2008)).

### **3.4.1.3 Zpracování a prezentace antigenu**

DC prezentují na svém povrchu fragmenty peptidů, které pohltily, a to na MHC glykoproteinech I. a II. třídy. Na MHC molekulách jsou většinou vystavovány endogenní peptidové fragmenty, ale DC jsou schopné tzv. crossprezentace exogenních peptidů na MHC gp I. třídy, čímž jsou schopny aktivovat cytotoxické CD8+ T lymfocyty (CTL). Crossprezentace je umožněna tím, že některé fagocytované proteiny mohou přestoupit z fagozómu do cytoplazmy a dále je s nimi nakládáno jako s endogenními proteiny, což znamená, že jsou proteazomem degradovány a transportovány do ER, kde jsou navázány na MHC gp I. třídy a anterográdním transportem přesunuty na plazmatickou membránu. Existuje ještě jeden způsob crossprezentace, kdy jsou endocytované peptidy naštěpeny endozomálními proteázami a k navázání na MHC gp I. třídy dojde přímo v endocytickém kompartmentu (Rock and Shen, 2005). Prezentace peptidových fragmentů na MHC gp II. třídy probíhá tak, že endozomální váčky s endocytovanými proteiny splynou s váčkou z Golgiho aparátu, ve kterých jsou připraveny MHC gp II. třídy. Po této fúzi dojde k navázání rozštěpených endocytovaných proteinů na MHC gp II. třídy, které jsou následně opět přesunuty na cytoplazmatickou membránu, tento komplex poté aktivuje pomocné CD4+ T lymfocyty (Th). V organismu se MHC gp I. třídy vyskytují na všech jaderných buňkách a MHC gp II. třídy pouze na antigen prezentujících buňkách.

### **3.4.1.4 Aktivace a typ imunitní odpovědi**

Dendritické buňky regulují jak přirozenou (makrofágy, granulocyty a NK buňky), tak adaptivní (T a B lymfocyty) složku imunity (Banchereau et al., 2000) (obr. 3.4.1.2). Při aktivaci adaptivní imunity dochází k prezentaci antigenů v komplexu s MHC gp I. a II. třídy T lymfocytům a jejich následné diferenciaci do funkčně odlišných populací. Prezentace antigenů nezralými dendritickými buňkami T lymfocytům bez kostimulačních molekul, vede ke vzniku tolerance. Pokud ale DC podstoupila maturaci a migraci do lymfatických uzli, může zde aktivovat naivní T lymfocyty, které mohou dále diferencovat v efektorové a paměťové buňky.

#### **3.4.1.4.1 Aktivace CD4+ T lymfocytů**

Aktivace pomocných CD4+ T lymfocytů je zprostředkována vazbou MHC gp II. třídy s navázaným antigenem na T buněčný receptor (TCR) a kostimulačními signály vedoucí přes kostimulační molekuly CD28 na T lymfocytu a CD80 (B7.1), nebo 86 (B7.2) na DC. Diferenciace T lymfocytů je poté závislá především na cytokinovém prostředí,

kteře polarizuje T buněčnou odpověď. Základními typy pomocných CD4<sup>+</sup> T lymfocytů jsou Th1, Th2, Th17 a regulační T lymfocyty (Treg).

Pokud aktivované DC produkují IL-12 a IL-18 vznikají Th1 buňky, které produkují IFN- $\gamma$ , který je nadále potřebný pro aktivaci makrofágů. Th1 odpověď se uplatňuje hlavně při napadení intracelulárními parazity. Th1 buňky dále produkují IL-2, který slouží jako autokrinní růstový faktor.

Při produkci IL-4 aktivovanými DC vznikají Th2 buňky, které se uplatňují při aktivaci B lymfocytů. Th2 lymfocyty aktivují B lymfocyty skře přímý kontakt, kdy na svém povrchu exprimují molekulu CD40L, což je ligand pro kostimulační receptor CD40 na povrchu B lymfocytu. Důležitá je také produkce cytokinů (IL-4, IL-5 a IL-6) Th2 lymfocytu, které napomáhají aktivaci B lymfocytů.

Diferenciace v Th17 buňky probíhá hlavně za přítomnosti IL-6, IL-23 a TGF- $\beta$ . Th17 buňky dále produkují IL-17 a IL-22 a účastní se přilákání neutrofilů a produkce antimikrobiálních peptidů při obraně proti extracelulárním bakteriím a houbám.

CD4<sup>+</sup> T lymfocyty mohou za přítomnosti IL-10 a TGF- $\beta$  diferencovat také v regulační T lymfocyty (Treg). Tyto regulační T lymfocyty bývají označovány jako CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> buňky (Fontenot et al., 2003), protože exprimují transkripční faktor FoxP3, který je pro jejich vznik esenciální a  $\alpha$  podjednotku IL-2 receptoru. Treg dále produkují tlumivé cytokiny IL-10 a TGF- $\beta$ , které potlačují aktivaci imunitní odpovědi a zabraňují tak vzniku autoimunitních onemocnění (Brock, 2012; McKee et al., 2010).

#### **3.4.1.4.2 Aktivace CD8<sup>+</sup> T lymfocytů**

Jak bylo řečeno v kapitole 3.4.1.3, DC jsou schopny crossprezentovat exogenní peptidy na MHC gp I. třídy, a skře TCR tak aktivovat CD8<sup>+</sup> T lymfocyty. Pro efektivní diferenciaci CD8<sup>+</sup> T lymfocytů v efektorové cytotoxické T lymfocyty (CTL), je však zapotřebí i Th buněk, které poskytují dendritickým buňkám další kostimulační signál, aby mohly efektivně stimulovat diferenciaci CTL. Interakce Th buňky a DC probíhá přes CD40 receptor na DC a CD40L na aktivované Th, tato interakce stimuluje DC k expresi kostimulačních molekul CD80/86 a produkci IL-1 a IL-12, které jsou důležité pro diferenciaci CTL. Th buňky dále poskytují CD8<sup>+</sup> T lymfocytům IL-2, který slouží jako důležitý růstový hormon (Hořejší a Bartůňková, 2009).

### **3.5 Terapie nádorových onemocnění**

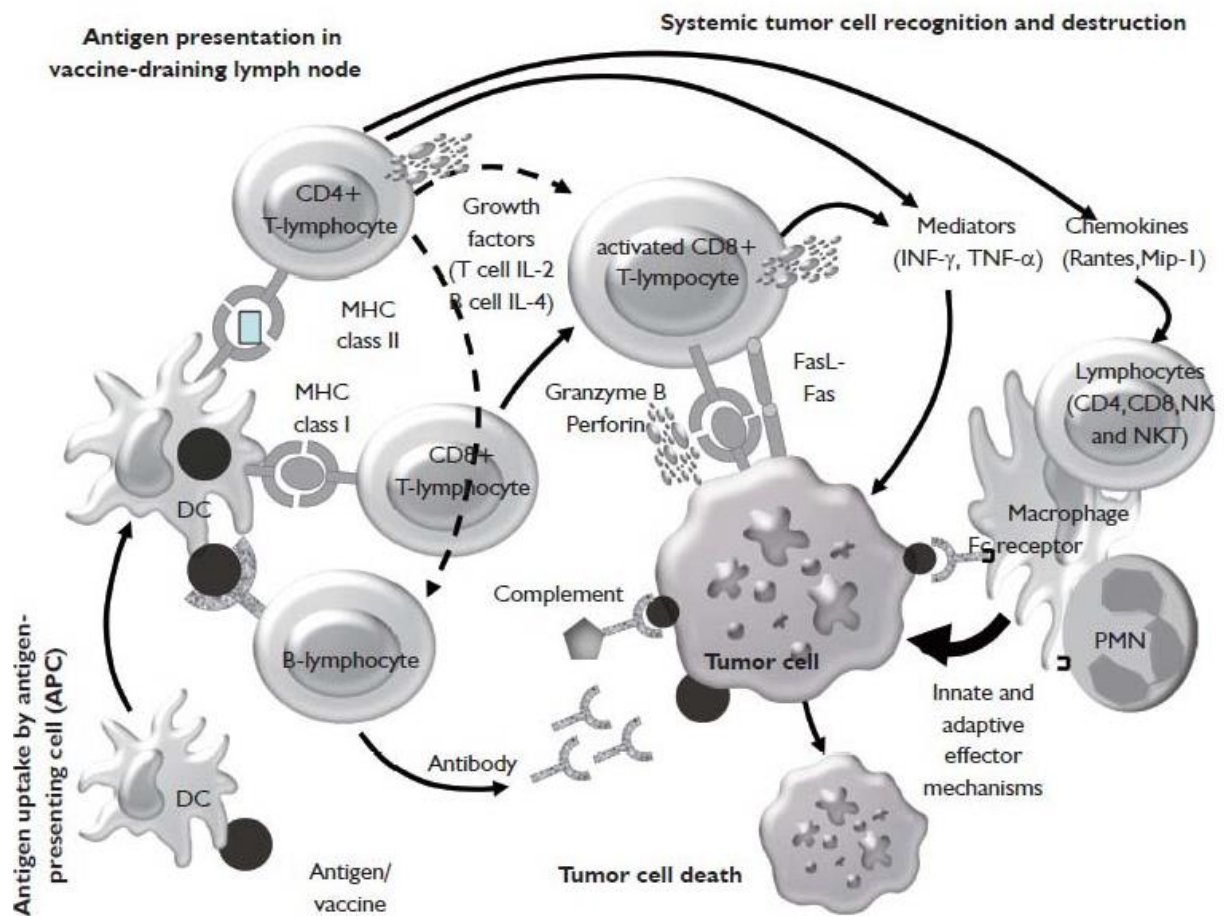
Základní léčbou v terapii nádorů stále zůstává chirurgický zákrok, chemoterapie, ozařování, nebo jejich kombinace. Eliminace solidních nádorů bývá za použití těchto metod úspěšná, avšak pokud již došlo k metastázám je prognóza pacientů horší. Je tedy potřeba nejen eliminovat buňky primárního nádoru, ale i posílit imunitní systém pacienta v boji proti metastazujícím buňkám, a tak navodit dlouhotrvající protinádorovou odpověď. Této potřebě dobře odpovídá protinádorová imunoterapie. Nejenže eliminuje primární nádor, ale také předchází rekurentní chorobě a rozvoji metastáz tím, že povzbuzuje imunitní systém k protinádorové imunitní odpovědi (Sharma et al., 2011). Imunoterapie je v porovnání s chemoterapií méně toxická vůči zdravým tkáním, a tak je pacienty lépe snášena. Jako nejslibnější variantou pro léčbu nádorových onemocnění se však jeví kombinace tradiční léčby s moderním imunoterapeutickým přístupem.

#### **3.5.1 Protinádorová imunoterapie**

Imunoterapeutické přístupy můžeme rozdělit na aktivní a pasivní. Při pasivní imunoterapii jsou pacientovi podávány nádorově specifické monoklonální protilátky (Scott et al., 2012), nebo cytokiny aktivující imunitní systém (Dranoff, 2004). V dnešní době je na trhu několik monoklonálních protilátek uplatňujících se v léčbě různých typů nádorů, například rituximab používající se při léčbě B buněčných lymfomů (Pescovitz, 2006), ipilimumab aplikovaný při léčbě melanomů (Hodi et al., 2010), nebo trastuzumab vhodný pro léčbu nádorů prsu (Hudis, 2007). Pasivní imunoterapie se ale vzhledem k její nízké účinnosti používá jako doplňková léčba pro tradiční terapie.

Lepší účinnost má aktivní imunoterapie, kdy se pacientovi podává vakcína, která aktivuje jeho imunitní systém a ideálně i imunologickou paměť. Dochází zde k aktivaci jak vrozené, tak adaptivní části imunitního systému, což má za následek účinnější eliminaci nádorového bujení a přetrvání beznádorového stavu. Protinádorové vakcíny mohou být buď celobuněčné, které obsahují celé spektrum nádorových antigenů, nebo mohou obsahovat pouze určitý peptid kódovaný v plazmidové DNA vnesené do pacienta pomocí virového vektoru (Madan et al., 2009). Vývoj protinádorových vakcín zažil v posledním desetiletí velký rozvoj, kdy bylo publikováno mnoho preklinických studií prezentujících různé vakcinační strategie. Bohužel ale u většiny těchto strategií nedošlo k požadovanému úspěchu v randomizované fázi III klinických studií (Klebanoff et al., 2011; Rosenberg et al., 2004). Jakýmsi přerodem bylo v roce 2010 schválení Sipuleucel-T (vakcína založená

na autologních dendritických buňkách) pro léčbu karcinomu prostaty americkým úřadem pro kontrolu léčiv FDA (Cheever and Higano, 2011). Od té doby vznikají nové vakcinační strategie pro léčbu nádorového bujení.



Obr. 3.5.1 Aktivace imunitní odpovědi při aktivní protinádorové imunoterapii. Aktivní imunizace je založená na prezentaci nádorových antigenů antigen prezentujícími buňkami. Zralé DC aktivují efektorové T a B lymfocyty, které dále bojují proti nádoru různými způsoby. Aktivované B lymfocyty produkují specifické protilátky, CD4+ T lymfocyty pomáhají aktivovat B lymfocyty a produkují cytokiny, chemokiny a růstové faktory pro další aktivaci složek nespecifické imunity (NK buňky, makrofágy). CD8+ T lymfocyty přímo zabíjí nádorové buňky skrze Fas/FasL a perforiny/granzymy. Protinádorové vakcíny ideálně vyvolávají imunologickou paměť a dlouhotrvající beznádorový stav v organismu (převzato z (Winter et al., 2011)).

### 3.5.1.1 Proteinové a peptidové vakcíny

Proteinové a peptidové vakcíny obsahují definované nádorové antigeny ve formě rekombinantních proteinů nebo peptidů. Spolu s těmito rekombinantními antigeny se do vakcín přidávají různá adjuvantia ke zvýšení imunogenicity. V současné době je fázi klinického testování zhruba desítky proteinových a peptidových vakcín.

Jedna z vakcín, která je právě testována ve III. fázi klinických studií je GSK1572932A (NCT00480025), která cílí nádorový antigen MAGE-A3. Tato vakcína by měla sloužit jako podpůrná léčba po chirurgickém odstranění nádoru a předcházet vytvoření nového nádoru u těchto pacientů. Nová klinická studie fáze I a II právě zařazuje pacienty s NSCLC k testování peptidové vakcíny která cílí MUC-1 (NCT01720836). Další klinické studie právě probíhají pro mnohé vakcíny, které cílí různé nádorové antigeny jako NY-ESO-1 a p53.

### **3.5.1.2 Celobuněčné nádorové vakcíny**

Celobuněčné vakcíny necílí pouze jeden nádorový antigen, ale celé spektrum nádorových antigenů, které nádorová buňka exprimuje. Tyto vakcíny mohou být buď autologní, které obsahují pacientovy vlastní nádorové buňky, nebo allogenní obsahující nádorové linie izolované z jiného člověka.

Zatím nejdále ve výzkumu a klinických studiích celobuněčných vakcín pokročil přípravek GVAX®. Tato vakcína se skládá z ozářených autologních nádorových buněk, které jsou transfekcí adenovirovým vektorem přeprogramovány k produkci GM-CSF (Salgia et al., 2003). Tento imunostimulační cytokin pak v těle zajišťuje proliferaci a diferenciaci hematopoetických buněk, podporuje antigenní prezentaci a zvyšuje protilátkami zprostředkovanou cytotoxicitu. Na základě pozitivních výsledků z klinických studií fáze I byla spuštěna rozsáhlejší studie fáze I/II (Nemunaitis et al., 2004), která zahrnovala 43 pacientů s různými stádii NSCLC. U těchto pacientů bylo zjištěno, že jejich stav koreloval s množstvím sekretovaného GM-CSF, tudíž výsledky této studie předpokládaly, že je s vyšší dávkou vakcíny spojené delší přežití pacientů. S tímto předpokladem byla spuštěna další studie, která kombinovala autologní transfekované buňky s allogenní buněčnou linií modifikovanou k vyšší sekreci GM-CSF (Nemunaitis et al., 2006). Tato studie však, podobně jako další studie GVAXu u jiných nádorových onemocnění, nebyla úspěšná (Kelly et al., 2010).

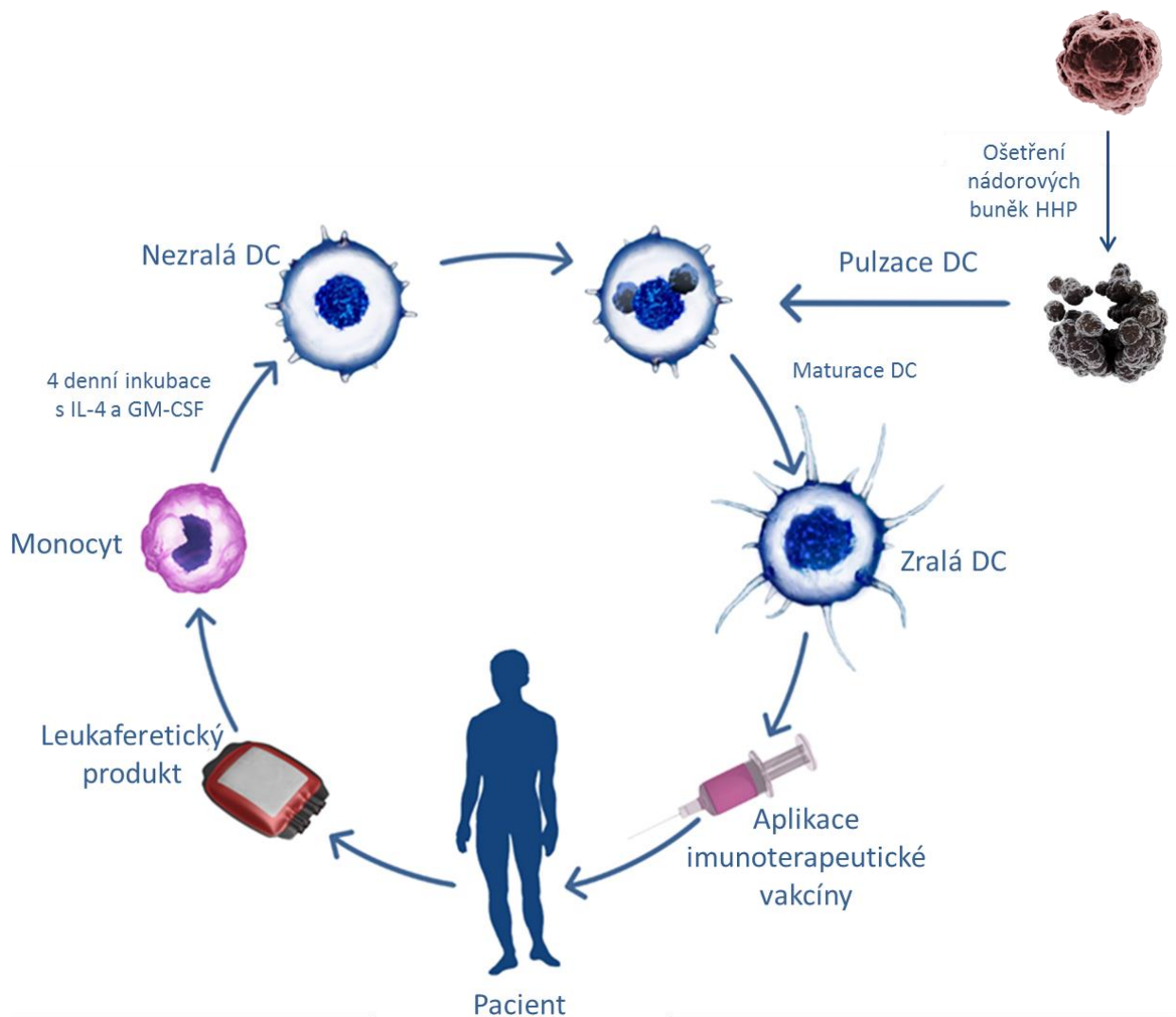
### **3.5.1.3 Imunoterapie založená na dendritických buňkách**

Vakcíny založené na DC využívají tyto antigen prezentující buňky jako adjuvancium a zároveň jako vektor pro transport a prezentaci nádorových antigenů imunitnímu systému. Mellman a kol. ve své publikaci navrhnul 3 nejdůležitější procesy, pro navození dlouhotrvající protinádorové imunity. Nejdříve je potřeba, aby DC na svém povrchu vystavovala vhodné nádorové antigeny. Dalším důležitým předpokladem je, že DC musí

maturovat a být schopné aktivovat specifickou T buněčnou odpověď. Nakonec musejí efektorové T lymfocyty překonat imunosupresivní nádorové mikroprostředí a proniknout přímo k nádorovým buňkám (Mellman et al., 2011).

#### **3.5.1.3.1 DCVAC**

V našich laboratořích firmy Sotio se pro výrobu protinádorových vakcín používají autologní DC, kdy se u pacienta provede leukaferetický odběr, při kterém jsou z krve separovány bílé krvinky. Z těch jsou následně separovány monocyty, které za přítomnosti IL-4 a GM-CSF diferencují v nezralé dendritické buňky. Nezralé DC jsou poté pulzovány, a tím aktivovány usmrcenými allogenními nádorovými buňkami (za využití vysokého hydrostatického tlaku). Takto připravené aktivované DC jsou vlastním terapeutickým přípravkem (obr. 3.5.1.3.1). Aktivované DC se poté injekčně vpraví do těla pacienta, kde migrují do lymfatických uzlin a aktivují naivní T lymfocyty. Aktivované efektorové T lymfocyty se namnoží a putují k nádorovým buňkám, které specificky zabíjejí. Klíčové jsou přitom cytotoxické T lymfocyty, které jsou schopny přímo usmrtit nádorovou buňku a zajistit tak dlouhotrvající protinádorovou odpověď.



Obr. 3.5.1.3.1 Schéma přípravy DCVACu. Po provedení leukaferetického odběru jsou izolované monocyty diferencovány za přítomnosti IL-4 a GM-CSF v nezralé DC, které jsou následně pulzovány nádorovými buňkami usmrcenými HHP. Zralé DC jsou poté jako terapeutická vakcína vpraveny zpět do těla pacienta v měsíčních intervalech po dobu 1 roku.



## **4 Materiály a metody**

### **4.1 Materiály**

#### **4.1.1 Přístroje**

Aparatura pro SDS-PAGE (Bio-Rad)  
Aparatura pro western blotting (Bio-Rad)  
Centrifuga Megafuge 16R (Thermo Scientific)  
CO<sub>2</sub>Inkubátor (Thermo Scientific)  
CoolCell- isopropanol-free zamrazovací kontejner (BIOCISION)  
Cytospin (StatSpin)  
ELISA reader (Tecan)  
GBox (Syngene)  
Konfokální mikroskop LCS SP5 Laser scanning confocal microscope (Leica)  
Průtokový cytometr BD LSR Fortessa (BD Biosciences)  
Single Tube Luminometer FB12 (Titertek Berthold)  
Sonikátor Q700 (QSonica)  
Světelný mikroskop TS100 Eclipse (Nikon)  
Termomixér (Eppendorf)  
UV box BLX-312 (Vilber Lourmat)  
Vortex (Grant bio)

#### **4.1.2 Roztoky a chemikálie**

0,5% roztok krystalové violeti (Penta)  
10x Permeabilization buffer (eBioscience)  
Akrylamid (Bio-Rad)  
Amonium persulfát; APS (Bio-Rad)  
AnnexinV binding buffer 10x (Exbio)  
BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific)  
Bovinní sérový albumin; BSA (Sigma Aldrich)  
Bromfenolová modř (Sigma Aldrich)  
Ficoll-Paque (GE Healthcare)  
Fixation/Permeabilization Concentrate (eBioscience)  
Fixation/Permeabilization Diluent (eBioscience)  
GM-CSF (PeproTech)

Human CD14 Selection Kit (STEMCELL Technologies)  
IL-2 (PeproTech)  
IL-4 (Gentaur)  
Krysí sérum (Sigma Aldrich)  
Marker molekulových vah (PageRuler Prestained Protein Ladder 10-170K) (Thermo Scientific)  
Paraformaldehyd; PFA (Serva)  
Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific)  
Poly I:C (Invitrogen)  
Ponceau-S Solution (Sigma Aldrich)  
Restore Western Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific)  
SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Scientific)  
TEMED (Bio-Rad)  
Triton X-100 (MP Biomedicals)  
Trypan Blue Stain 0,4% (Gibco)  
Tween 20 (Bio-Rad)

### **RIPA**

10mM TRIS pH 7,5	0,5 ml
150mM NaCl	1,5 ml
5mM EDTA	0,5 ml
1% Triton X 100	0,5 ml
H <sub>2</sub> O doplnit do	50 ml
+ inhibitor proteáz (10x) (Roche)	
+ PMSF (100x) (MP Biomedicals)	

### **5x Sample Buffer**

300mM TRIS pH 6,8	12 ml
5% SDS	2g
50% glycerol	20 ml
360 mM (2,5%) βME	1 ml
0,05% bromfenolová modř	20 mg
H <sub>2</sub> O doplnit do	40 ml

**10x Proteinový pufr**

Glycin	144,2 g
TRIS	30,3 g
SDS	10 g
H <sub>2</sub> O doplnit do	1000 ml

**10x Blotovací pufr**

Glycin	144 g
TRIS	30 g
H <sub>2</sub> O doplnit do	1000 ml

**1x Blotovací pufr**

10x blotovací pufr	100 ml
Methanol	200 ml
dH <sub>2</sub> O	700 ml

**10x TBS**

NaCl	80 g
TRIS	24,1 g
H <sub>2</sub> O doplnit do	1000 ml
Doplnit do pH 7,6 HCl	

**TBST**

10x TBS	100 ml
dH <sub>2</sub> O	900 ml
TWEEN20	1 ml

**5% zaostřovací gel - na 2 gely:**

30% akrylamid	0,5 ml
1M TRIS pH 6,8	375 µl
dH <sub>2</sub> O	2,1 ml
20% SDS	14 µl
10% APS	22,5 µl
TEMED	3 µl

#### **12% separační gel -na 2 gely:**

30% akrylamid	4,48 ml
1M TRIS pH 8,8	4,2 ml
dH <sub>2</sub> O	2,535 ml
20% SDS	62 µl
10% APS	56 µl
TEMED	7,5 µl

#### **4.1.3 Média a roztoky pro tkáňové kultury**

2-Mercaptoethanol 50µM; β-ME (Gibco)

AB-Human sérum (Life Technologies)

Antibiotika; Penicilin-Streptomycin Solution (Gibco)

Dimethylsulfoxid; DMSO (Sigma Aldrich)

Fetální bovinní sérum; FBS (PAA Cell Culture Company)

Glutamax (Gibco)

Non-Essential Amino Acids (Gibco)

PBS (Lonza)

PBS+EDTA (Lonza)

RPMI1640 médium, no Glutamine (Gibco)

Sodium Pyruvate 100mM (Gibco)

Trypsin-EDTA 0,25% (Gibco)

Kompletní médium: RPMI 1640 + 10 % FBS + 1 % Penicilin-Streptomycin +1 %  
Glutamax

T buněčné kompletní médium: RPMI 1640 + 10 % AB-Human sérum + 1 % Penicilin-  
Streptomycin +1 % Glutamax + 1 % Neesenciální aminokyseliny + 1 % Sodium Pyruvát +  
0,1 % β-ME

Zamrazovací médium: 70 % kompletní médium + 20 % FBS +10 % DMSO

#### **4.1.4 Protilátky**

AnnexinV- Dyomics 647 (Exbio); 1:90

CellMask™ Deep Red Plasma membrane Stain (Life Technologies); 1:600

CRT (Enzo); 1:40

DAPI dilactate (Invitrogen); 1:60  
Dylight 649 (Exbio); 1:600  
HSP70 (R&D Systems); 1:100  
HSP90 (Enzo); 1:40  
IgG1 (Life Technologies); 1:200  
IgG2a (Invitrogen); 1:200  
ProLong® Gold Antifade Reagent with DAPI (Invitrogen)  
Vybrant® DiD (Invitrogen); 1:200  
Vybrant® DiO (Invitrogen); 1:200

**mAb:**

CCR7 - APC-eFluor780 (eBioscience); 1:25  
CD11c - APC (Exbio); 1:50  
CD25 - PerCP-Cy5.5 (BioLegend); 1:20  
CD3 - Alexa700 (Exbio); 1:20  
CD4 - PE-Cy7 (eBioscience); 1:25  
CD8 - PE-Dy590 (Exbio); 1:20  
CD80 - FITC (Beckman Coulter); 1:20  
CD83 - PerCP-Cy5,5 (Beckman Coulter); 1:20  
CD86 - PE (Beckman Coulter); 1:20  
FoxP3 - AlexaFluor 488 (eBioscience)  
Helios - PE (BioLegend); 1:20  
HLA-DR - PE-Cy7 (BD Bioscience); 1:20

Protilátky použité při detekci metodou western blot jsou uvedeny v tabulce 4.2.5

#### **4.1.5 Použité buněčné linie**

Pro všechny experimenty byly použity plicní nádorové linie H520 (ATCC CRL-5810) a H522 (ATCC HTB-182) původně získané z lidských nádorů plic. Linie H520 je skvamózní karcinom plic a linie H522 je adenokarcinom plic, obě tyto linie patří do nemalobuněčného typu karcinomu plic.

## **4.2 Metody**

### **4.2.1 Práce s buněčnými kulturami**

Veškerá práce s buněčnými kulturami probíhala v laminárním boxu za použití sterilních roztoků, špiček a pipetovacích nástavců. Buňky byly kultivovány v CO<sub>2</sub> termostatu při 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>.

Z narostlých buněk bylo odstraněno médium, buňky byly opláchnuty 10 ml vytemperovaného roztoku PBS+EDTA a inkubovány v 3 ml roztoku Trypsinu+EDTA v termostatu dokud se neuvolnily do média. Poté bylo k buňkám přidáno 6 ml kompletního RPMI média a buňky byly důkladně resuspendovány. Suspenze byla centrifugována 5 minut při 320 x g. Sediment buněk byl resuspendován v kompletním RPMI médiu, rozdělen do kultivačních lahví a objem doplněn do 15 ml kompletního RPMI média. Buňky byly inkubovány při 37 °C v CO<sub>2</sub> inkubátoru.

Při zamrazování buněčných linií byly buňky sklizeny z kultivačních lahví, spočítány a resuspendovány v zamrazovacím médiu v koncentraci 5 miliónů/ml a zamrazeny v tekutém dusíku.

### **4.2.2 Příprava vzorků pro ošetření vysokým hydrostatickým tlakem**

Buňky určené k ošetření vysokým hydrostatickým tlakem byly sklizeny z kultivačních lahví, spočítány a centrifugovány, poté byly resuspendovány v 1,5 ml média a přeneseny do mikrozkušavky s propíchnutým víčkem. Před uzavřením víčka byl na hrdlo mikrozkušavky umístěn malý kousek sterilní membrány. Uzávěr mikrozkušavky byl přetažen parafilmem po celém obvodu tak, aby nebyla překryta dírka ve víčku. Mikrozkušavka byla zatavena do sterilního pytlíčku naplněného roztokem PBS. Takto připravené vzorky byly ošetřeny vysokým hydrostatickým tlakem po dobu 10 minut. Po ošetření byly buňky spočítány a použity k dalším experimentům.

### **4.2.3 Příprava lyzátů pro Western Blot**

Buňky byly sklizeny z kultivačních lahví, spočítány a rozděleny na různé podmínky. Buňky určené k ošetření UV byly vystaveny UVB 312nm záření po dobu 10 minut. V jednotlivých časových bodech byly buňky sklizeny a centrifugovány (420 x g, 5 min, 4 °C). Sediment buněk byl resuspendován ve 100 µl chladného RIPA lyzačního pufru a ponechán 20 minut na ledu. Poté byla suspenze centrifugována (19500 x g, 15 min, 4 °C) a výsledný supernatant byl odebrán a zamrazen.

#### **4.2.3.1 Stanovení koncentrace proteinu**

Koncentrace proteinů v buněčných lyzátech byla stanovena pomocí BCA Protein Assay kitu v 96 jamkové destičce za použití ředící řady BSA pro měření koncentrace proteinu v rozmezí 20-2000 µg/ml. Buněčné lyzáty byly naředěny 5x a 10x v tkáňové H<sub>2</sub>O a ke všem vzorkům bylo přidáno 200 µl směsi roztoků A a B v poměru 50:1, dodávaných v kitu. Destička byla 30 minut inkubována při 37 °C v CO<sub>2</sub> termostatu a následně byla pomocí ELISA readeru změřena absorbance vzorků a standardu při 560 nm. Z naměřených hodnot standardu byla vytvořena kalibrační křivka, podle které byla vypočítána koncentrace proteinu v jednotlivých vzorcích. Buněčné lyzáty byly doředěny tkáňovou vodou na stejnou koncentraci a ke všem byl přidán vypočítaný objem 5x koncentrovaného Sample Bufferu v poměru 4:1 na výslednou koncentraci 1x. Vzorky byly nakonec povařeny v termomixéru při 95 °C po dobu 10 minut, následně zamrazeny a později použity pro imunologickou detekci.

#### **4.2.3.2 Příprava lyzátů pro stanovení fosforylovaných proteinů**

Buňky byly sklizeny z kultivačních lahví, ošetřeny HHP nebo UVB zářením, spočítány a ve stejném počtu rozděleny do kultivačních lahví. V jednotlivých časových bodech byly buňky sklizeny a centrifugovány (420 x g, 5 min, 4 °C). Sediment buněk byl resuspendován ve 100 µl 1x Sample Bufferu a umístěn na led. Všechny vzorky byly na ledu krátce sonikovány (amplituda 40), aby došlo ke zlyzování buněk a následně byly povařeny v termomixéru při 95°C po dobu 10 minut. Výsledný lyzát byl zamrazena později použit pro imunologickou detekci

#### **4.2.4 SDS-PAGE elektroforéza**

Pro elektroforézu byl používán 5% zaostřovací gel a 12% separační gel. Na gel bylo nanášeno 5 µl markeru molekulových vah a vzorek o takovém objemu, aby bylo nanášeno 30 µg proteinu na jamku. Elektroforéza probíhala v Tris-glycinovém pufru po dobu 10-15 minut při elektrickém napětí 80 V (dokud nedošlo k seřazení vzorků na rozhraní zaostřovacího a separačního gelu), následně bylo elektrické napětí zvýšeno na 130 V, dokud vzorky nedoputovaly ke spodnímu okraji separačního gelu.

#### **4.2.5 Western Blot**

V blotovacím pufru byl složen tzv. „sendvič“, který se skládá z plastové schránky, blotovací houby, 3 vrstev filtračního papíru, nitrocelulózové membrány, gelu z proběhlé

elektroforézy, ze kterého byl odstraněn zaostřovací gel, a dalších 3 vrstev filtračního papíru a blotovací houby. Takto složený sendvič byl vložen do blotovacího zařízení a přelit vychlazeným blotovacím pufrem. Přenos proteinů na nitrocelulózovou membránu probíhal minimálně hodinu za stálého chlazení při elektrickém napětí 100 V.

Po přenosu proteinů na membránu byla membrána obarvena roztokem Ponceau-S (azobarvivo) pro potvrzení úspěšného přenosu proteinů. Obarvená membrána byla naskenována a odbarvena roztokem TBST. Poté byla membrána 30 minut blokována v 5% odtučněném mléce rozpuštěném v TBST a následně inkubována přes noc s primární protilátkou při 4 °C. Druhý den byla membrána opláchnuta 3x 10 minut v roztoku TBST a inkubována 1 hodinu se sekundární protilátkou. Poté byla membrána opět opláchnuta 3x 10 minut v roztoku TBST a inkubována 1 minutu ve vyvolávacím roztoku SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate. Vyvolání membrány proběhlo v přístroji GBox, doba expozice se pohybovala mezi 1 - 30 min. Vyvolaná membrána byla opláchnuta roztokem TBST a inkubována 10 minut s roztokem Restore Western Blot Stripping Buffer k odstranění navázané protilátky. Membrána byla opět opláchnuta 3x 10 minut v roztoku TBST, zablokována 30 minut v 5% odtučněném mléce a opakovaně použita pro detekci dalších proteinů. Použité primární a sekundární protilátky jsou uvedeny v tabulce 4.2.5.

Primární protilátky		
primární protilátka proti:	specifita	ředění
Actin (Sigma, #A2066)	králíčí	1:1000 (5% mléko v TBST)
eIF2 $\alpha$ (Cell Signaling, #9722)	králíčí	1:500 (5% BSA v TBST)
P-eIF2 $\alpha$ (Cell Signaling, #9721)	králíčí	1:1000 (5% BSA v TBST)
GAPDH (GeneTex, #GTX78213)	myší	1:1000 (5% mléko v TBST)
HSP70 (R&D, #MAB1663)	myší	1:1000 (5% BSA v TBST)
HSP90 (Enzo, #ADI-SPA-830-F)	myší	1:1000 (5% BSA v TBST)
Kalretikulín (Enzo, #ADI-SPA-601)	myší	1:500 (5% mléko v TBST)
Kaspáza-3 (Cell Signaling, #9662)	králíčí	1:200 (5% mléko v TBST)
Kaspáza-8 (Cell Signaling, #9746)	myší	1:500 (5% BSA v TBST)
Kaspáza-8 (Cell Signaling, #9496)	králíčí	1:500 (5% BSA v TBST)
Kaspáza-9 (Cell Signaling, #9502)	králíčí	1:200 (5% mléko v TBST)
p38 MAPK (Cell Signaling, #9212)	králíčí	1:500 (5% BSA v TBST)
P-p38 MAPK (Cell Signaling, #9211)	králíčí	1:500 (5% BSA v TBST)
SAPK/JNK (Cell Signaling, #9252)	králíčí	1:500 (5% BSA v TBST)
P-SAPK/JNK (Cell Signaling, #9251)	králíčí	1:500 (5% BSA v TBST)
Sekundární protilátky konjugované s křenovou peroxidázou		
sekundární protilátka proti:		
myší IgG (H+L) (Jackson Immunoresearch, #715-036-150))		1:10000 (5% mléko v TBST)
králíčí IgG (H+L) (Jackson Immunoresearch, #711-036-152))		1:10000 (5% mléko v TBST)

Tabulka 4.2.5 Seznam použitých protilátek a jejich ředění pro Western Blot

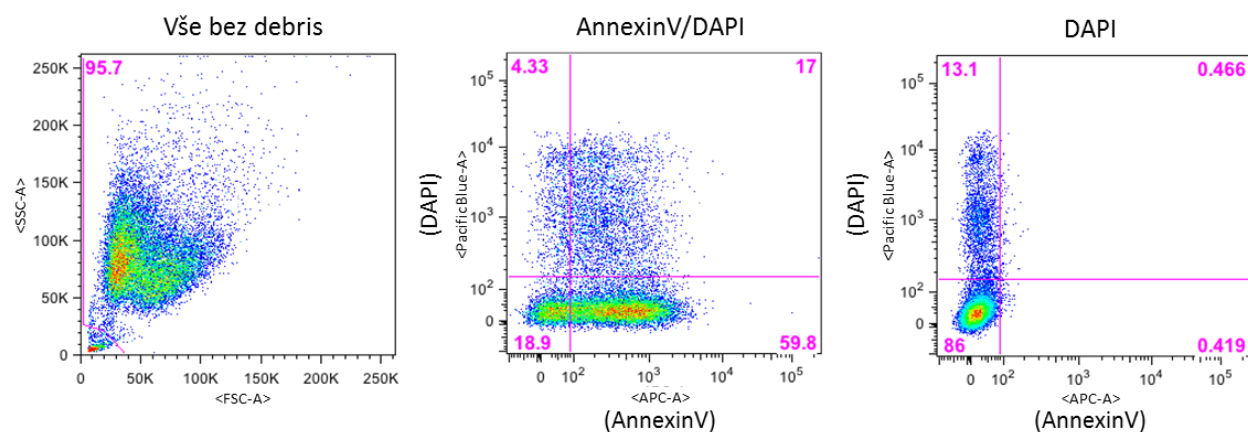


## 4.2.6 Analýza viability a imunogenních molekul pomocí průtokové cytometrie

### 4.2.6.1 Detekce viability buněk pomocí AnnexinV/DAPI barvení

Buňky byly promyty v roztoku PBS a inkubovány 20 minut ve tmě v barvicí směsi (80  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O, 10  $\mu$ l 10x Annexin binding buffer a 1  $\mu$ l AnnexinVDyomics 647). Po nabarvení byly buňky propláchnuty roztokem 1x Annexin binding buffer a následně roztokem PBS. Buňky byly měřeny na průtokovém cytometru v roztoku PBS s přidáním DAPI dilactate. Data byla analyzována FlowJo softwarem (verze 9.5.3.) následujícím způsobem (obr.4.2.6.1).

Z naměřených dat byl odebrán debris buněk (vybíráno ve vynesení side scatter area (SSC-A) proti forward scatter area (FSC-A)) a zbylá populace byla vymezena podle buněk nabarvených pouze na DAPI (Pacific-Blue). Výsledkem bylo vymezení čtyř populací, a to živých buněk (AnnexinV-/DAPI-), časně apoptotických buněk (AnnexinV+/DAPI-), pozdně apoptotických buněk (AnnexinV+/DAPI+) a nekrotických buněk (AnnexinV-/DAPI+).



Obr. 4.2.6.1 Analýza životnosti nádorových buněk a jejich vymezení.

### 4.2.6.2 Detekce imunogenních molekul

Buňky byly promyty v PBS a inkubovány 25 minut při 4 °C s primární protilátkou naředěnou v PBS. Poté byly buňky promyty 2x 5 minut roztokem PBS a následně inkubovány 30 minut při 4 °C se sekundární protilátkou (Dylight 649) naředěnou v PBS. Buňky byly opět promyty 2x 5 minut roztokem PBS a měřeny na průtokovém cytometru. Data byla analyzována FlowJo softwarem a to tak, že byla opět uvažována pouze populace buněk bez debris. Z této množiny buněk byl stanoven aritmetický průměr (Mean) pro každý sledovaný parametr a výsledné hodnoty interpretovány jako intenzity fluorescence (MFI) v grafech, od kterých byla odečtena hodnota sekundární protilátky.

#### **4.2.7 Příprava preparátů pro mikroskopii**

Buňky byly fixovány 30 minut 4% paraformaldehydem v PBS při laboratorní teplotě za mírného kývání. Poté byly buňky permeabilizovány 5 minut v 0,2% roztoku Tritonu X-100 v PBS a 2x 5 minut promyty roztokem PBS. Zafixované buňky byly inkubovány 30 minut v roztoku 1% BSA v PBS a následně byly buňky inkubovány 25 minut při 4 °C s primární protilátkou naředěnou v PBS. Buňky byly 2x 5 minut promyty roztokem PBS, poté byla k buňkám na 30 minut přidána sekundární protilátka naředěná v PBS. Buňky byly opět promyty 2x 5 minut roztokem PBS. Suspenze buněk byla přenesena na podložní sklo pomocí přístroje Cytospin. Po zaschnutí byl preparát zakápnut montovacím médiem ProLong Gold Antifade Reagent s DAPI a přikryt krycím sklíčkem. Preparáty byly pozorovány konfokálním mikroskopem LCS SP5 (Leica).

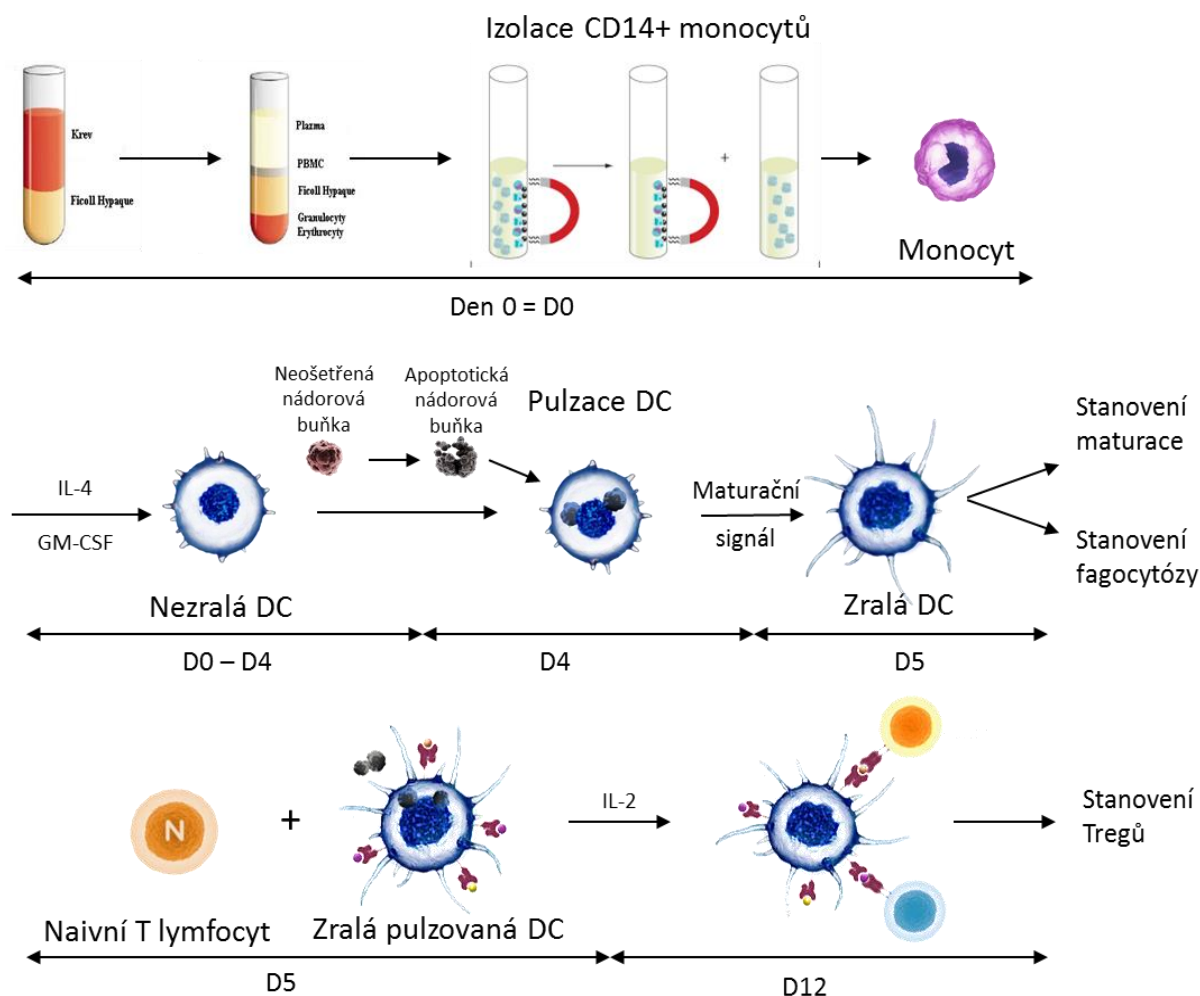
#### **4.2.8 Stanovení intracelulární a extracelulární koncentrace ATP**

Buňky byly sklizeny a v koncentraci 1 milión/ml rozděleny po 1 ml do mikrozkušavek (pro každý čas a podmínku zvlášť), ve kterých byly dále ošetřeny vysokým hydrostatickým tlakem, nebo UVB zářením. Po ošetření byly buňky ponechány v CO<sub>2</sub> inkubátoru při 37 °C. V jednotlivých časových bodech byl odebrán a zamrazen supernatant buněk (S1), buňky byly rychle zcentrifugovány a byl odebrán další supernatant (S2). Zbytek buněk byl zlyzován 1x permeabilizačním pufrem a výsledný lyzát zamrazen (L). Extracelulární koncentrace ATP byla naměřena z S1 a intracelulární koncentrace ATP z S2+L. Měření koncentrace ATP bylo prováděno na přístroji Single Tube Luminometer FB12.

#### **4.2.9 Příprava dendritických buněk in vitro**

Obsah buffy coatu byl přenesen do kultivační lahve, naředěn v poměru 1:1 s PBS+EDTA a pomalu přenesen do 50 ml centrifugační zkumavky na 15 ml Ficollu. Po centrifugaci (600 x g, 30 min, 20 °C, Acc 1, Dec 0) byl do nové 50 ml centrifugační zkumavky odebrán prstenec periferních mononukleárních buněk (PBMC), který leží na rozhraní Ficollu a plazmy. PBMC byly promyty 2x 10 minut v roztoku PBS+EDTA a 1x 10 min v roztoku PBS. Zcentrifugované PBMC byly resuspendovány v roztoku PBS + PBS+EDTA (poměr 1:1), spočítány a naředěny na koncentraci 1x 10<sup>8</sup> buněk/ml. Z PBMC byly pomocí Human CD14 Selection Kit (STEMCELL Technologies) vyizolovány CD14+ monocyty a zbytek PBMC obsahující lymfocyty byly zamrazeny. Vyizolované CD14+ monocyty byly spočítány a nasazeny do 6 jamkové desky v koncentraci 2,5x 10<sup>6</sup>

buněk/jamku do 5 ml kompletního RPMI média obsahujícího IL-4 (finální koncentrace 20ng/ml) a GM-CSF (finální koncentrace 2500U/ml). Buňky byly umístěny do CO<sub>2</sub> inkubátoru (den 0 = D0), kde se po 3 dny diferenciovaly (D0-D4) (obr. 4.2.9).



Obr. 4.2.9 Schéma pracovního postupu izolace, pulzace a vyhodnocení DC *in vitro*.

#### 4.2.10 Sběr DC a pulzace nádorovými buňkami

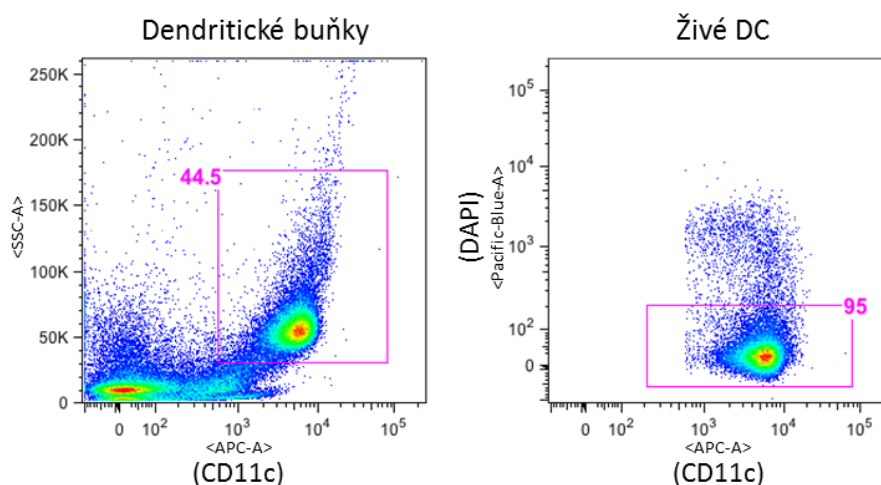
Nezralé DC byly odpipetovány z jamek, které byly ještě 2x opláchnuty teplým PBS (D4). Buňky byly zcentrifugovány, spočítány a naředěny kompletním RPMI médiem s IL-4 (finální koncentrace 20 ng/ml) a GM-CSF (finální koncentrace 2500 U/ml) do koncentrace  $2 \times 10^6$  DC/ml. DC byly po 100  $\mu$ l nasazeny do 96 jamkových U desek a pulzovány 40  $\mu$ l nádorových buněk (v koncentraci  $10^6$  nádorových buněk/ml ošetřených HHP, UVB, nebo neošetřených) a 60  $\mu$ l kompletního RPMI média. Pro stanovení fagocytózy byly buňky před nasazením do desek nabarveny v koncentraci  $2 \times 10^6$  buněk/ml při 37 °C po dobu 20 minut (DC- DiO, nádorové buňky – DiD). Buňky byly inkubovány při 37 °C nebo 4 °C, 5% CO<sub>2</sub> a po 4 hodinách bylo přidáno poly I:C (finální koncentrace

25µg/ml). Buňky byly inkubovány dalších 20 hodin v CO<sub>2</sub> inkubátoru nebo v lednici v případě buněk určených pro měření fagocytózy ve 4 °Ca následně u nich byla stanovena maturace DC a fagocytóza DC (D5).

#### 4.2.10.1 Stanovení maturace

Po 24 hodinové inkubaci DC s nádorovými buňkami (D5) byly buňky přepipetovány do 96 jamkové V desky, zcentrifugovány a inkubovány 25 minut při 4 °C s mixem protilátek (CCR7-APC-eFluor780, CD11c-APC, CD80-FITC, CD83-PerCP-5.5, CD86-PE, HLA-DR-PE-Cy7) naředěných v PBS. Buňky byly promyty roztokem PBS a po přidání DAPI dilactate měřeny na průtokovém cytometru. Data byla analyzována FlowJo softwarem následujícím způsobem (obr. 4.2.10.1).

Nejprve byly vybrány pouze dendritické buňky (CD11c+; vybíráno ve vnesení SSC-A proti APC-A) a z nich poté pouze živé DC (CD11c+ DAPI-; vybíráno ve vnesení Pacific Blue-A proti APC-A). Z této množiny buněk byl stanoven aritmetický průměr (Mean) pro každý sledovaný parametr a výsledné hodnoty interpretovány jako intenzity fluorescence (MFI) v grafech.

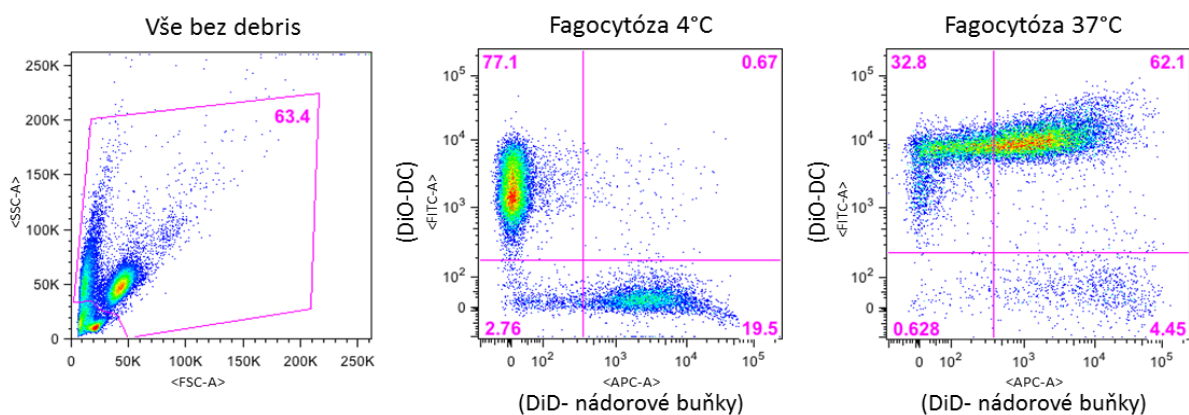


Obr. 4.2.10.1 Výběr populace živých DC, u kterých byla stanovována maturace.

#### 4.2.10.2 Stanovení fagocytózy DC

Po 24 hodinové inkubaci DC s nádorovými buňkami (D5) byly buňky změřeny na průtokovém cytometru. Data byla analyzována FlowJo softwarem následujícím způsobem (obr. 4.2.10.2).

Z naměřených dat byl odebrán debris buněk (vybíráno ve vynesení SSC-A proti FSC-A) a cílem našeho zájmu bylo procento dvojité pozitivních buněk (vybíráno ve vynesení FITC-A proti APC-A).



Obr. 4.2.10.2 Stanovení fagocytózy při 4 a 37 °C.

#### 4.2.10.2.1 Příprava preparátů pro mikroskopii

Po 24 hodinové inkubaci DC s nádorovými buňkami (D5) byly buňky 2x 5 minut propláchnuty roztokem PBS a poté byly 15 minut fixovány 4% paraformaldehydem v PBS při laboratorní teplotě za mírného kývání. Suspenze buněk byla přenesena na podložní sklo pomocí přístroje Cytospin. Po zaschnutí byl preparát zakápnut montovacím médiem ProLong Gold Antifade Reagent s DAPI a přikryt krycím sklíčkem. Preparáty byly pozorovány konfokálním mikroskopem LSR SP5.

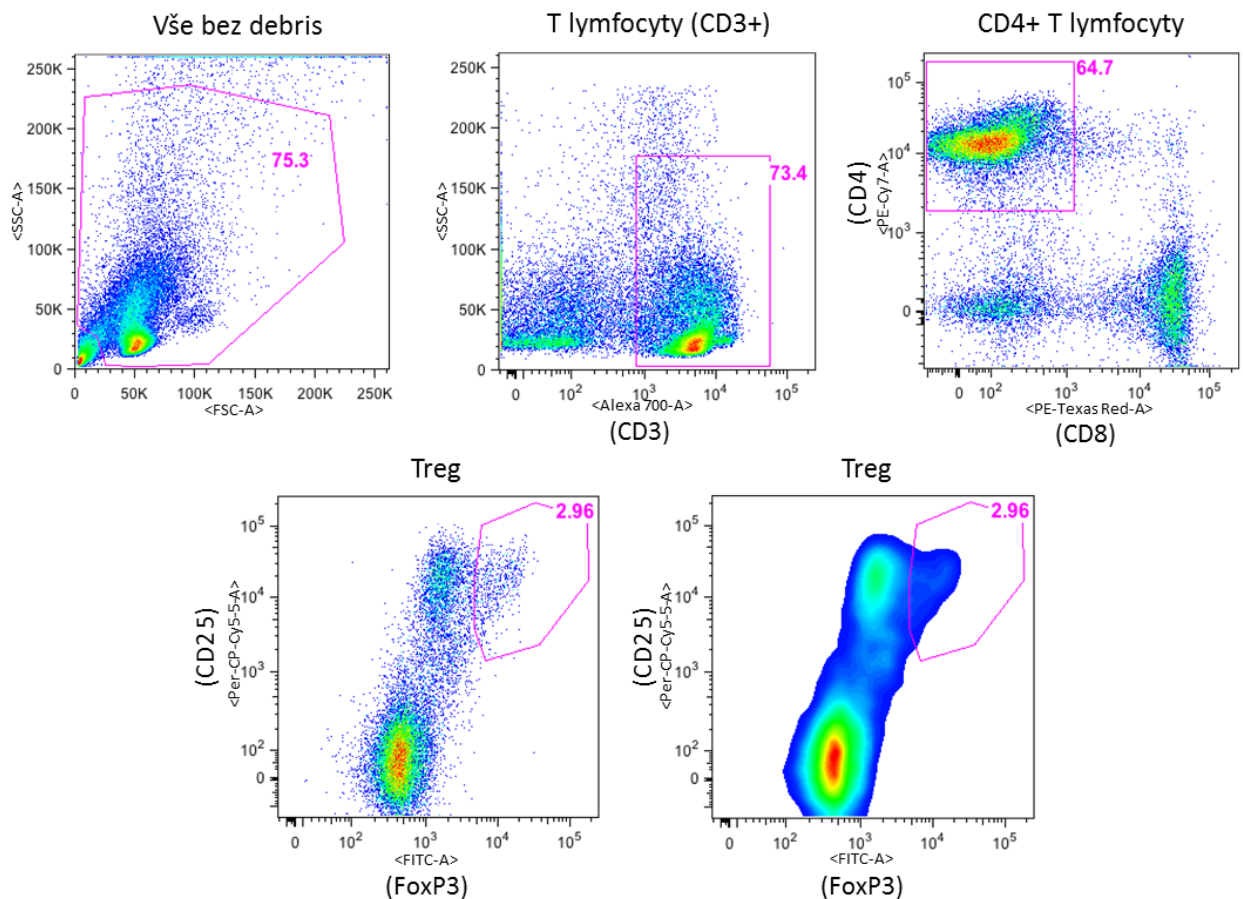
#### 4.2.10.3 Cross-prezentační test (T regulační buňky)

T-lymfocyty byly den před pulzací DC nádorovými buňkami (D3) rozmrazeny a nasazeny do kultivačních lahví v kompletním T buněčném médiu. Druhý den (D4) byl obsah lahvíček sklizen, zcentrifugován a resuspendován v novém kompletním T buněčném médiu na koncentraci  $2 \times 10^6$  T buněk/ml. T lymfocyty byly po 100  $\mu$ l nasazeny do 96 jamkové U desky a kultivovány v CO<sub>2</sub> inkubátoru do dalšího dne, kdy k nim bylo přidáno 40  $\mu$ l pulzovaných maturovaných DC (D5) (obr. 4.2.9). Buňky byly týden inkubovány při 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> za přidání 20 U/ml IL-2 v den 7 a 10.

Po týdnu inkubace T lymfocytů s pulzovanými DC (D12) byly buňky přepipetovány do 96 jamkové V desky, zcentrifugovány a inkubovány 25 minut při 4 °C s mixem protilátek (CD25-PerCP-Cy5.5, CD3-Alexa700, CD4-PE-Cy7, CD8-PE-Dy590) naředěných v PBS. Buňky byly promyty 2x 5 minut v roztoku PBS a následně inkubovány 30 minut při 4 °C ve směsi Fixation/Permeabilization Concentrate a

Fixation/Permeabilization Diluent v poměru 1:3. Buňky byly propláchnuty 2 minuty v 1x permeabilizačním pufru a dále inkubovány 25 minut při 4 °C ve směsi intracelulárních protilátek (FoxP3-AlexaFluor 488, Helios-PE) naředěných v 1x permeabilizačním pufru, obsahujícím 2% krysí sérum. Buňky byly promyty 2x 5 minut roztokem PBS a měřeny na průtokovém cytometru. Data byla analyzována FlowJo softwarem následujícím způsobem (obr. 4.2.10.3).

Z naměřených dat byl odebrán debris buněk (vybírání ve vnesení SSC-A proti FSC-A). Z této podmnožiny byly vybrány T buňky (CD3+; vybírání ve vnesení SSC-A proti Alexa 700-A). Dále byly vybrány CD4 pozitivní buňky (vybírání ve vnesení PE-Cy7 proti PE- Texas Red) a z nich následně samotné T regulační buňky, které jsou CD4+FoxP3+CD25+ (vybírání ve vnesení Per-CP-Cy5-5 proti FITC-A).



Obr. 4.2.10.3 Výběr regulačních T lymfocytů (Treg) z populace buněk naměřených na průtokovém cytometru

#### 4.2.11 Klonogenní esej

Buňky byly sklizeny, ošetřeny vysokým hydrostatickým tlakem, nebo UVB zářením a spočítány. Při sklizení buněk bylo odebrané kondiciované kultivační médium přefiltrováno přes 0,22  $\mu\text{m}$  filtrační jednotku a smícháno v poměru 1:1 s novým kompletním médiem. V tomto kompletním/kondiciovaném médiu (poměr 1:1) byly buňky resuspendovány na koncentraci 56 000 buněk/ml a po 3 ml nasazeny do 6 jamkové desky a umístěny do CO<sub>2</sub> inkubátoru. Kontrolní neošetřené buňky (pozitivní kontrola) byly nasazeny v koncentraci 30 buněk/ml. Zbytek kompletního/kondiciovaného média byl rozdělen po 3 ml do 6 jamkové desky (slouží jako negativní kontrola). Desky byly kultivovány v inkubátoru při 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> po dobu 14 dnů. Po ukončení inkubace bylo médium opatrně slito z desek a do jamek byla přikapána 0,5% krystalová violet' (cca 200  $\mu\text{l}$  na jamku). Po 3 minutách byly jamky vypláchnuty vodou a ponechány uschnout. Desky byly vyfoceny v přístroji Gbox a dále z nich byla vypočítána účinnost tvorby kolonií.

## 5 Výsledky

### 5.1 Aktivace apoptózy ošetřením buněk vysokým hydrostatickým tlakem

#### 5.1.1 Aktivace kaspázy-8, -9 a -3 po ošetření plicních nádorových linií HHP

V naší laboratoři probíhají v současné době mimo jiné experimenty využívající vysokého hydrostatického tlaku k indukci imunogenní buněčné smrti na prostatické nádorové linii LNCap a ovariální nádorové linii OV-90.

Na základě výsledků z linií LNCap a OV-90 jsme pro plicní nádorové linie H520 a H522 také použili HHP o hodnotě 250 MPa. Po ošetření plicních nádorových linií HHP o hodnotě 250 MPa však dochází k rychlé degradaci proteinů u obou sledovaných linií již v čase 0 H (obr. 5.1.1A), což lze pozorovat jak nepřítomností neštěpených forem sledovaných kaspáz, tak na kontrolách aktinu a glycerinaldehyd 3-fosfát dehydrogenáze (GAPDH). Po snížení HHP na hodnotu 150 MPa jsme pozorovali aktivaci iniciačních kaspáz-8 a -9 a efektorové kaspázy-3 (obr. 5.1.1B) již v čase 0 H po ošetření HHP v případě linie H522 a v čase 3 H u linie H520. Dále jsme se rozhodli pro testování HHP o hodnotě 200 a 225 MPa. Při ošetření buněk HHP o hodnotě 200 a 225 MPa opět dochází k rychlé aktivaci všech sledovaných kaspáz, avšak u HHP o hodnotě 225 MPa dochází v pozdějších časech opět k degradaci proteinů, a to především u linie H520, což lze opět sledovat na kontrolách aktinu a GAPDH (obr. 5.1.1C).

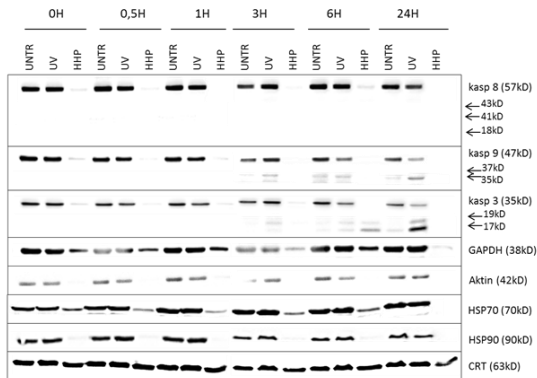
V porovnání s neošetřenými buňkami (UNTR) a buňkami ošetřenými UVB zářením dochází v buňkách ošetřených HHP k aktivaci iniciačních kaspáz-8 a -9 a efektorové kaspázy-3.

Zároveň jsme detekovali přítomnost imunogenních molekul HSP70, HSP90 a CRT v buněčných lyzátech. Zdá se, že HHP o hodnotě 250 MPa má na buňky příliš destruuující vliv, protože v takto ošetřených buňkách dochází k rychlé degradaci proteinů, a to jak neštěpených forem kaspáz, tak proteinů teplotního šoku i aktinu a GAPDH v buňkách.

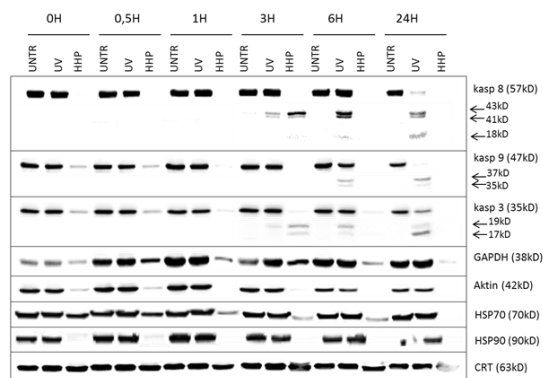


**A**

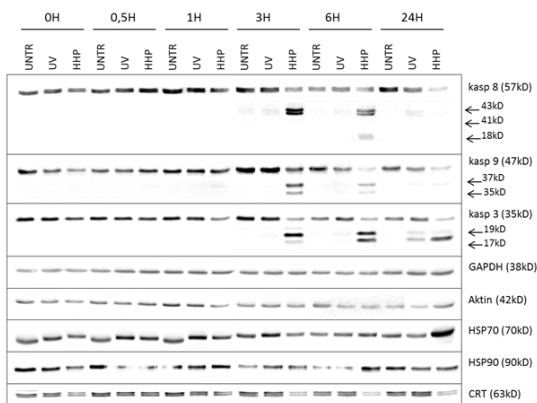
H520- tlak 250 MPa



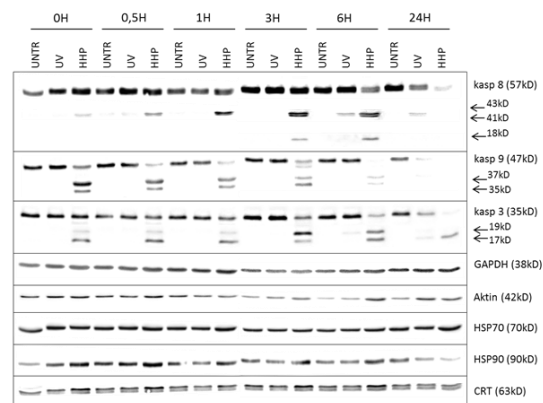
H522- tlak 250 MPa

**B**

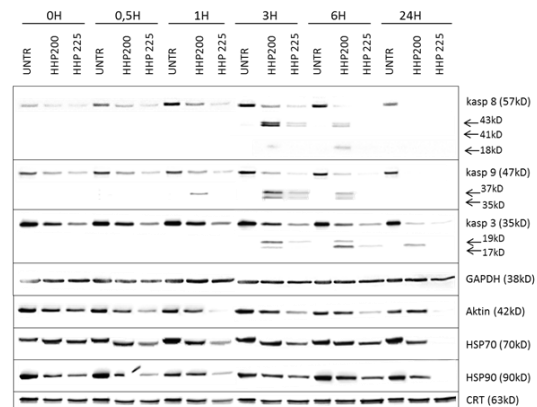
H520- tlak 150 MPa



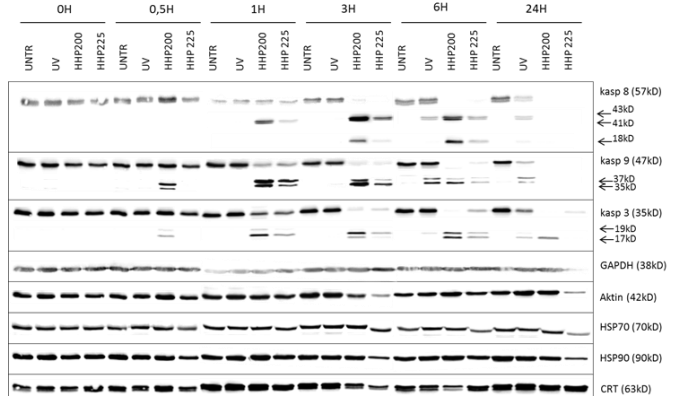
H522- tlak 150 MPa

**C**

H520



H522

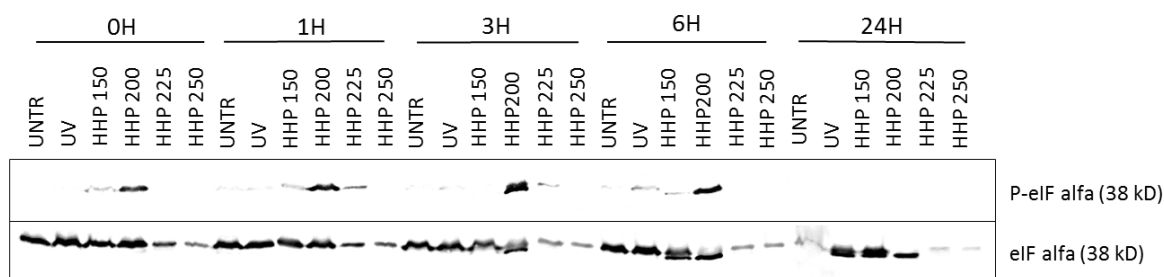


**Obr. 5.1.1 Kinetika aktivace kaspázy-8, -9 a -3 a přítomnosti imunogenních molekul HSP70, HSP90 a CRT v nádorových buňkách po ošetření vysokým hydrostatickým tlakem a UVB zářením.** Detekce aktivace kaspáz (-8, -9 a -3), jejich štěpných produktů a imunogenních molekul (CRT, HSP70 a HSP90) v buňkách H520 a H522 ošetřených HHP nebo UVB zářením metodou western blot. Aktin a GAPDH představují interní kontrolu nanášky proteinu. (A) při použití HHP 250 MPa, (B) 150 MPa, (C) 200 MPa nebo 225 MPa.

### 5.1.2 Fosforylace eIF2 $\alpha$

Fosforylace eIF2 $\alpha$  je důležitý krok v translokační dráze CRT v ICD vyvolané antracykliny, oxaliplatinou a UVC zářením. Detekovali jsme fosforylaci eIF2 $\alpha$  v buňkách linie H522 po ošetření HHP. Ukázalo se, že pouze u buněk ošetřených HHP o hodnotě 200 MPa dochází k výrazné fosforylaci eukaryotického iniciačního faktoru 2 $\alpha$  již v čase 0 H. U buněk ošetřených HHP o hodnotě 225 a 250 MPa dochází v pozdějších časech k degradaci nefosforylovaného eIF2 $\alpha$ .

H522

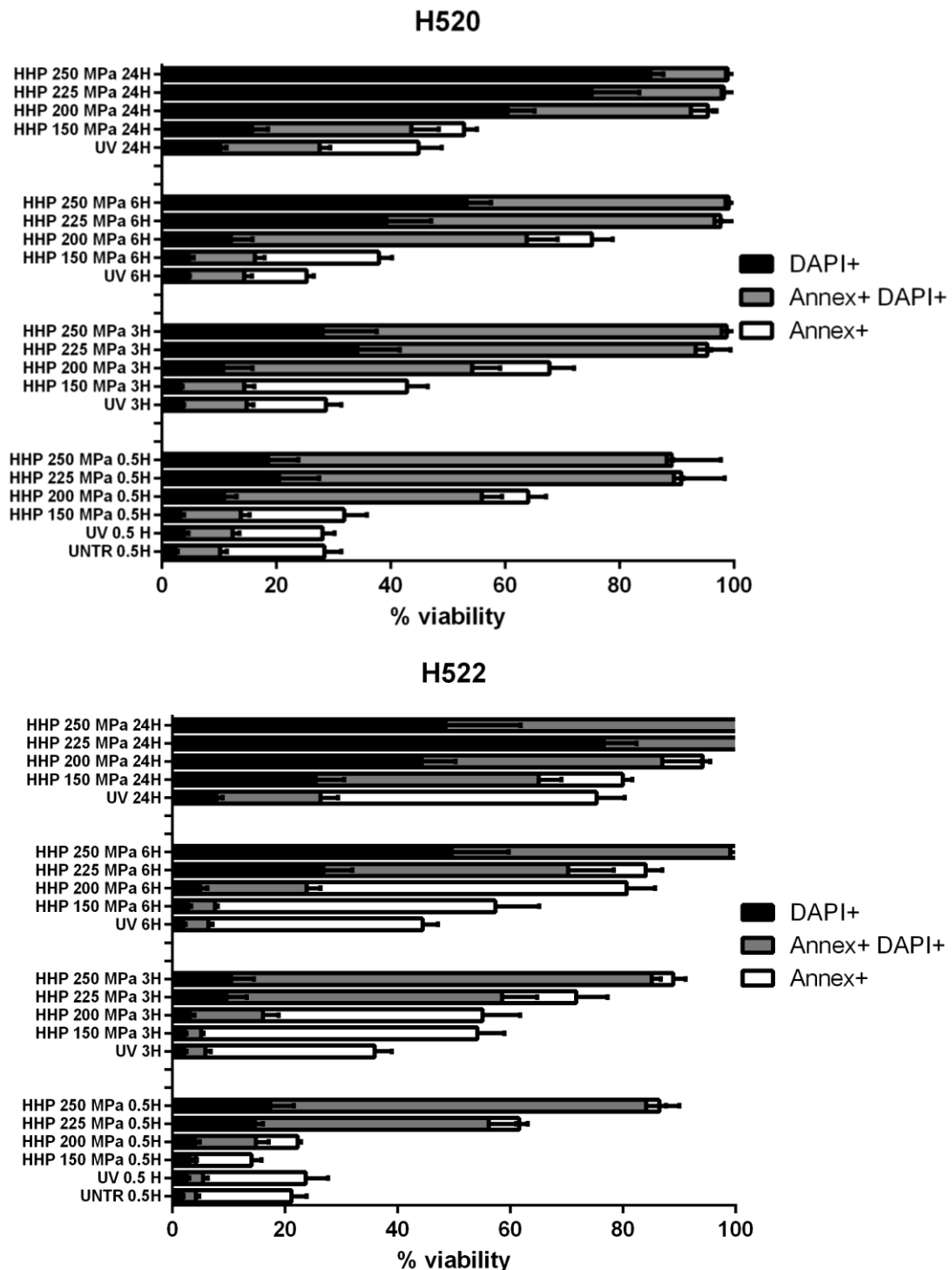


**Obr. 5.1.2 Kinetika fosforylace eIF2 $\alpha$  v nádorových buňkách H522 po ošetření HHP.**

Fosforylace eIF2 $\alpha$  v časech 0, 1, 3, 6 a 24 hodin v buněčné linii H522 po ošetření HHP o hodnotě 150, 200, 225 a 250 MPa, UVB zářením, nebo neošetřených buněk.

### 5.1.3 HHP vyvolává v plicních nádorových liniích H520 a H522 apoptózu

Dále jsme se zaměřili na stanovení životnosti (viability) u buněk ošetřených HHP o hodnotě 150, 200, 225 a 250 MPa v časech 0,5, 3, 6 a 24 hodin. Již po 6 hodinách došlo u zhruba 80 % buněk ošetřených HHP o hodnotě vyšší než 150 MPa k buněčné smrti. Většina těchto buněk se nacházela v časně (AnnexinV+/DAPI-) nebo pozdní (AnnexinV+/DAPI+) apoptóze a se zvyšujícím se tlakem vzrůstalo procento nekrotických buněk (AnnexinV-/DAPI+) (obr.5.1.3). Především u linie H522 lze pozorovat vysoké procento časně apoptotických buněk v čase 6 hodin, které jsou pro koncept ICD nejvýznamnější.



**Obr. 5.1.3 Životnost (viabilita) nádorových buněk po ošetření vysokým hydrostatickým tlakem.** Charakterizace buněčné smrti po ošetření buněk HHP na průtokovém cytometru v časech 0,5, 3, 6 a 24 hodin. Buňky H520 a H522 značené Annexinem V (vazba na fosfatidylserin na cytoplazmatické membráně) a DAPI (vazba na AT bohaté oblasti v DNA). Nekrotické buňky jsou vyznačeny černě (DAPI pozitivní), pozdně apoptotické buňky jsou vyznačeny šedě (AnnexinV pozitivní, DAPI pozitivní) a časně apoptotické buňky vyznačené bílým sloupcem (AnnexinV pozitivní buňky).

## 5.2 HHP indukuje expresi imunogenních molekul na povrchu nádorových buněk

Porovnávali jsme expresi imunogenních molekul CRT, HSP70 a HSP90 na plicních nádorových liniích H520 a H522 ošetřených vysokým hydrostatickým tlakem s buňkami ošetřenými UVB zářením, které nevyvolává ICD. Měření jsme prováděli na průtokovém cytometru a výsledky interpretovali jako průměrnou intenzitu fluorescence (MFI; mean fluorescence intensity). HHP indukuje expresi imunogenních molekul u obou testovaných linií, oproti neimunogennímu UVB záření (obr. 5.2.A). Expres CRT, jakožto nejdůležitější imunogenní molekuly je nejvyšší při použití HHP o hodnotě 200 MPa u obou sledovaných linií s maximem po 24 hodinách. Expres HSP70 stoupá s hodnotou použitého vysokého hydrostatického tlaku a lehce klesá s časem, nicméně v čase 24 H je signifikantně exprimován pro všechny hodnoty HHP oproti neimunogennímu UVB záření. Expres HSP90 se mezi testovanými nádorovými liniemi liší, u linie H522 je nejvyšší expres HSP90 v čase 24 H pro HHP 200 MPa a u linie H520 roste expres HSP90 s hodnotou použitého HHP a v čase mírně klesá, přesto je v čase 24 H značně zvýšená expres HSP90 u HHP nad 150 MPa (obr. 5.2.A).

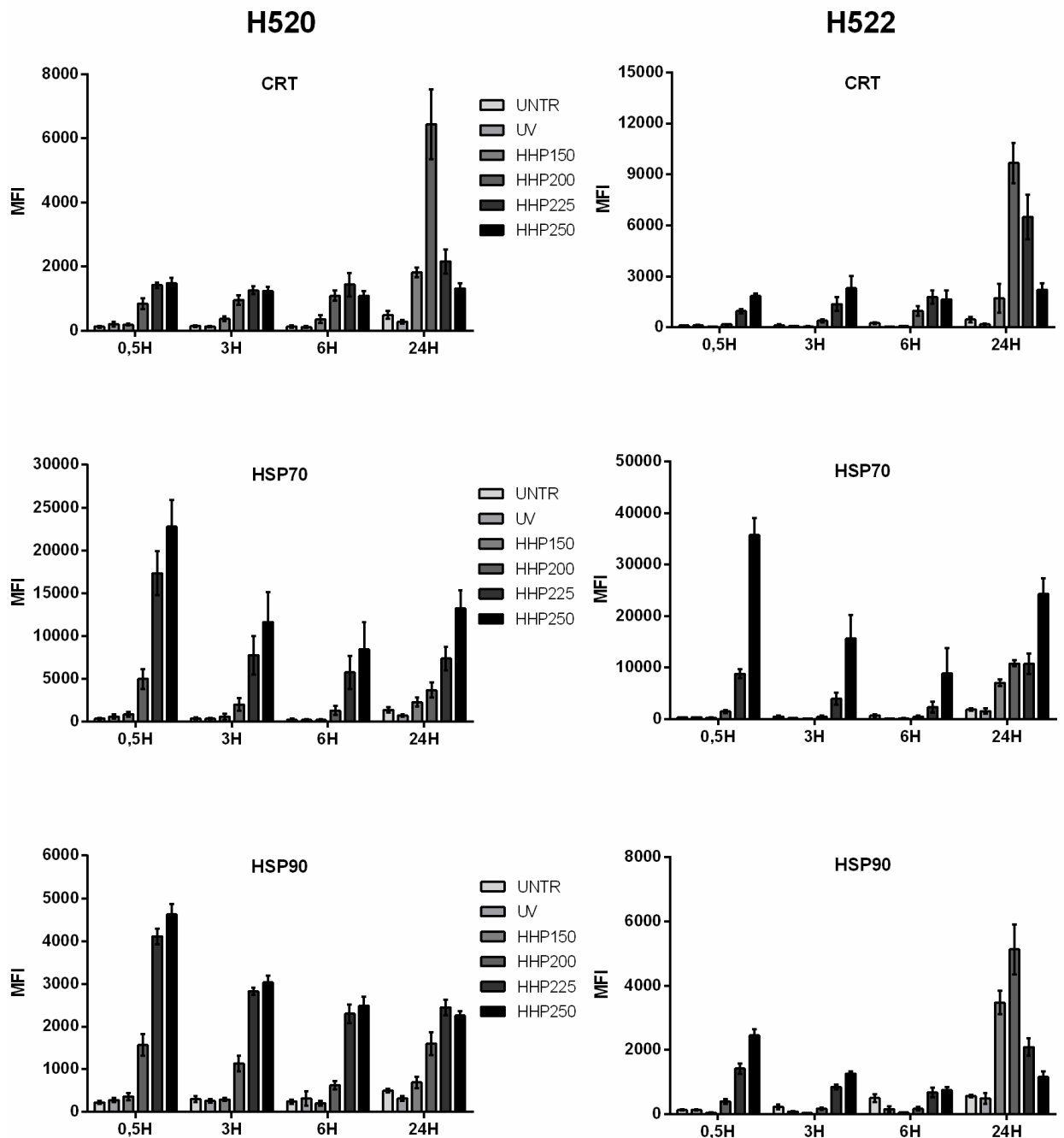
Expresi imunogenních molekul na povrchu nádorových buněk jsme dále ověřili pomocí konfokálního mikroskopu, kde jsme opět pozorovali vysokou expresi CRT u obou linií při ošetření buněk HHP. CRT byl oproti výsledkům z průtokového cytometru více exprimovaný již v čase 0,5 H, ale nejvíce opět v čase 24 H při použití HHP o hodnotě 200 MPa, především u linie H522 (obr. 5.2.B).

Z obrázků z konfokálního mikroskopu, je dále patrná nejvyšší expres HSP70 u obou linií v čase 0,5 H při použití HHP o hodnotě 225 a 250 MPa (obr. 5.2.B). Tyto výsledky korelují s výsledky z průtokového cytometru (obr. 5.2.A).

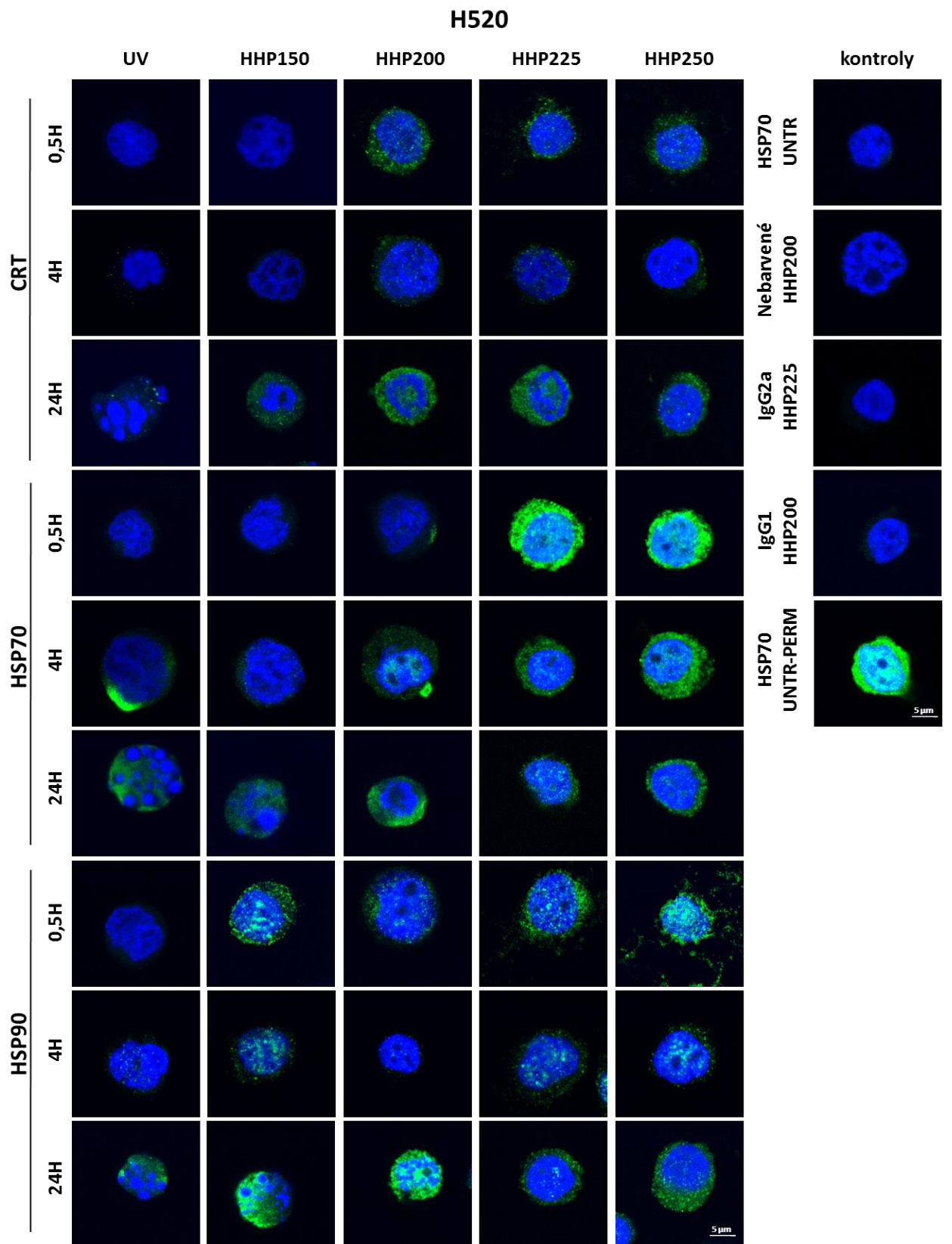
U linie H522 jsme pozorovali jak rovnoměrně rozprostřený HSP90, tak apikálně lokalizovaný (obr. 5.2.B) a trend exprese naměřený na průtokovém cytometru (obr. 5.2.A) odpovídá výsledkům získaným z konfokálního mikroskopu. Nejvyšší expres byla pozorována v čase 24 H při použití HHP o hodnotě 150 a 200 MPa. U linie H520 je HSP90 nejvíce exprimovaný v čase 24 H při použití HHP o hodnotě 150 a 200 MPa podobně jako je tomu v případě linie H522 (obr. 5.2.B).

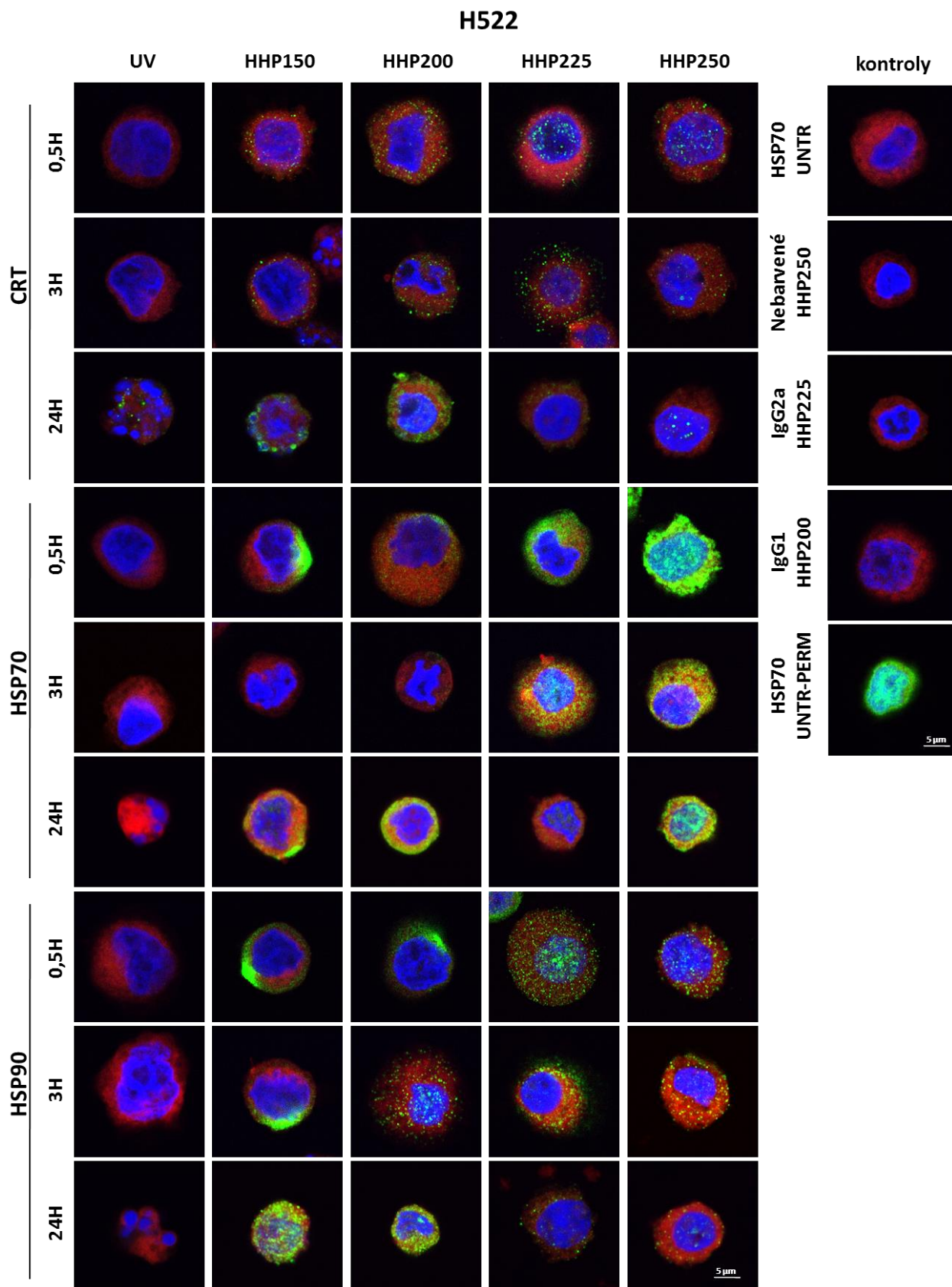
Jako kontroly jsme použili neošetřené buňky, které nevykazovaly žádnou expresi sledovaných molekul, nebarvené buňky, u kterých jsme nepozorovali žádnou fluorescenci

sekundární protilátky. Dále jsme použili buňky barvené pouze sekundární protilátkou, u kterých jsme opět neviděli žádnou fluorescenci sekundární protilátky a permeabilizované buňky, u kterých byla naopak vysoká fluorescence sekundární protilátky.



**Obr. 5.2.A Kinetika exprese imunogenních molekul po ošetření buněk H520 a H522 vysokým hydrostatickým tlakem.** Expresse CRT, HSP70 a HSP90 je interpretována jako průměrná intenzita fluorescence (MFI) a byla měřena v časech 0,5, 3, 6 a 24 hodin. Buňky byly ošetřeny HHP o hodnotě 150, 200, 225 a 250 MPa. Kontrolními buňkami byly neošetřené buňky a buňky ošetřené neimunogenním UVB zářením.



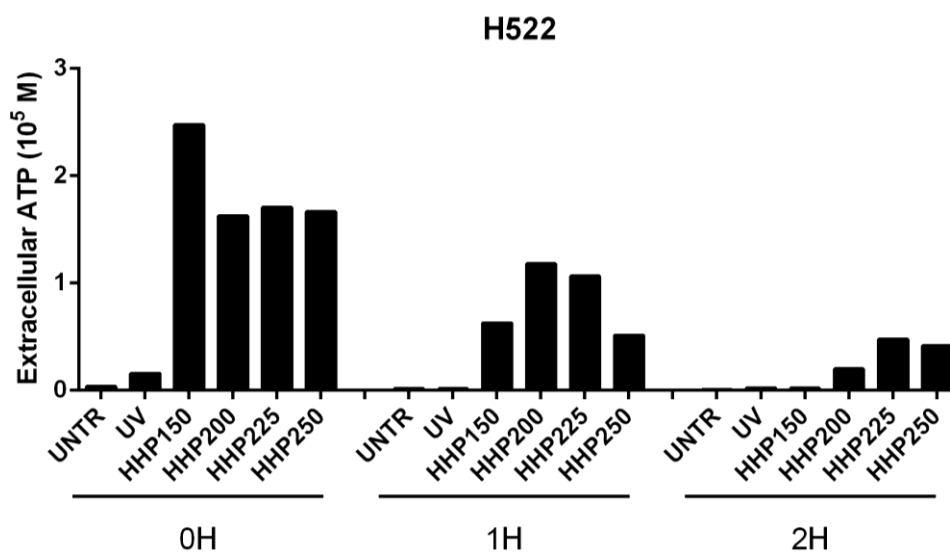


Obr. 5.2.B Detekce exprese imunogenních molekul na nádorových buňkách po ošetření HHP a UVB zářením pomocí konfokálního mikroskopu. Nádorové buňky linie

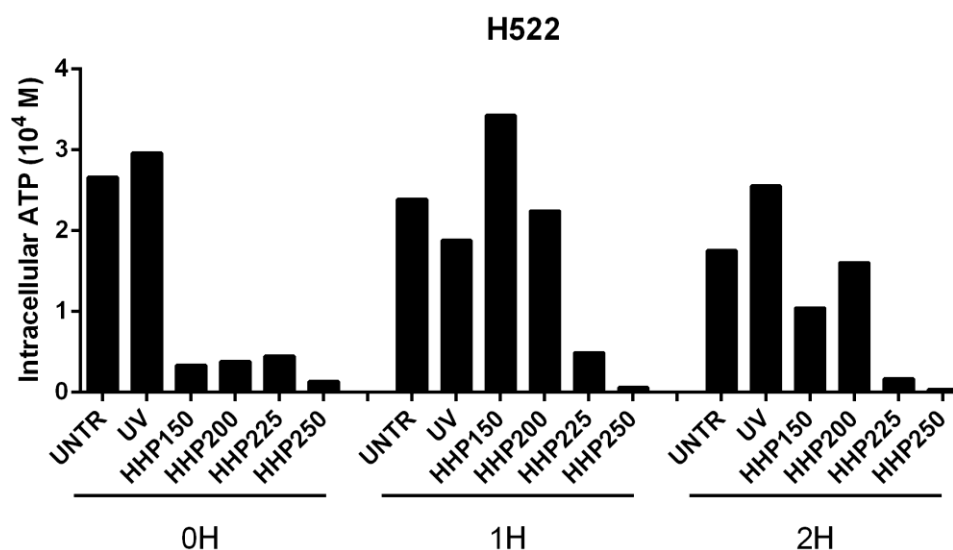
H520 a H522 ošetřené HHP o hodnotě 150, 200, 225 a 250 MPa v časech 0,5, 3 (4) a 24 H. Modrou barvou je značené jádro (DAPI), zelenou barvou jsou značeny imunogenní molekuly (CRT, HSP70 a HSP90) a červenou barvou v případě linie H522 je značena cytoplazmatická membrána (Cell Mask). Jako kontroly byly použity neošetřené buňky značené proti všem použitým imunogenním molekulám, neznačené buňky, buňky značené pouze sekundární protilátkou (IgG1 a IgG2a) a permeabilizované buňky značené proti všem použitým imunogenním molekulám. Měřítko 5  $\mu\text{m}$ .

### 5.3 HHP snižuje intracelulární a zvyšuje extracelulární koncentraci ATP

Extracelulární ATP je jednou z charakteristik ICD, proto jsme měřili jeho koncentraci po ošetření nádorových buněk linie H522 vysokým hydrostatickým tlakem v časech 0, 1 a 2 hodiny. Hladina extracelulárního ATP se po ošetření buněk HHP prudce zvýšila a to již v čase 0 H, v časech 1 a 2 H postupně koncentrace extracelulárního ATP klesá. Pokles extracelulárního ATP je dán tím, že se jeho poločas rozpadu v extracelulárním prostředí pohybuje v řádech sekund v souvislosti s přítomností různých enzymů s hydrolytickou aktivitou. Naopak intracelulární koncentrace ATP je po ošetření buněk HHP oproti neošetřeným a UVB ošetřeným buňkám velmi nízká. V čase 1 H se u buněk ošetřených HHP o hodnotě 150 a 200 MPa intracelulární koncentrace ATP opět zvýší, protože jsou nejspíše oproti buňkám ošetřeným HHP o hodnotě 225 a 250 MPa schopny ATP tvořit. V čase 2 H ale intracelulární koncentrace u všech buněk ošetřených HHP klesá, protože již pravděpodobně takto ošetřené buňky nejsou schopny vytvářet nové ATP (obr. 5.3).





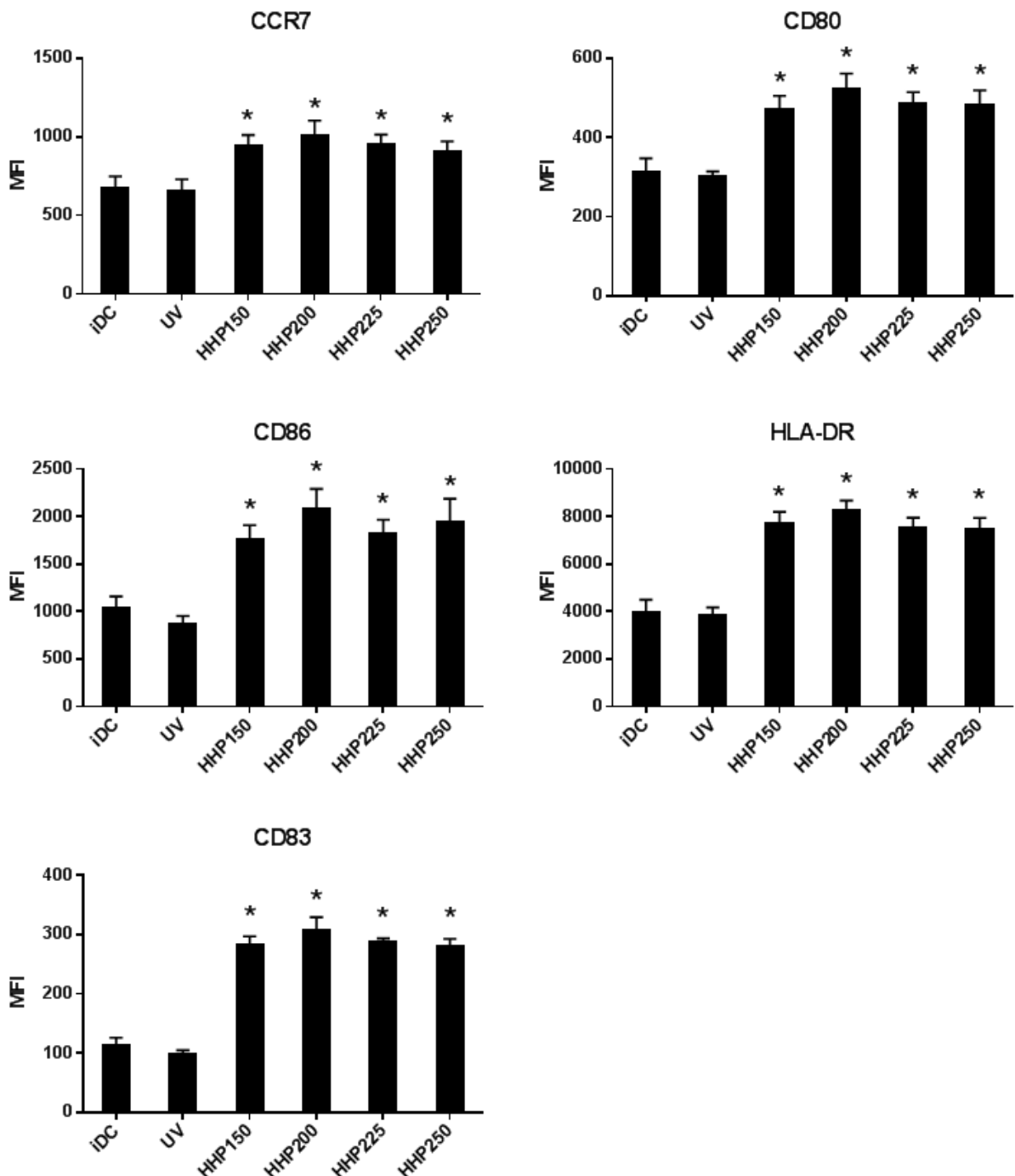


**Obr. 5.3** Koncentrace extracelulárního a intracelulárního ATP po ošetření nádorových buněk vysokým hydrostatickým tlakem, nebo UVB zářením. Buňky linie H522 ošetřené HHP o hodnotě 150, 200, 225 a 250 MPa v čase 0, 1 a 2 hodiny v porovnání s neošetřenými a UVB ošetřenými buňkami. Extracelulární koncentrace ATP je naměřena z S1 a intracelulární koncentrace z S2+L.

#### **5.4 Dendritické buňky pulzované nádorovými buňkami ošetřenými HHP vykazují zvýšenou expresi maturačních molekul**

Pro správnou aktivaci imunitního systému je třeba, aby byly DC maturované a vystavovaly na svém povrchu kostimulační molekuly, proto jsme pomocí průtokového cytometru analyzovaly fenotyp DC, které pohltily nádorové buňky ošetřené HHP a UVB zářením. Při tomto experimentu jsme použili směs linií H520 a H522 tak, jak se používá při postupu výroby protinádorové vakcíny. K nezralým DC jsme přidali nádorové buňky ošetřené HHP a UVB. Po 24 hodinách jsme měřili expresi chemokinového receptoru CCR7, kostimulačních molekul CD80, CD86, MHC molekuly II. třídy (HLA-DR) a maturační molekuly CD83. Dendritické buňky pulzované nádorovými buňkami usmrcenými HHP vykazovaly signifikantně zvýšenou expresi všech sledovaných molekul v porovnání s nematurovanými DC (iDC; immature DC) a DC pulzovanými nádorovými buňkami ošetřenými UVB (obr. 5.4). Nejvyšší expresi všech sledovaných molekul jsme zaznamenali u DC pulzovaných nádorovými buňkami ošetřenými HHP o hodnotě 200 MPa.

Při použití maturačního činidla poly I:C míra exprese pro všechny použité podmínky u jednotlivých sledovaných molekul vzrostla s přibližně stejným trendem jako bez poly I:C (výsledky nejsou zobrazeny).

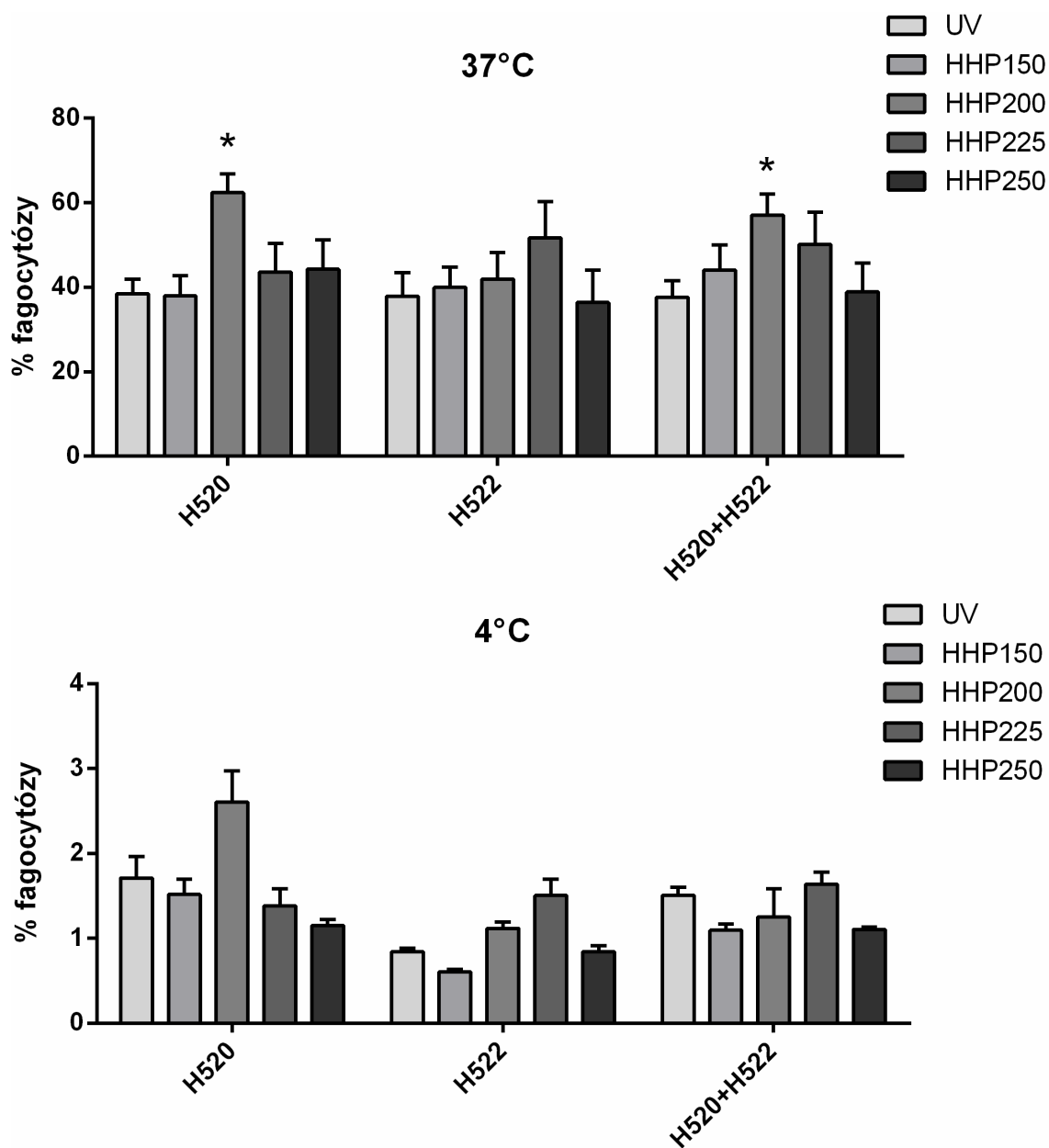


**Obr. 5.4** Expresa maturačních molekul DC měřená po 24 hodinách na průtokovém cytometru interpretovaná jako průměrná intenzita fluorescence (MFI). Stanovení exprese maturačních molekul CCR7, CD80, CD86, HLA-DR a CD83 na DC pulzovaných směsí linií H520 a H522 ošetřených HHP o hodnotě 150, 200, 225 a 250 MPa a UVB zářením proti nematurovaným DC (iDC). \* $p < 0.05$  v porovnání s iDC.

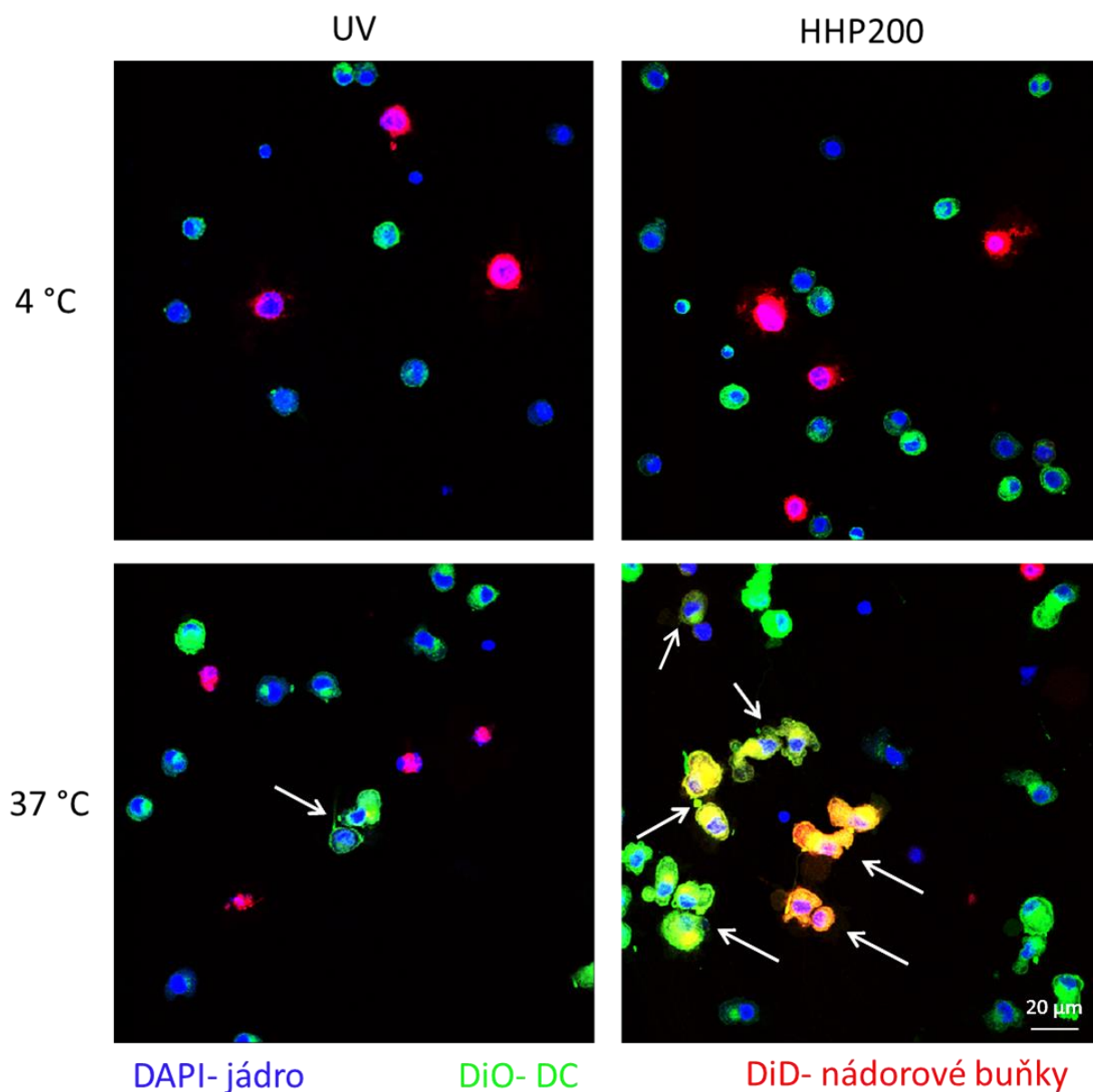
## **5.5 Nádorové buňky ošetřené HHP jsou více fagocytovány dendritickými buňkami**

Dendritické buňky musí pohltit nádorové buňky, aby mohly dále prezentovat jejich antigeny na svém povrchu a aktivovat tak naivní T lymfocyty v lymfatických uzlinách. Porovnávali jsme tedy fagocytózu nádorových buněk ošetřených HHP a UVB zářením po 24 hodinách od přidání k DC při 4 a 37 °C. Při 37 °C dochází k přibližně 20x vyšší fagocytóze než je tomu při 4°C. U linie H520 a směsi linií H520 a H522 je signifikantně zvýšená fagocytóza nádorových buněk ošetřených HHP o hodnotě 200 MPa oproti fagocytóze nádorových buněk ošetřených UVB zářením. U směsi linií H520 a H522 ošetřeném UVB zářením je fagocytóza přibližně 37 %, v porovnání se směsí buněk ošetřených HHP o hodnotě 200 MPa kde je fagocytóza přibližně 57 % (obr. 5.5.A). Výsledky ze směsi linií jsou pro nás důležitější, jelikož se má tato směs používat při výrobě protinádorové vakcíny. U kontrolních buněk při 4 °C dochází k fagocytóze nádorových buněk pouze v řádech několika procent.

Pro ověření jsme pozorovali fagocytózu pomocí konfokálního mikroskopu. Při 4 °C jsme pozorovali jen minimální fagocytózu nádorových buněk. Oproti tomu jsme při 37 °C pozorovali výraznou fagocytózu a výsledky byly podobné jako při stanovení na průtokovém cytometru. Nádorové buňky ošetřené HHP o hodnotě 200 MPa byly nejvíce fagocytovány dendritickými buňkami, kdežto buňky ošetřené UVB zářením byly fagocytované podstatně méně (obr. 5.5.B).



**Obr. 5.5.A Fagocytóza nádorových buněk ošetřených HHP a UVB zářením po 24 hodinách při 4 a 37 °C.** Stanovení fagocytární aktivity DC pulzovaných buňkami H520 a H522 a jejich směsí ošetřených HHP o hodnotě 150, 200, 225 a 250 MPa a UVB zářením. Interpretace % dvojitě pozitivních buněk (fagocytózy) při 4 a 37 °C. \* $p < 0.05$  v porovnání s buňkami ošetřenými UVB zářením.



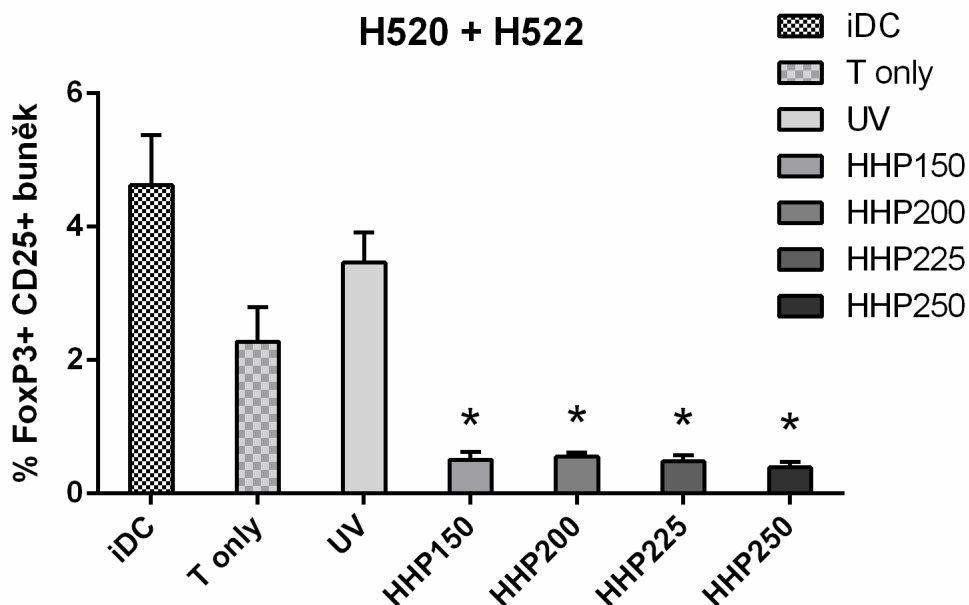
**Obr. 5.5.B Fagocytóza nádorových buněk ošetřených HHP a UVB zářením po 24 hodinách při 4 a 37 °C.** Fagocytóza nádorových buněk ošetřených UVB zářením a HHP o hodnotě 200 MPa. Modře značená jsou jádra (DAPI), zeleně značené jsou DC (DiO) a červeně značené jsou nádorové buňky (DiD). Šipky označují pohlcené nádorové buňky dendritickými buňkami. Měřítko 20 μm.

## 5.6 Dendritické buňky pulzované nádorovými buňkami usmrčenými HHP indukují méně regulačních T lymfocytů

Regulační T lymfocyty (Tregs) produkují tlumivé cytokiny IL-10 a TGF- $\beta$ , které potlačují aktivaci imunitní odpovědi. Proto nás zajímalo, zda DC pulzované nádorovými buňkami ošetřenými HHP nebudou indukovat vyšší procento těchto regulačních T lymfocytů. Pulzované DC jsme tedy 7 dní inkubovali s naivními T lymfocyty za přidání IL-2 a poté jsme pomocí průtokového cytometru stanovovali procento CD4+FoxP3+CD25+ buněk.

Nezralé DC (iDC) indukovali přibližně 4,6 % regulačních T lymfocytů. T lymfocyty inkubované bez stimulace dendritickými buňkami obsahovaly přibližně 2,2% populaci regulačních T lymfocytů. DC pulzované nádorovými buňkami ošetřenými UVB zářením indukovali téměř 3,5 % regulačních T lymfocytů, což je více než obsahovaly samotné T lymfocyty. DC pulzované nádorovými buňkami ošetřenými HHP indukovali signifikantně nižší procento regulačních T lymfocytů v porovnání s iDC a DC pulzovanými nádorovými buňkami ošetřenými UVB zářením (obr.5.6). Procento CD4+FoxP3+CD25+ buněk bylo při použití HHP o všech zkoumaných hodnotách přibližně 0,5 %.

Při použití DC se směsí buněk ošetřeným HHP, který byl zároveň stimulován maturačním činidlem poly I:C jsme pozorovali mírně zvýšené procento regulačních T lymfocytů (výsledky nejsou zobrazeny).



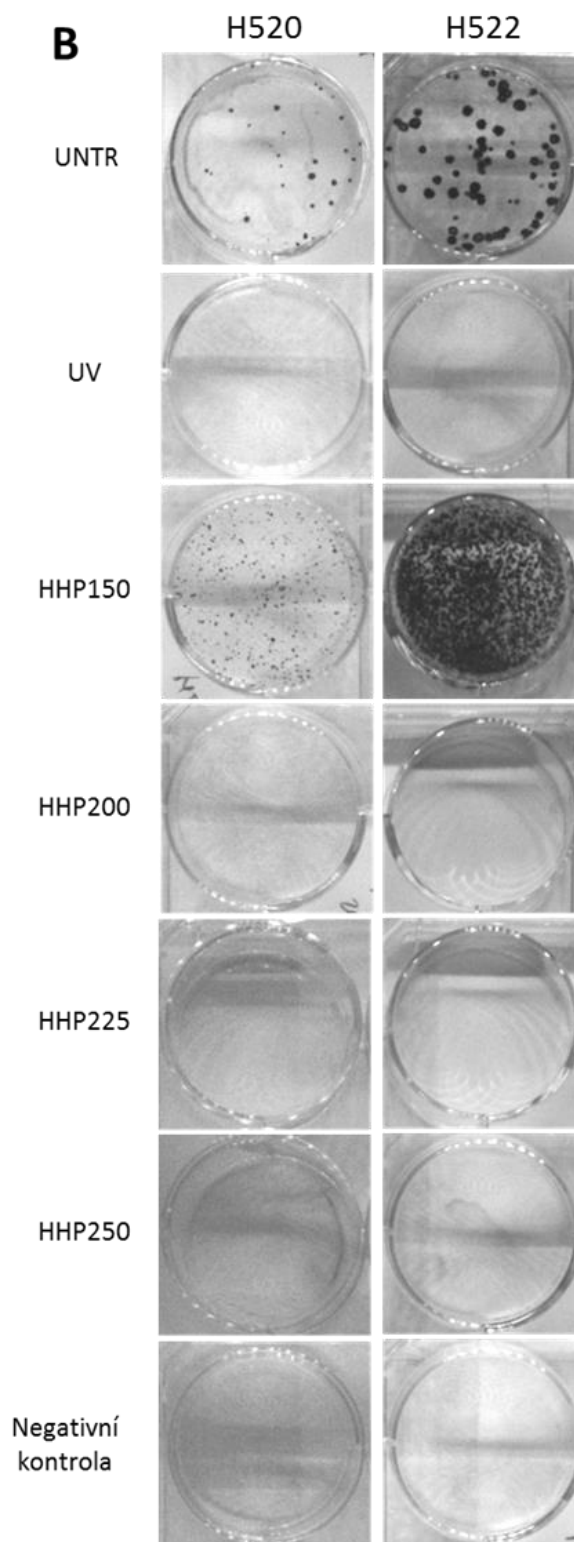
**Obr. Chyba! Nenalezen zdroj odkazů. Procento regulačních T lymfocytů (Tregs) s fenotypem CD4+FoxP3+CD25+.** Indukce regulačních T lymfocytů dendritickými buňkami pulzovanými směsí buněk H520 a H522 ošetřených HHP o hodnotě 150, 200, 225 a 250 MPa a UVB zářením v porovnání s iDC a samotnými T lymfocyty. \*p < 0.05 v porovnání s iDC.

## 5.7 Růst v klonogenních esejích

Pomocí klonogenních esejí se ověřuje schopnost přežití a tvorba kolonií u nádorových buněk ošetřených vysokým hydrostatickým tlakem z důvodu následného použití pro výrobu protinádorové vakcíny. Ověřovali jsme schopnost přežití a tvorby kolonií u nádorových buněk ošetřených HHP a UVB zářením. Jako pozitivní kontrolu jsme použili neošetřené buňky a jako negativní kontrolu směs kompletního a kondicionovaného média (1:1), ve kterém jsou buňky nasazovány. Pouze buňky ošetřené HHP o hodnotě 150 MPa obou sledovaných buněčných linií rostly v klonogenních esejích, tudíž ošetření nádorových buněk tlakem o hodnotě 150 MPa není přípustné pro výrobu protinádorové vakcíny. HHP o hodnotě 200 MPa a vyšší má za následek usmrcení nádorových buněk, kdy jsme po 14 dnech z nasazených 1 008 000 buněk nezaznamenali žádnou narostlou kolonii. Účinnost tvorby kolonií v pozitivní kontrole byla u linie H520 35 % a u linie H522 83 %.

### A

	H520	H522
150 MPa (počet narostlých kolonií)	> 1000	> 1000
200 MPa (počet narostlých kolonií)	0	0
225 MPa (počet narostlých kolonií)	0	0
250 MPa (počet narostlých kolonií)	0	0
UV (počet narostlých kolonií)	0	0
Negativní kontrola	0	0
Pozitivní kontrola	189	449
Pozitivní kontrola (účinnost tvorby kolonií)	35 %	83 %



**Obr. 5.7 Účinnost tvorby kolonií nádorových buněk.** Ošetřené buňky (HHP, UVB) byly nasazeny v celkovém počtu 1 008 000 buněk (168 000 buněk na jamku). Pozitivní kontrola – neošetřené (UNTR) buňky byly nasazeny v celkovém počtu 540 buněk (90 buněk na jamku) a negativní kontrola (směs kondiciovaného a kompletního média). **A)** Tabulka účinnosti tvorby kolonií neošetřených nádorových buněk a nádorových buněk po ošetření HHP o hodnotě 150, 200, 225 a 250 MPa a UVB zářením. **B)** Repräsentativní obrázek jamek s nasazenými nádorovými buňkami.



## 6 Diskuze

Pro léčbu nádorových onemocnění stále platí, že nejběžnějším postupem bývá operativní odstranění nádoru, chemoterapie a radioterapie či jejich kombinace. V posledních letech se ale k těmto postupům stále více zařazuje imunoterapie, ať už pasivní v podobě podávání monoklonálních protilátek, nebo aktivní za využití protinádorových vakcín. Právě aktivní imunoterapie má potenciál aktivovat imunitní systém pacienta a vypořádat se se zbytkovými nádorovými buňkami, které nemohou být při operaci odstraněny. Hlavním problémem imunoterapeutických vakcín je jejich imunogenicita. Většina dosavadních postupů se snažila přidávat do vakcín různá adjuvantia, která mají za úkol stimulovat imunitní systém a zajistit tak dlouhodobou odpověď. Jedním z případů protinádorových vakcín jsou celobuněčné vakcíny, které sestávají z autologních nebo allogenních inaktivovaných nádorových buněk vnesených do organismu určitým vektorem a které obsahují celé spektrum nádorových antigenů.

V naší laboratoři používáme jako vektor autologní dendritické buňky pulzované allogenními nádorovými buňkami inaktivovanými vysokým hydrostatickým tlakem (HHP). Výhodou tohoto postupu je, že není třeba použití žádných adjuvancií, jelikož jím jsou samotné nádorové buňky. Ošetření HHP totiž v buňkách vyvolává specifický typ buněčné smrti, tzv. imunogenní buněčnou smrt (ICD) (Casares et al., 2005). Do dnešního dne bylo popsáno několik modalit indukujících ICD, mezi které patří antracykliny (Casares et al., 2005; Fucikova et al., 2011; Obeid et al., 2007), oxaliplatin (Tesniere et al., 2010), bortezomib (Spisek et al., 2007), fotodynamická terapie založená na hypericinu (Garg et al., 2012b), nebo ionizující gamma záření (Weiss et al., 2012). ICD má znaky běžné tolerogenní apoptózy, jako externalizaci fosfatidylserinu, aktivaci kaspáz a depolarizaci mitochondrií (Krysko et al., 2012), ale na rozdíl od tolerogenní apoptózy vyvolává specifickou protinádorovou odpověď, k čemuž přispívají charakteristické molekuly zvané DAMPs (Tesniere et al., 2008). Mezi DAMPs, které určují imunogenicitu patří na povrchu exprimované molekuly CRT (Obeid et al., 2007), HSP70 a HSP90 (Udono and Srivastava, 1994) a sekretované molekuly ATP (Ghiringhelli et al., 2009) a HMGB1 (Yang et al., 2007).

Poprvé byl HHP v souvislosti s jeho inaktivační schopností použit v roce 1899 v souvislosti s eliminací bakterií v mléce (Hite, 1899) a také se tak dodnes používá. Jedná se ale o HHP o mnohem vyšší hodnotě, než jakou používáme při našem výzkumu. Poprvé

na jeho účinky v souvislosti s použitím pro protinádorové vakcíny upozornila německá výzkumná skupina pod vedením Benjamin Freye (Weiss et al., 2010b). Jejich publikace popisuje ošetření autologních nádorových buněk vysokým hydrostatickým tlakem a jejich inkubací s rekombinantním Annexinem A5, který zde funguje jako adjuvancium. Při tomto experimentu byl použit HHP o hodnotě vyšší než 200 MPa, který kompletně inaktivuje nádorové buňky a zamezí formování nových kolonií *in vivo* a *in vitro* (Weiss et al., 2010a).

Na základě výsledků německé skupiny, která se zmiňuje o imunogenicitě HHP při použití na myších nádorových buňkách, se naše laboratoř začala zajímat o využití HHP pro výrobu protinádorové vakcíny založené na DC. Námí nedávno publikovaná práce (Fucikova et al., 2014) poukazuje na schopnost HHP v rozmezí (150-250 MPa) indukovat v nádorových buňkách ICD. Tato studie probíhala na primárních nádorových buňkách a nádorových liniích karcinomu ovária OV-90, karcinomu prostaty LNCap a akutní lymfoblastické leukémie REH. Z výsledků této studie byl vybrán HHP o hodnotě 250 MPa pro práci s těmito liniemi a nyní se používá při dalších experimentech.

Pro mou práci byly k testování účinků HHP vybrány linie nemalobuněčného karcinomu plic H520 a H522. Podle předchozích výsledků se pro práci s těmito liniemi stanovil HHP o hodnotě 250 MPa. Jak se ale ukázalo, po ošetření buněk HHP o této hodnotě docházelo k velmi rychlé degradaci proteinů, což jsme pozorovali při imunodetekci buněčných lyzátů metodou western blot. Tento fakt zmínil již Frey, který uvádí, že HHP pozměňuje terciální a kvartérní strukturu proteinů a může vést k jejich denaturaci bez pozměnění primární struktury. Tato denaturace může mít za následek gelovitou strukturu buněk ošetřených HHP (Frey et al., 2008). Z tohoto důvodu jsme začali testovat další hodnoty HHP, které by mohly být vhodnější pro plicní nádorové linie. Nejdříve byl testován HHP o hodnotě 150 MPa. Při tomto tlaku, dochází ke štěpení kaspáz na aktivní podjednotky, takže lze předpokládat aktivaci apoptózy nezbytné pro ICD. Jako další jsme buňky ošetřili HHP o hodnotě 200 a 225 MPa. V obou případech opět docházelo k aktivaci všech sledovaných kaspáz a zachování proteinů, což bylo ověřeno na kontrolách nanášky GAPDH a aktinu.

Klíčovými hráči při translokaci nejdůležitější imunogenní molekuly kalretikulinu, jsou, v případě aktivace ICD antracykliny či oxaliplatinou, kaspáza-8 a fosforylace eIF2 $\alpha$  (Panaretakis et al., 2009). Při použití PDT k vyvolání ICD sice dochází k aktivaci kaspázy-8 a fosforylaci eIF2 $\alpha$ , ale v translokační dráze CRT nejsou tyto dva kroky klíčové a při jejich zablokování není translokace CRT ovlivněna (Garg et al., 2012b). Při použití HHP o

hodnotě 200 MPa dochází k rychlé aktivaci kaspázy-8 u obou sledovaných linií a u linie H522 také dochází k fosforylaci eIF2 $\alpha$ . U linie H520 jsme fosforylaci eIF2 $\alpha$  netestovali z důvodu nedostatečného množství buněk. Zda jsou tyto kroky nezbytné k translokaci CRT na povrch cytoplazmatické membrány, bude předmětem dalšího studia.

Z našich výsledků je dále patrná rychlá aktivace apoptózy, která koreluje s aktivací iniciačních kaspáz-8 a -9 a efektorové kaspázy-3 do 1 hodiny od ošetření buněk HHP. To podporují i výsledky z průtokového cytometru, kde již po 3 hodinách více než 50 % buněk ošetřených HHP o hodnotě 200 MPa a vyšší vykazuje známky apoptózy (AnnexinV+), která je klíčová pro koncept ICD. Zároveň v buňkách ošetřených HHP dochází k expresi imunogenních molekul CRT, HSP70 a HSP90. Kalretikulin, který slouží jako značka k pohlcení pro DC (Martins et al., 2010), je nejvíce exprimován u buněk ošetřených HHP o hodnotě 200 MPa v čase 24 H u obou sledovaných nádorových linií. Expozice CRT na povrch cytoplazmatické membrány v pozdějších časech se v našem případě liší od před-apoptotické expozice CRT při použití antracyklinů, nebo PDT (Garg et al., 2012b; Panaretakis et al., 2009). Expresie HSP70 stoupá s hodnotou použitého HHP a expresie HSP90 se v rámci jednotlivých linií liší. Povrchová expresie proteinů teplotního šoku je však mnohem méně prozkoumaná než expresie CRT nebo sekrece ATP. Všechny výše zmíněné imunogenní molekuly nebyly exprimovány u neošetřených buněk a buněk ošetřených neimunogenním UVB zářením. Dále jsme naměřili mnohonásobně zvýšenou koncentraci extracelulárního ATP u linie H522 ošetřené HHP a to již v čase 0H po ošetření. K vylití ATP tedy dochází okamžitě po vystavení buněk HHP, což slouží jako „find-me“ signál pro monocyty (Elliott et al., 2009). Časné vylití ATP do extracelulárního prostoru při ošetření buněk HHP je podobné před-apoptotické sekreci ATP v případě PDT (Garg et al., 2012b). Po 2 hodinách je ATP v buňkách ošetřených HHP již téměř nedetekovatelné, protože dochází k jeho rychlému rozpadu a nové ATP se již netvoří.

Pro použití vakcíny založené na DC je nutné, aby byly DC maturované a schopné v těle pacienta aktivovat naivní T lymfocyty. DC pulzované nádorovými buňkami ošetřenými HHP vykazovaly zvýšenou expresi chemokinového receptoru CCR7, který řídí migraci do lymfatických uzlin, maturačního markeru dendritických buněk CD83, kostimulačních molekul CD80 a CD86 důležitých ke správné prezentaci antigenu T buňkám a MHC molekuly II. třídy HLA-DR důležité k prezentaci exogenních peptidů. Expresie všech těchto molekul u DC pulzovaných nádorovými buňkami ošetřenými HHP byla signifikantně vyšší oproti nematurovaným DC (iDC) a DC pulzovanými nádorovými

buňkami ošetřenými neimunogenním UVB zářením. Zvýšení exprese maturačních molekul při použití HHP je opět podobná jako při použití antracyklinů a PDT. Oproti těmto studiím jsme ještě sledovali zvýšení exprese chemokinového receptoru CCR7 (Fucikova et al., 2011; Garg et al., 2012b). Takto pulzované DC mají v těle pacienta potenciál migrace do lymfatických uzlin, předložení antigenů naivním T lymfocytům a jejich následné aktivace a vytvoření nádorově specifických T lymfocytů, které následně migrují k nádorovým buňkám a specificky je ničí.

Směs nádorových linií H520 a H522 ošetřených HHP o hodnotě 200 MPa je signifikantně více fagocytována dendritickými buňkami oproti buňkám, které byly ošetřeny UVB zářením. Fagocytóza takto ošetřených nádorových buněk je nezbytná pro prezentaci nádorových antigenů na MHC gp. I. a II. třídy a jejich následné prezentaci CD4+ a CD8+ T lymfocytům, které poté zprostředkovávají imunitní odpověď proti nádorovým buňkám v těle pacienta.

Pro funkci protinádorových vakcín je důležité, aby v těle nedocházelo k indukci velkého množství regulačních T lymfocytů, které by tlumily imunitní odpověď proti nádorovým buňkám. Z našich výsledků je patrné, že DC pulzované nádorovými buňkami ošetřenými HHP indukují mnohem nižší procento regulačních T lymfocytů (přibližně 0,5 %) oproti iDC a DC pulzovaných nádorovými buňkami ošetřenými UVB zářením.

Na základě exprese imunogenních molekul (především CRT) a fagocytóze DC jsme pro plicní nádorové linie H520 a H522 vybrali HHP o hodnotě 200 MPa. Při použití HHP o hodnotě 150 MPa dochází k tvorbě kolonií v klonogenních esejích, což je nepřipustné pro výrobu celobuněčných vakcín. Vyšší hodnoty HHP mají za následek degradaci proteinů a v pozdějších časech dochází k vylití intracelulárního obsahu do extracelulárního prostředí. Zdá se, že buňky ošetřené HHP o hodnotě 200 MPa si zachovávají nejlepší schopnosti exprese imunogenních markerů a aktivace dendritických buněk. Předmětem dalšího studia by měla být detekce sekretovaného HMGB1, sekrece prozánětlivých cytokinů a detekce indukce nádorově specifických T lymfocytů produkujících IFN- $\gamma$ , jak je tomu ve studii publikované naší laboratoří zkoumající účinky HHP na jiné nádorové linie (Fucikova et al., 2014).

Tato práce tedy slouží jako základní výzkum pro budoucí klinické studie přípravku DCVAC pro léčbu karcinomu plic. Vzhledem k heterogenitě histologie karcinomu plic nejsou zcela přesně specifikovány nádorové antigeny. Z tohoto důvodu by bylo

pravděpodobně lepší používat k přípravě protinádorových vakcín autologní nádorové buňky, u kterých není nutné znát expresi nádorových antigenů, ale problém je, že jich nelze získat takové množství a některé typy nádorů nelze ani operovat. Proto pro výzkum protinádorové vakcíny používáme směs allogenních nádorových linií adenokarcinomu (linie H522) a skvamózního karcinomu (linie H520) plic k zajištění reaktivity proti širšímu spektru nádorových antigenů.

Mezi další celobuněčné vakcíny patří přípravek GVAX, který se skládá z autologních nádorových buněk inaktivovaných zářením a modifikovaných k sekreci GM-CSF. Prvotní studie GVAXu v souvislosti s NSCLC poukazovaly na příznivé účinky této vakcíny, ale pokročilejší studie se setkaly s neúspěchem a byly ukončeny podobně jako další studie pro léčbu jiných nádorových onemocnění (Kelly et al., 2010). Poněkud úspěšnějším je zatím Belagenpumatucel-L. Tento přípravek sestává ze 4 allogenních nádorových linií NSCLC, které jsou geneticky modifikované k sekreci antisense nukleotidu k TGF- $\beta$ 2 (Nemunaitis et al., 2009). Cílem této vakcíny je zajistit snížení exprese tohoto imunosupresivního cytokinu, který tlumí NK buňky, zabraňuje maturaci DC a směřuje naivní T lymfocyty ke vzniku regulačních T lymfocytů za indukce transkripčního faktoru FoxP3 (Chen and Wahl, 2003; Kong et al., 1999). Dosavadní výsledky studií této vakcíny jsou příznivé a v současné době probíhají klinické studie fáze III (NCT00676507), které již měly být hotové, ale výsledky nejsou stále známé.

V proteinových a peptidových vakcínách pro léčbu NSCLC zatím nejdále pokročily GSK1572932A a HILTONOL<sup>TM</sup>. První zmíněná vakcína cílí MAGE-A3 a klinické hodnocení III. fáze bylo zaměřeno na její použití jako adjuvantní terapie pro pacienty s operovatelným nemalobuněčným karcinomem plic s vysokou expresí MAGE-A3 antigenu (NCT00480025). V dubnu 2014 však společnost GlaxoSmithKline oznámila neúspěch, jelikož analýza prokázala, že není možné dosáhnout primárních cílů. HILTONOL<sup>TM</sup> je peptidová vakcína cílená proti MUC-1, u které právě probíhá I. a II. fáze klinických studií. U této vakcíny je zamýšlené použití opět jako adjuvantní terapie u pacientů s lokálním nemalobuněčným karcinomem plic (NCT01720836).

Velká pozornost se také upírá na inhibitory kontrolních bodů imunitní reakce (tzv. immune checkpoint inhibitors). Hlavními sledovanými body jsou CTLA-4 (cytotoxic T-Lymphocyte-associated antigen 4) a PD1 (programmed cell death protein 1). CTLA-4 funguje jako selektivní inhibitor T-lymfocytů, jelikož se váže na CD80/CD86 na APC s vyšší afinitou než CD28 a zabraňuje tak plné aktivaci T-lymfocytu (Walunas et al.,

1994). Mezi protilátky inhibující CTLA-4 patří Ipilimumab a Tremelimumab. Ipilimumab byl v roce 2011 schválen americkým úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA; Food and Drug Administration) pro léčbu melanomu a v současné době probíhají studie soustředící se na léčbu NSCLC (Lynch et al., 2012) a dalších typů nádorových onemocnění. Výsledky klinických studií Tremelimumabu zatím nejsou tak uspokojivé, jelikož v roce 2013 neúspěšně skončily klinické studie fáze III pro léčbu Tremelimumabem v porovnání s chemoterapií. Ve spojení s NSCLC ale začínají klinické studie I. a II. fáze, kde probíhá aktivní nábor pacientů. Druhým významným kontrolním bodem je PD-1, který je exprimovaný na T-lymfocytech a váže se na PD-L1 (PD-1ligand), který je mimo jiné exprimovaný na nádorových buňkách (u NSCLC je to přibližně u 50 %). Po vazbě PD-1 a PD-L1 dochází k deaktivaci T-lymfocytů, které dále nemohou ničit nádorové buňky (Mu et al., 2011). Asi největší nadějí v léčbě NSCLC inhibitory kontrolních bodů je Nivolumab. Tato protilátka blokuje PD-1, čímž může aktivovat T-buněčnou odpověď proti nádorovým buňkám. V současné době probíhá 6 klinických studií III. fáze, z čehož 2 se soustředí na léčbu NSCLC (Sznol and Chen, 2013). Dosavadní výsledky této protilátky jsou natolik optimistické, že se předpokládá, že by Nivolumab mohl být nejprodávanějším imunoterapeutickým lékem pro léčbu NSCLC v roce 2022.

Výhodou DCVACu oproti výše zmíněným vakcinačním strategiím je prezentace nádorových antigenů dendritickými buňkami. DC jakožto jediné APC jsou schopny aktivovat naivní T lymfocyty a vyvolat tak specifickou protinádorovou odpověď. Pokud tedy vpravíme pacientovi již maturované DC, mohou tyto DC migrovat do lymfatických uzlin a aktivovat naivní T lymfocyty, ze kterých vzniknou specifické CD4+ nebo CD8+ T buňky. Jelikož používáme autologní DC, odpadají problémy s HLA antigeny a vakcína je obecně velmi dobře snášena. Jediným požadavkem je, aby allogenní nádorové buňky byly zcela inaktivované a nemohly *in vivo* tvořit nové kolonie.

## 7 Souhrn

Cílem této práce bylo určit, zda vysoký hydrostatický tlak indukuje imunogenní buněčnou smrt u karcinomu plic a popsat charakteristiku antigen prezentujících buněk po inkubaci s buňkami karcinomu plic ošetřenými vysokým hydrostatickým tlakem.

Naše výsledky ukazují, že po ošetření plicních nádorových buněk linií H520 a H522 dochází k expresi markerů imunogenní buněčné smrti, především povrchových molekul CRT, HSP70 a HSP90 a sekreci extracelulárního ATP. Tyto molekuly byly charakterizovány jako molekuly určující imunogenicitu ICD. Zároveň dochází k aktivaci klíčových molekul kaspázy-8 a fosforylaci eIF2 $\alpha$  pro translokaci CRT na povrch cytoplazmatické membrány. Nutnost aktivace těchto molekul a příslušná signalizační dráha bude předmětem dalšího studia stejně jako detekce extracelulárního HMGB1.

Dále jsme určili fenotypovou a funkční charakteristiku pulzovaných DC. DC pulzované nádorovými buňkami ošetřenými HHP vykazovaly signifikantně vyšší expresi maturačních markerů CCR7, CD83, CD80, CD86 a HLA-DR. Současně jsme detekovali zvýšenou fagocytární aktivitu DC pulzovaných nádorovými buňkami ošetřenými HHP, především o HHP hodnotě 200 MPa. Navíc jsme zjistili, že DC pulzované nádorovými buňkami ošetřenými HHP indukují několikanásobně méně regulačních T lymfocytů v porovnání s iDC a DC pulzovanými nádorovými buňkami ošetřenými UVB zářením.

Na základě těchto výsledků byl nakonec vybrán HHP o hodnotě 200 MPa pro další práci s plicními nádorovými liniemi.

## 8 Seznam literatury

- Abulafi, A.M., and N.S. Williams. 1992. Photodynamic therapy for cancer. *BMJ* 304:589-590.
- Apetoh, L., F. Ghiringhelli, A. Tesniere, M. Obeid, C. Ortiz, A. Criollo, G. Mignot, M.C. Maiuri, E. Ullrich, P. Saulnier, H. Yang, S. Amigorena, B. Ryffel, F.J. Barrat, P. Saftig, F. Levi, R. Lidereau, C. Nogues, J.P. Mira, A. Chompret, V. Joulin, F. Clavel-Chapelon, J. Bourhis, F. Andre, S. Delaloge, T. Tursz, G. Kroemer, and L. Zitvogel. 2007. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* 13:1050-1059.
- Asea, A., M. Rehli, E. Kabingu, J.A. Boch, O. Bare, P.E. Auron, M.A. Stevenson, and S.K. Calderwood. 2002. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem* 277:15028-15034.
- Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y.J. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18:767-811.
- Brennan, M.A., and B.T. Cookson. 2000. Salmonella induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. *Mol Microbiol* 38:31-40.
- Brock, T. G. 2012. Inflammation in Cancer. *Cancer 2011*. Cayman chemical, article 2177
- Caballero, O.L., and Y.T. Chen. 2009. Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy. *Cancer Sci* 100:2014-2021.
- Calvino Fernandez, M., and T. Parra Cid. 2010. H. pylori and mitochondrial changes in epithelial cells. The role of oxidative stress. *Rev Esp Enferm Dig* 102:41-50.
- Casares, N., M.O. Pequignot, A. Tesniere, F. Ghiringhelli, S. Roux, N. Chaput, E. Schmitt, A. Hamai, S. Hervas-Stubbs, M. Obeid, F. Coutant, D. Metivier, E. Pichard, P. Aucouturier, G. Pierron, C. Garrido, L. Zitvogel, and G. Kroemer. 2005. Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *J Exp Med* 202:1691-1701.
- Degenhardt, K., R. Mathew, B. Beaudoin, K. Bray, D. Anderson, G. Chen, C. Mukherjee, Y. Shi, C. Gelinis, Y. Fan, D.A. Nelson, S. Jin, and E. White. 2006. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell* 10:51-64.
- Demaria, S., F.R. Santori, B. Ng, L. Liebes, S.C. Formenti, and S. Vukmanovic. 2005. Select forms of tumor cell apoptosis induce dendritic cell maturation. *J Leukoc Biol* 77:361-368
- Deveraux, Q.L., and J.C. Reed. 1999. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 13:239-252.
- Dhodapkar, M.V., K.M. Dhodapkar, and A.K. Palucka. 2008. Interactions of tumor cells with dendritic cells: balancing immunity and tolerance. *Cell Death Differ* 15:39-50.
- Dranoff, G. 2004. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 4:11-22.
- Dunn, G.P., A.T. Bruce, H. Ikeda, L.J. Old, and R.D. Schreiber. 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3:991-998.
- Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber. 2004. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 22:329-360.
- Elliott, M.R., F.B. Chekeni, P.C. Trampont, E.R. Lazarowski, A. Kadl, S.F. Walk, D. Park, R.I. Woodson, M. Ostankovich, P. Sharma, J.J. Lysiak, T.K. Harden, N. Leitinger, and K.S. Ravichandran. 2009. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* 461:282-286.
- Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4:330-336.



- Frey, B., C. Janko, N. Ebel, S. Meister, E. Schlucker, R. Meyer-Pittroff, R. Fietkau, M. Herrmann, and U.S. Gaipl. 2008. Cells under pressure - treatment of eukaryotic cells with high hydrostatic pressure, from physiologic aspects to pressure induced cell death. *Curr Med Chem* 15:2329-2336.
- Frey, B., Y. Rubner, L. Kulzer, N. Werthmoller, E.M. Weiss, R. Fietkau, and U.S. Gaipl. 2014. Antitumor immune responses induced by ionizing irradiation and further immune stimulation. *Cancer Immunol Immunother* 63:29-36.
- Fucikova, J., P. Kralikova, A. Fialova, T. Brtnicky, L. Rob, J. Bartunkova, and R. Spisek. 2011. Human tumor cells killed by anthracyclines induce a tumor-specific immune response. *Cancer Res* 71:4821-4833.
- Fucikova, J., I. Moserova, I. Truxova, I. Hermanova, I. Vancurova, S. Partlova, A. Fialova, L. Sojka, P.F. Cartron, M. Houska, L. Rob, J. Bartunkova, and R. Spisek. 2014. Article title: High hydrostatic pressure induces immunogenic cell death in human tumor cells. *Int J Cancer*
- Galluzzi, L., I. Vitale, J.M. Abrams, E.S. Alnemri, E.H. Baehrecke, M.V. Blagosklonny, T.M. Dawson, V.L. Dawson, W.S. El-Deiry, S. Fulda, E. Gottlieb, D.R. Green, M.O. Hengartner, O. Kepp, R.A. Knight, S. Kumar, S.A. Lipton, X. Lu, F. Madeo, W. Malorni, P. Mehlen, G. Nunez, M.E. Peter, M. Piacentini, D.C. Rubinsztein, Y. Shi, H.U. Simon, P. Vandenabeele, E. White, J. Yuan, B. Zhivotovsky, G. Melino, and G. Kroemer. 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* 19:107-120.
- Garg, A.D., D.V. Krysko, P. Vandenabeele, and P. Agostinis. 2012a. The emergence of plox-ER stress induced immunogenic apoptosis. *Oncimmunology* 1:786-788.
- Garg, A.D., D.V. Krysko, T. Verfaillie, A. Kaczmarek, G.B. Ferreira, T. Marysael, N. Rubio, M. Firczuk, C. Mathieu, A.J. Roebroek, W. Annaert, J. Golab, P. de Witte, P. Vandenabeele, and P. Agostinis. 2012b. A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death. *EMBO J* 31:1062-1079.
- Garg, A.D., D. Nowis, J. Golab, P. Vandenabeele, D.V. Krysko, and P. Agostinis. 2010. Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: an emerging amalgamation. *Biochim Biophys Acta* 1805:53-71.
- Ghiringhelli, F., L. Apetoh, A. Tesniere, L. Aymeric, Y. Ma, C. Ortiz, K. Vermaelen, T. Panaretakis, G. Mignot, E. Ullrich, J.L. Perfettini, F. Schlemmer, E. Tasdemir, M. Uhl, P. Genin, A. Civas, B. Ryffel, J. Kanellopoulos, J. Tschopp, F. Andre, R. Lidereau, N.M. McLaughlin, N.M. Haynes, M.J. Smyth, G. Kroemer, and L. Zitvogel. 2009. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med* 15:1170-1178.
- Gold, L.I., P. Eggleton, M.T. Sweetwyne, L.B. Van Duyn, M.R. Greives, S.M. Naylor, M. Michalak, and J.E. Murphy-Ullrich. 2010. Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease. *FASEB J* 24:665-683.
- Gure, A.O., R. Chua, B. Williamson, M. Gonen, C.A. Ferrera, S. Gnjatic, G. Ritter, A.J. Simpson, Y.T. Chen, L.J. Old, and N.K. Altorki. 2005. Cancer-testis genes are coordinately expressed and are markers of poor outcome in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 11:8055-8062.
- Hite, B. H., 1899. The effect of pressure in the preservation of milk. *Bulletin of the West Virginia University of Agriculture Experimental Station Morgantown*, 58.
- Ho, S.B., G.A. Niehans, C. Lyftogt, P.S. Yan, D.L. Cherwitz, E.T. Gum, R. Dahiya, and Y.S. Kim. 1993. Heterogeneity of mucin gene expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res* 53:641-651.

- Hodi, F.S., S.J. O'Day, D.F. McDermott, R.W. Weber, J.A. Sosman, J.B. Haanen, R. Gonzalez, C. Robert, D. Schadendorf, J.C. Hassel, W. Akerley, A.J. van den Eertwegh, J. Lutzky, P. Lorigan, J.M. Vaubel, G.P. Linette, D. Hogg, C.H. Ottensmeier, C. Lebbe, C. Peschel, I. QUILT, J.I. Clark, J.D. Wolchok, J.S. Weber, J. Tian, M.J. Yellin, G.M. Nichol, A. Hoos, and W.J. Urba. 2010. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 363:711-723.
- Hořejší, V., a J. Bartůňková. 2009. Základy imunologie, TRITON, Praha, 4. vydání.
- Hou, W., Q. Zhang, Z. Yan, R. Chen, H.J. Zeh Iii, R. Kang, M.T. Lotze, and D. Tang. 2013. Strange attractors: DAMPs and autophagy link tumor cell death and immunity. *Cell Death Dis* 4:e966.
- Hudis, C.A. 2007. Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med* 357:39-51.
- Cheever, M.A., and C.S. Higano. 2011. PROVENGE (Sipuleucel-T) in prostate cancer: the first FDA-approved therapeutic cancer vaccine. *Clin Cancer Res* 17:3520-3526.
- Chen, W., and S.M. Wahl. 2003. TGF-beta: the missing link in CD4+CD25+ regulatory T cell-mediated immunosuppression. *Cytokine Growth Factor Rev* 14:85-89.
- Chen, Y.T., M.J. Scanlan, U. Sahin, O. Tureci, A.O. Gure, S. Tsang, B. Williamson, E. Stockert, M. Pfreundschuh, and L.J. Old. 1997. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1914-1918.
- Jung, C.H., C.B. Jun, S.H. Ro, Y.M. Kim, N.M. Otto, J. Cao, M. Kundu, and D.H. Kim. 2009. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell* 20:1992-2003.
- Kaisho, T., and S. Akira. 2006. Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol* 117:979-987; quiz 988.
- Kakimi, K., J. Nakajima, and H. Wada. 2009. Active specific immunotherapy and cell-transfer therapy for the treatment of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 65:1-8.
- Kelly, R.J., J.L. Gulley, and G. Giaccone. 2010. Targeting the immune system in non-small-cell lung cancer: bridging the gap between promising concept and therapeutic reality. *Clin Lung Cancer* 11:228-237.
- Klebanoff, C.A., N. Acquavella, Z. Yu, and N.P. Restifo. 2011. Therapeutic cancer vaccines: are we there yet? *Immunol Rev* 239:27-44.
- Klionsky, D.J., and S.D. Emr. 2000. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290:1717-1721.
- Kong, F., R.L. Jirtle, D.H. Huang, R.W. Clough, and M.S. Anscher. 1999. Plasma transforming growth factor-beta1 level before radiotherapy correlates with long term outcome of patients with lung carcinoma. *Cancer* 86:1712-1719.
- Krysko, D.V., A.D. Garg, A. Kaczmarek, O. Krysko, P. Agostinis, and P. Vandenabeele. 2012. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 12:860-875.
- Lehner, T., Y. Wang, T. Whittall, E. McGowan, C.G. Kelly, and M. Singh. 2004. Functional domains of HSP70 stimulate generation of cytokines and chemokines, maturation of dendritic cells and adjuvanticity. *Biochem Soc Trans* 32:629-632.
- Lynch, T.J., I. Bondarenko, A. Luft, P. Serwatowski, F. Barlesi, R. Chacko, M. Sebastian, J. Neal, H. Lu, J.M. Cuillerot, and M. Reck. 2012. Ipilimumab in combination with paclitaxel and carboplatin as first-line treatment in stage IIIB/IV non-small-cell lung cancer: results from a randomized, double-blind, multicenter phase II study. *J Clin Oncol* 30:2046-2054.

- Madan, R.A., P.M. Arlen, M. Mohebtash, J.W. Hodge, and J.L. Gulley. 2009. Prostavac-VF: a vector-based vaccine targeting PSA in prostate cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 18:1001-1011.
- Martins, I., O. Kepp, L. Galluzzi, L. Senovilla, F. Schlemmer, S. Adjemian, L. Menger, M. Michaud, L. Zitvogel, and G. Kroemer. 2010. Surface-exposed calreticulin in the interaction between dying cells and phagocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1209:77-82.
- McKee, A.S., M.K. MacLeod, J.W. Kappler, and P. Marrack. 2010. Immune mechanisms of protection: can adjuvants rise to the challenge? *BMC Biol* 8:37.
- Mellman, I., G. Coukos, and G. Dranoff. 2011. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* 480:480-489.
- Mitsudomi, T., S.M. Steinberg, M.M. Nau, D. Carbone, D. D'Amico, S. Bodner, H.K. Oie, R.I. Linnoila, J.L. Mulshine, J.D. Minna, and et al. 1992. p53 gene mutations in non-small-cell lung cancer cell lines and their correlation with the presence of ras mutations and clinical features. *Oncogene* 7:171-180.
- Moserova, I., and J. Kralova. 2012. Role of ER stress response in photodynamic therapy: ROS generated in different subcellular compartments trigger diverse cell death pathways. *PLoS One* 7:e32972.
- Mu, C.Y., J.A. Huang, Y. Chen, C. Chen, and X.G. Zhang. 2011. High expression of PD-L1 in lung cancer may contribute to poor prognosis and tumor cells immune escape through suppressing tumor infiltrating dendritic cells maturation. *Med Oncol* 28:682-688.
- Nemunaitis, J., T. Jahan, H. Ross, D. Serman, D. Richards, B. Fox, D. Jablons, J. Aimi, A. Lin, and K. Hege. 2006. Phase 1/2 trial of autologous tumor mixed with an allogeneic GVAX vaccine in advanced-stage non-small-cell lung cancer. *Cancer Gene Ther* 13:555-562.
- Nemunaitis, J., M. Nemunaitis, N. Senzer, P. Snitz, C. Bedell, P. Kumar, B. Pappen, P.B. Maples, D. Shawler, and H. Fakhrai. 2009. Phase II trial of Belagenpumatucel-L, a TGF-beta2 antisense gene modified allogeneic tumor vaccine in advanced non small cell lung cancer (NSCLC) patients. *Cancer Gene Ther* 16:620-624.
- Nemunaitis, J., D. Serman, D. Jablons, J.W. Smith, 2nd, B. Fox, P. Maples, S. Hamilton, F. Borellini, A. Lin, S. Morali, and K. Hege. 2004. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene-modified autologous tumor vaccines in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 96:326-331.
- Obeid, M., A. Tesniere, F. Ghiringhelli, G.M. Fimia, L. Apetoh, J.L. Perfettini, M. Castedo, G. Mignot, T. Panaretakis, N. Casares, D. Metivier, N. Larochette, P. van Endert, F. Ciccocanti, M. Piacentini, L. Zitvogel, and G. Kroemer. 2007. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* 13:54-61.
- Palumbo, R., M. Sampaolesi, F. De Marchis, R. Tonlorenzi, S. Colombetti, A. Mondino, G. Cossu, and M.E. Bianchi. 2004. Extracellular HMGB1, a signal of tissue damage, induces mesoangioblast migration and proliferation. *J Cell Biol* 164:441-449.
- Panaretakis, T., O. Kepp, U. Brockmeier, A. Tesniere, A.C. Bjorklund, D.C. Chapman, M. Durchschlag, N. Joza, G. Pierron, P. van Endert, J. Yuan, L. Zitvogel, F. Madeo, D.B. Williams, and G. Kroemer. 2009. Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *EMBO J* 28:578-590.
- Pandey, P., A. Saleh, A. Nakazawa, S. Kumar, S.M. Srinivasula, V. Kumar, R. Weichselbaum, C. Nalin, E.S. Alnemri, D. Kufe, and S. Kharbanda. 2000. Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *EMBO J* 19:4310-4322.
- Pescovitz, M.D. 2006. Rituximab, an anti-cd20 monoclonal antibody: history and mechanism of action. *Am J Transplant* 6:859-866.

- Reginato, M.J., K.R. Mills, J.K. Paulus, D.K. Lynch, D.C. Sgroi, J. Debnath, S.K. Muthuswamy, and J.S. Brugge. 2003. Integrins and EGFR coordinately regulate the pro-apoptotic protein Bim to prevent anoikis. *Nat Cell Biol* 5:733-740.
- Renkvist, N., C. Castelli, P.F. Robbins, and G. Parmiani. 2001. A listing of human tumor antigens recognized by T cells. *Cancer Immunol Immunother* 50:3-15.
- Rock, K.L., and L. Shen. 2005. Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance. *Immunol Rev* 207:166-183.
- Rosenberg, S.A., J.C. Yang, and N.P. Restifo. 2004. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 10:909-915.
- Salgia, R., T. Lynch, A. Skarin, J. Lucca, C. Lynch, K. Jung, F.S. Hodi, M. Jaklitsch, S. Mentzer, S. Swanson, J. Lukanich, R. Bueno, J. Wain, D. Mathisen, C. Wright, P. Fidas, D. Donahue, S. Clift, S. Hardy, D. Neuberg, R. Mulligan, I. Webb, D. Sugarbaker, M. Mihm, and G. Dranoff. 2003. Vaccination with irradiated autologous tumor cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augments antitumor immunity in some patients with metastatic non-small-cell lung carcinoma. *J Clin Oncol* 21:624-630.
- Scott, A.M., J.D. Wolchok, and L.J. Old. 2012. Antibody therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 12:278-287.
- Seong, S.Y., and P. Matzinger. 2004. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat Rev Immunol* 4:469-478.
- Sharma, P., K. Wagner, J.D. Wolchok, and J.P. Allison. 2011. Novel cancer immunotherapy agents with survival benefit: recent successes and next steps. *Nat Rev Cancer* 11:805-812.
- Shortman, K., and Y.J. Liu. 2002. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2:151-161.
- Schweichel, J.U., and H.J. Merker. 1973. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 7:253-266.
- Singh-Jasuja, H., R.E. Toes, P. Spee, C. Munz, N. Hilf, S.P. Schoenberger, P. Ricciardi-Castagnoli, J. Neefjes, H.G. Rammensee, D. Arnold-Schild, and H. Schild. 2000. Cross-presentation of glycoprotein 96-associated antigens on major histocompatibility complex class I molecules requires receptor-mediated endocytosis. *J Exp Med* 191:1965-1974.
- Spisek, R., A. Charalambous, A. Mazumder, D.H. Vesole, S. Jagannath, and M.V. Dhodapkar. 2007. Bortezomib enhances dendritic cell (DC)-mediated induction of immunity to human myeloma via exposure of cell surface heat shock protein 90 on dying tumor cells: therapeutic implications. *Blood* 109:4839-4845.
- Špišek, R., P. Kocián, a D. Rožková 2009. Imunitní systém a kontrola nádorového bujení. Mechanizmy zahájení imunitní odpovědi a role imunitního systému v obraně proti nádorům. *Postgraduální medicína* 11, č. 2: 62-71
- Stankiewicz, A.R., G. Lachapelle, C.P. Foo, S.M. Radicioni, and D.D. Mosser. 2005. Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *J Biol Chem* 280:38729-38739.
- Steinman, R.M., and Z.A. Cohn. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137:1142-1162.
- Steinman, R.M., B. Gutchinov, M.D. Witmer, and M.C. Nussenzweig. 1983. Dendritic cells are the principal stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *J Exp Med* 157:613-627.
- Sugimura, H., F.C. Nichols, P. Yang, M.S. Allen, S.D. Cassivi, C. Deschamps, B.A. Williams, and P.C. Pairolero. 2007. Survival after recurrent nonsmall-cell lung cancer after complete pulmonary resection. *Ann Thorac Surg* 83:409-417; discussion 417-408.

- Sznol, M., and L. Chen. 2013. Antagonist antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the treatment of advanced human cancer. *Clin Cancer Res* 19:1021-1034.
- Tait, S.W., and D.R. Green. 2010. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:621-632.
- Tesniere, A., T. Panaretakis, O. Kepp, L. Apetoh, F. Ghiringhelli, L. Zitvogel, and G. Kroemer. 2008. Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death. *Cell Death Differ* 15:3-12.
- Tesniere, A., F. Schlemmer, V. Boige, O. Kepp, I. Martins, F. Ghiringhelli, L. Aymeric, M. Michaud, L. Apetoh, L. Barault, J. Mendiboure, J.P. Pignon, V. Jooste, P. van Endert, M. Ducreux, L. Zitvogel, F. Piard, and G. Kroemer. 2010. Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin. *Oncogene* 29:482-491.
- Thompson, J.A., F. Grunert, and W. Zimmermann. 1991. Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives. *J Clin Lab Anal* 5:344-366.
- Udono, H., and P.K. Srivastava. 1994. Comparison of tumor-specific immunogenicities of stress-induced proteins gp96, hsp90, and hsp70. *J Immunol* 152:5398-5403.
- Vandenabeele, P., L. Galluzzi, T. Vanden Berghe, and G. Kroemer. 2010. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:700-714.
- Venereau, E., M. Casalgrandi, M. Schiraldi, D.J. Antoine, A. Cattaneo, F. De Marchis, J. Liu, A. Antonelli, A. Preti, L. Raeli, S.S. Shams, H. Yang, L. Varani, U. Andersson, K.J. Tracey, A. Bachi, M. Ugucioni, and M.E. Bianchi. 2012. Mutually exclusive redox forms of HMGB1 promote cell recruitment or proinflammatory cytokine release. *J Exp Med* 209:1519-1528.
- Walunas, T.L., D.J. Lenschow, C.Y. Bakker, P.S. Linsley, G.J. Freeman, J.M. Green, C.B. Thompson, and J.A. Bluestone. 1994. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1:405-413.
- Weiss, E.M., B. Frey, F. Rodel, M. Herrmann, E. Schlucker, R.E. Voll, R. Fietkau, and U.S. Gaipl. 2010a. Ex vivo- and in vivo-induced dead tumor cells as modulators of antitumor responses. *Ann NY Acad Sci* 1209:109-117.
- Weiss, E.M., S. Meister, C. Janko, N. Ebel, E. Schlucker, R. Meyer-Pittroff, R. Fietkau, M. Herrmann, U.S. Gaipl, and B. Frey. 2010b. High hydrostatic pressure treatment generates inactivated mammalian tumor cells with immunogenic features. *J Immunotoxicol* 7:194-204.
- Weiss, E.M., R. Wunderlich, N. Ebel, Y. Rubner, E. Schlucker, R. Meyer-Pittroff, O.J. Ott, R. Fietkau, U.S. Gaipl, and B. Frey. 2012. Selected anti-tumor vaccines merit a place in multimodal tumor therapies. *Front Oncol* 2:132.
- Winter, H., N.K. van den Engel, M. Rusan, N. Schupp, C.H. Poehlein, H.M. Hu, R.A. Hatz, W.J. Urba, K.W. Jauch, B.A. Fox, and D. Ruttinger. 2011. Active-specific immunotherapy for non-small cell lung cancer. *J Thorac Dis* 3:105-114.
- Yang, D., Q. Chen, H. Yang, K.J. Tracey, M. Bustin, and J.J. Oppenheim. 2007. High mobility group box-1 protein induces the migration and activation of human dendritic cells and acts as an alarmin. *J Leukoc Biol* 81:59-66.
- Yue, Z., S. Jin, C. Yang, A.J. Levine, and N. Heintz. 2003. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15077-15082.
- Zitvogel, L., A. Tesniere, and G. Kroemer. 2006. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* 6:715-727.