

**Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie (B1501)



**Kateřina Kubeřov**

## **Význam imunogenní bunenn smrti pro moderní imunoterapii nádoru**

The importance of immunogenic cell death for modern tumor immunotherapy

Bakalrřk práce

řkolitel: RNDr. Milada řirov, Ph.D.

Praha, 2022

*Poděkování:*

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Miladě Šírové, Ph.D. za věnovaný čas a cenné rady při psaní této bakalářské práce.

*Prohlášení:*

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

V Praze, dne 5. 5. 2022

Kateřina Kubešová

## **ABSTRAKT**

Imunogenní buněčná smrt se vyznačuje uvolněním molekul značících nebezpečí, které následně mohou aktivovat imunitní systém. Pouze určité typy buněčné smrti jsou schopny vyvolat uvolnění těchto molekul z buněk. Charakterizace typů imunogenních buněčných smrtí a pochopení jejich navození může být využito k indukci imunitního systému proti nádorovým buňkám. Zároveň je třeba porozumět různým mechanismům fungování molekul značících nebezpečí. Molekuly značící nebezpečí, které jsou nejaktivněji studovány nejen pro využití v protinádorové terapii, jsou interferony typu I, kalretikulin, high mobility group box 1 protein, ATP a heat shock proteiny 70 a 90.

**Klíčová slova:** imunogenní buněčná smrt, signální molekuly značící nebezpečí (DAMPs), nádorová onemocnění, imunoterapie, interferony typu I, kalretikulin, high mobility group box 1 proteiny, ATP, heat shock protein 70, heat shock protein 90

## **ABSTRACT**

Immunogenic cell death is characterized by the release of molecules with damage-associated molecular patterns which can subsequently activate immune system. Only specific types of cell death can release these molecules. Classification of immunogenic cell death types and understanding of their initiation can be used for activation of the immune system against cancer cells. Simultaneously, it is necessary to understand different mechanisms, how the molecules with damage-associated molecular patterns work. Molecules with damage-associated molecular patterns which are studied the most, not only for their use in anticancer therapy, are type I interferons, calreticulin, high mobility group box 1 protein and heat shock proteins 70 and 90.

**Key words:** immunogenic cell death, molecules with damage-associated molecular patterns, cancer, immunotherapy, type I interferons, calreticulin, high mobility group box 1 protein, ATP, heat shock protein 70, heat shock protein 90

## Obsah:

1	Úvod.....	1
2	Buněčná smrt .....	3
2.1	Nepředvídatelná a regulovaná buněčná smrt .....	3
2.2	Typy buněčné smrti .....	3
2.2.1	Vnější a vnitřní dráha aktivace apoptózy .....	4
2.2.2	Nekróptóza .....	6
2.2.3	Pyroptóza .....	7
2.2.4	Autofágie.....	8
3	Imunogenní buněčná smrt.....	8
4	Damage associated molecular patterns .....	9
4.1	Interferony typu I .....	9
4.1.1	Ovlivnění aktivity IFN I při léčbě nádorů.....	10
4.2	Kalretikulin (CALR) .....	11
4.2.1	CALR v protinádorové terapii .....	13
4.3	High-mobility group box 1 (HMGB1).....	14
4.3.1	Využití HMGB1 v protinádorové terapii.....	16
4.4	ATP .....	16
4.4.1	Využití ATP v protinádorové terapii .....	18
4.5	Heat-shock proteiny .....	19
4.5.1	Heat shock protein 90 .....	19
4.5.2	Heat shock protein 70 .....	20
5	Možnosti ovlivnění imunogenní buněčné smrti v léčbě nádorů .....	21
5.1	Belantamab mafodotin (GSK2857916).....	21
5.2	Lurbinectedin .....	22
6	Závěr .....	22
7	Literatura.....	24

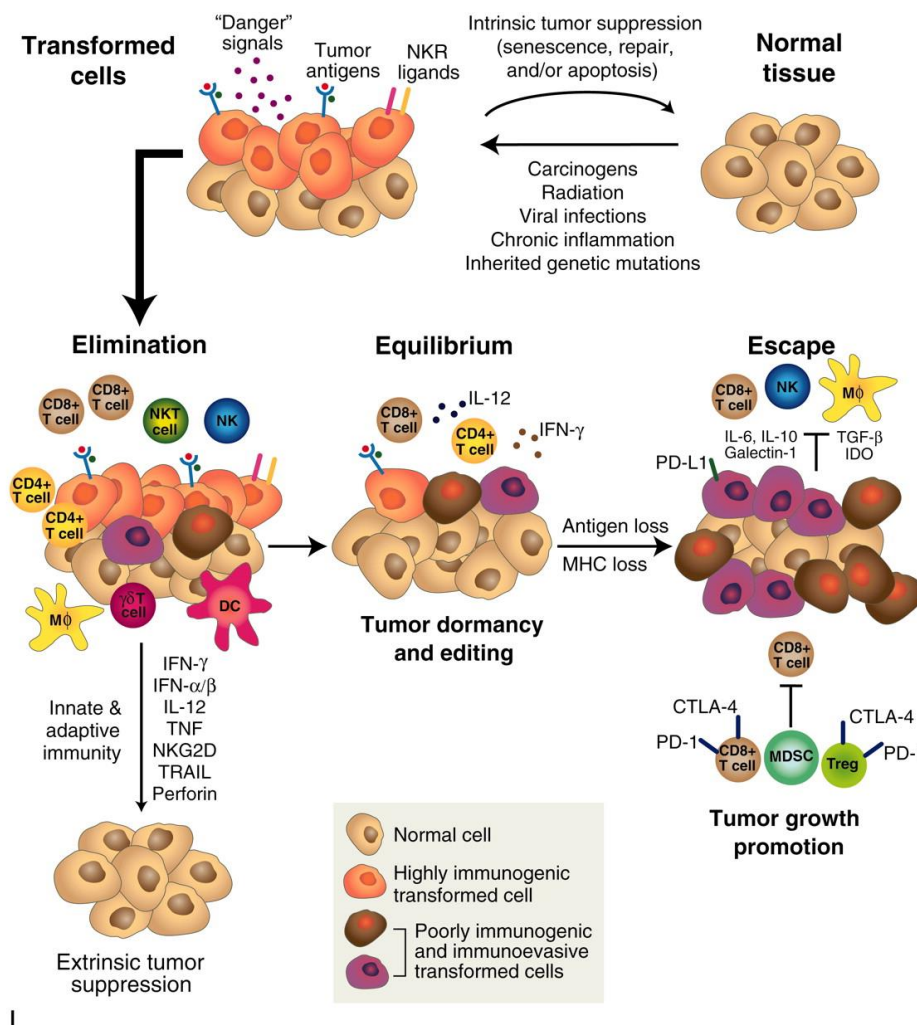
## 1 Úvod

Nádorová onemocnění jsou jedním z nejzávažnějších zdravotních problémů moderní společnosti. Univerzální léčebná metoda dosud nebyla a pravděpodobně ani nebude objevena, ale pokrok v posledních desetiletích je značný a povzbudivý. V počátcích léčby nádorových onemocnění byla pozornost zaměřena především na vlastnosti nádorů plynoucí z mutací vzniklých v buňce, které vedou k nekontrolovanému dělení a agresivnímu růstu. Tento přístup vedl k terapii nádorů podobné terapii infekčních onemocnění – s cílem zlikvidovat veškeré patogenní buňky a nezničit buňky zdravé. Na počátku se tedy vyvinuly tři léčebné metody, jejichž hlavní funkcí byla destrukce buněk: chirurgické odstranění nádoru, chemoterapie a radioterapie. Studium nádorových buněk a jejich smrti probíhalo často v imunodeficientních myších, což se z dnešního pohledu jeví jako nedostačující přístup. Vznik a vývoj nádorů totiž bezprostředně souvisí s imunitním systémem a správná podpora imunitního systému může být klíčem pro úspěšnou protinádorovou terapii.

Ačkoli imunoterapie se zařadila do spektra protinádorové léčby až na počátku 90. let 20. století například schválením využití interleukinu 2 při léčbě metastazujícího karcinomu ledvin pro první klinické studie v roce 1984 nebo schválením první monoklonální protilátky proti molekule CD20 na B-lymfocytech v roce 1997, první imunoterapeutické pokusy publikoval americký chirurg William Coley již o sto let dříve, v roce 1891. William Coley vyzoroval pozitivní efekt při léčbě neoperovatelných sarkomů po injekci toxinů ze zabitých bakterií *Streptococcus pyogenes* a *Serratia marcescens*. Tímto způsobem léčil většinou pacienty se sarkomy kostí a měkkých tkání. Použití tzv. Coleyho toxinů však nebylo schváleno úřadem pro kontrolu potravin a léčiv a tato terapie se stala v roce 1962 nepovolenou. Nyní již víme, že tento přístup měl pozitivní výsledky díky aktivaci imunitního systému, tak aby mohl spustit protinádorovou odpověď.

Hlubší poznání a výzkum imunitního systému v souvislosti s nádory vedly k formulaci hypotézy o imunitní editaci nádorů („three Es of cancer immunoediting“, 3E).<sup>1</sup> Vztah nádoru a imunitního systému sestává ze tří fází: eliminace (elimination), rovnováhy (equilibrium) a úniku (escape) (obr. 1). Hypotéza 3E předpokládá, že buňky velmi často ztrácejí kontrolu nad svým dělením a stávají se nádorovými buňkami, ale imunitní systém je většinou schopen je rozpoznat a zlikvidovat. První fáze, eliminační, je charakterizována aktivací imunitního systému a jeho protinádorové odpovědi. Rozpoznání nádorových

buněk imunitním systém většinou vede k produkci interferonu  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), který posléze indukuje lokální produkci chemokinů a mobilizaci buněk vrozené buněčné imunity. Nádorové buňky však mohou hromadit mutace a měnit své vlastnosti tak, aby unikly imunitnímu systému; takové buňky pak vstupují do fáze rovnováhy (equilibrium), ve které imunitní systém nedokáže dostatečně rychle a účinně ničit nádorové buňky, ale ještě stále má pod kontrolou celkový růst nádoru. V této fázi není nádor pro svého hostitele nebezpečným a může být imunitním systémem udržován dlouhodobě. Nebezpečným se nádor stává v poslední fázi imunitní editace, ve fázi úniku (escape), kdy uniká imunitnímu systému a jeho buňky se začínají nekontrolovaně množit. To může být zapříčiněno také produkcí imunosupresivních cytokinů nádorovými buňkami nebo aktivitou regulačních T lymfocytů (Treg).<sup>1</sup>



Obr. 1: Imunitní editace nádorů (obrázek převzat z <sup>2</sup>).

Jednou z cest, jak zlepšit léčbu nádorů, je indukce imunogenní smrti, která aktivuje imunitní systém k boji proti nádorovým buňkám. Pokud buňky umírají imunogenní

buněčnou smrtí, exprimují signály nebezpečí (damage associated molecular patterns, DAMPs), na které reagují buňky imunitního systému, především buňky dendritické. Tato práce se zabývá typy buněčných smrtí se zřetelem k imunogennímu charakteru a následně uvolněnými DAMPs a jejich mechanismy účinku.

## **2 Buněčná smrt**

### **2.1 Nepředvídatelná a regulovaná buněčná smrt**

Buněčná smrt může být rozdělena na smrt nepředvídatelnou (accidental cell death; ACD) a smrt regulovanou (regulated cell death; RCD). ACD bývá vyvolána externími faktory – fyzikálními (např. vysokými teplotami, vysokým či osmotickým tlakem), chemickými (extrémní pH) nebo mechanickými. ACD je okamžitá a nekontrolovatelná forma buněčné smrti, která je spojena s porušením strukturní integrity buňky. RCD souvisí s fyziologickým a genetickým nastavením buňky. Forma RCD vyvolaná genetickým nastavením buňky se označuje jako programovaná buněčná smrt a přispívá k embryonálnímu a postembryonálnímu vývoji i obnově dospělých tkání.<sup>2</sup> RCD byla dlouhodobě považována za imunitně tichou, právě kvůli silně tolerogenní povaze programované buněčné smrti, může však být vyvolána i intracelulárním či extracelulárním stresem, který nebyl odstraněn adaptivními mechanismy, které působí proti stresu a v tom případě může být imunogenní.

### **2.2 Typy buněčné smrti**

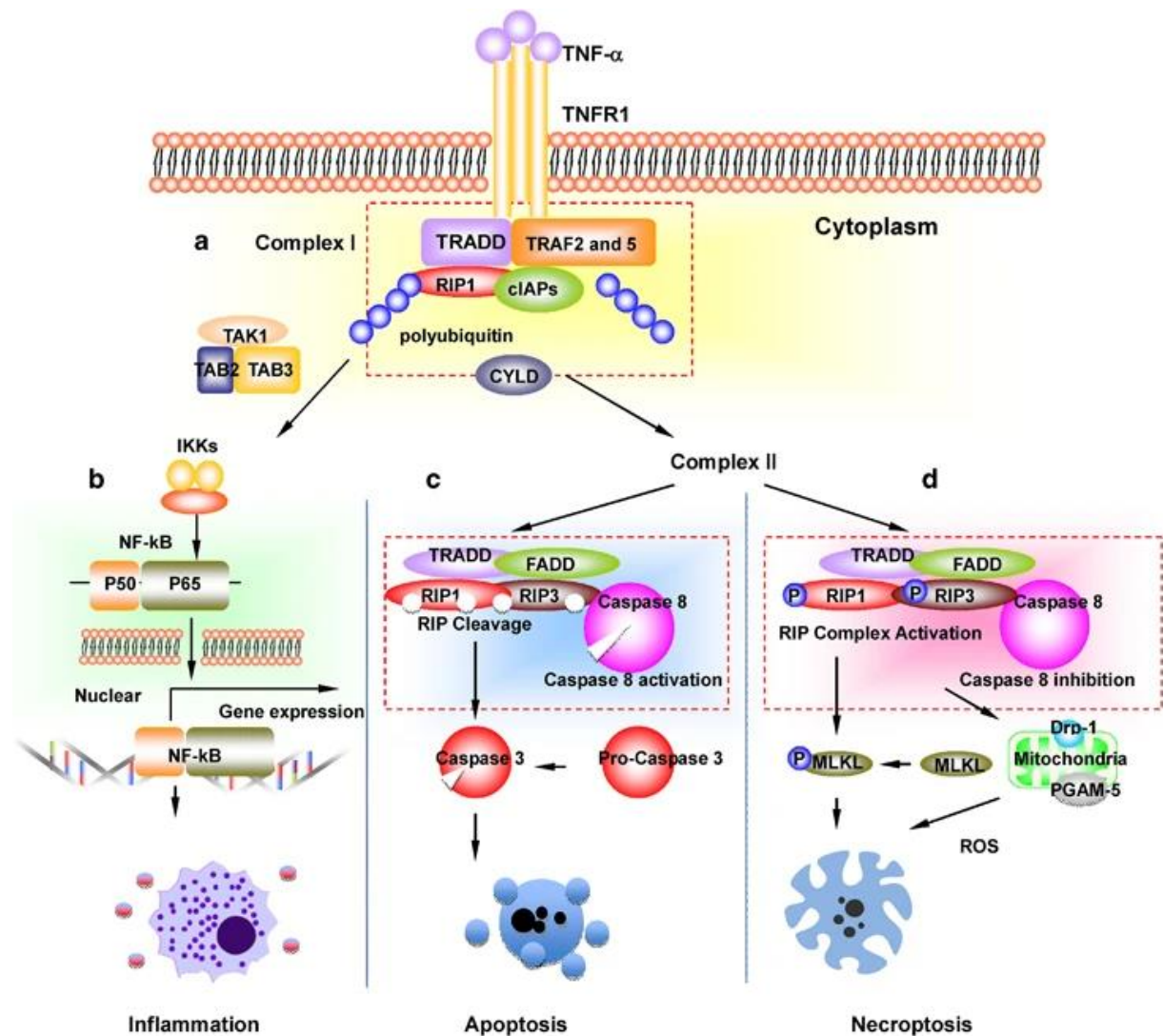
První formální rozdělení typů buněčné smrti bylo vytvořeno podle morfologických vlastností mrtvých buněk. Prvním typem buněčné smrti je apoptóza, která je charakterizována zakulacením buněk, kondenzací chromatinu a fragmentací jádra.<sup>3</sup> Apoptické buňky nakonec tvoří apoptická tělíška, která jsou pohlcována fagocytujícími buňkami. Druhým typem je autofágie, buněčná smrt, která je charakterizována oddělením části cytoplasmy a její degradací lysozomálními hydrolázami.<sup>4</sup> Třetím typem je nekróza, která nevykazuje známky prvního ani druhého typu buněčné smrti a vyznačuje se zvětšením objemu buňky (onkózou) a ztrátou buněčné integrity. Toto rozdělení nezohledňuje molekulární aspekty různých typů buněčné smrti, především signální dráhy iniciace a samotného uskutečnění buněčné smrti, a je proto nyní považováno za zastaralé.<sup>5</sup> Podle nového rozdělení, bylo charakterizováno mnohem více typů RCD, přičemž každý typ může vykazovat široké spektrum morfologických vlastností od

nekrotických po plně apoptické a od protizánětlivých a tolerogenních po prozánětlivé a imunogenní.<sup>5</sup> Typy buněčné smrti, které jsou obecně známé pro svůj imunogenní charakter jsou nekroptóza a pyroptóza, v některých případech apoptóza a autofágie.

### 2.2.1 Vnější a vnitřní dráha aktivace apoptózy

Apoptóza je buněčná smrt zprostředkovaná aktivitou kaspázových proteáz 3 a 7.<sup>6</sup> Apoptóza aktivovaná vnějšími příčinami („extrinsic apoptosis“), je iniciována příslušnými ligandy tzv. „death receptorů“ na plazmatické membráně, které patří do superrodiny receptorů TNFR (tumor necrosis factor receptor) s extracelulární doménou bohatou na cystein a homologní intracelulární doménou zvanou „death domain“. Mezi takové receptory patří Fas receptor (CD95), TNF receptor 1 (TNFR1) nebo TRAIL-R1/R2 (TNF-related apoptosis-inducing ligand-receptor).<sup>7</sup> Ligace receptorů typu Fas či TRAIL-R1/R2 vede k mobilizaci adaptorových molekul typu Fas-associated death domain (FADD), které jsou schopny aktivovat kaspázu 8, případně kaspázu 10. Tyto kaspázy jsou součástí tzv. DISC („death-inducing signalling komplexu“).<sup>8</sup> Formace DISC přímo aktivuje efektorové kaspázy 3, 6 a 7 spouštějící apoptózu.<sup>9</sup> Ligace TNFR1 indukuje tvorbu komplexů I a případně II, které regulují aktivaci kaspázy 8 (obr. 2).<sup>5</sup> Komplex I je vytvořen po navázání TNF (tumor necrosis factor) na TNFR1. Po jeho sestavení může dojít k tvorbě komplexu II, který vede k buněčné smrti, ale může také dojít k indukci aktivace nukleárního faktoru  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) a mitogen-activated protein kinázy (MAPK), což vede k produkci prozánětlivých cytokinů a proteinů podporujících přežití buňky, jako např. c-FLIP<sub>L</sub>. Protein c-FLIP se vyskytuje ve dvou formách, proapoptické dlouhé formě c-FLIP<sub>L</sub> a protiapoptické krátké formě c-FLIP<sub>S</sub>. Tyto dvě formy se váží na prokaspázu 8 a následně jejich poměr rozhoduje o tom, zda se zformuje kaspáza 8 nebo zda bude její formace zablokována.<sup>10</sup> Klíčovou roli v signalizaci přes TNF má kináza RIPK1, její modifikace rozhodují o tom, zda buňka přežije či zda podlehne buněčné smrti – buď ve formě apoptózy nebo ve formě nekroptózy (tedy kaspázově nezávislé formě buněčné smrti).<sup>11</sup> RIPK1 totiž může disociovat z komplexu I a vytvořit komplex II, sestaven z RIPK1, FADD, kaspázy 8 a cFLIP proteinů, který iniciuje buněčnou smrt přes kaspázu 8. Buněčná smrt indukovaná TNF je regulována několika kontrolními body (checkpoints).<sup>11</sup> Polyubiquitinovaná RIPK1 vede k přežití a proliferaci buněk, zablokování ubiquitinace odstraněním E3 ligáz vede k formaci komplexu II.<sup>11,12</sup>





Obr. 2: signální dráha indukovaná TNF- $\alpha$  – po navázání na TNFR1 je zformován komplex I. Polyubiquitínovaná RIPK1 vede k aktivaci NF- $\kappa$ B a přežití buňky, deubiquitínovaná RIPK1 vede k formaci komplexu II. Poté záleží na aktivaci kaspázy 8, zda dojde k apoptóze nebo k nekroptóze. Obrázek převzat z <sup>13</sup>.

Druhá možnost aktivace apoptózy vnějšími příčinami je prostřednictvím receptorů na plazmatické membráně, které jsou závislé na množství ligandů – těchto receptorů je známo přibližně 20 druhů. Pokud dostupnost příslušného ligandu těchto receptorů klesne pod prahovou úroveň, aktivuje se signalizační dráha přes kaspázu 9 aktivující efektorové kaspázy 3, 6 a 7.<sup>14</sup>

Aktivace apoptózy vnitřními příčinami („intrinsic apoptosis“) je vyvolávána poškozením DNA, stresem endoplazmatického retikula, nadměrnou tvorbou reaktivních forem kyslíku (reactive oxygen species, ROS; např. superoxid nebo hydroxylový radikál) či replikačním stresem.<sup>15</sup> Dochází k permeabilizaci vnější mitochondriální membrány (MOMP) a tedy k uvolnění proteinů, které se normálně nachází mezi vnější a vnitřní mitochondriální

membránou. Mezi ně patří i cytochrom C, který slouží jako kofaktor pro apoptotic protease-activating factor-1 (APAF-1) a společně s ním vede k aktivaci iniciační kaspázy 9.<sup>16</sup> Tento proces je regulován proteiny rodiny Bcl-2, proapoptickými proteiny BAX, BAK a BOK a proteiny ze stejné rodiny podporujícími přežití buňky, např. Bcl-XL. Protein BAK je navázán na vnější mitochondriální membránu a v nepřítomnosti Bcl-2 proteinů podporující přežití buňky je na membránu navázán i protein BAX. Komplex BAX/BAK dále oligomerizuje a vede k permeabilizaci vnější mitochondriální membrány.<sup>17</sup>

Aktivace kaspáz však není pro apoptózu nezbytně nutná a buněčnou smrt hlavně urychluje. MOMP je pro buňku smrtelná i bez přítomnosti kaspáz, takový proces se označuje jako kaspázově nezávislá buněčná smrt (caspase-independent cell death, CICD). MOMP je pro buňku tzv. „point-of-no-return“ a předurčuje buňku automaticky k zániku.<sup>18</sup> Vypadá to, že apoptóza závislá na kaspázách je imunitně tichá, jelikož kaspázy potlačují tvorbu interferonů typu I (IFN I).<sup>19,20</sup> Kaspázy zároveň vedou k produkci ROS, které oxidují potenciální DAMPs typu HMGB1 (high-mobility group box-1 proteins).<sup>21</sup> Inhibice kaspáz tedy může vést k protinádorové odpovědi a regresi nádoru. Při pozorování kaspázově závislé a nezávislé apoptózy u BALB/c myši, které měly injikované nádorové buňky CT26, byla zjištěna u buněk podstupujících CICD zvýšená infiltrace nádoru T lymfocyty a makrofágy v nádoru vykazovaly zvýšenou expresi hlavního histokompatibilního komplexu II (MHC-II).<sup>22</sup>

### **2.2.2 Nekroptóza**

Nekroptóza je typem regulované buněčné smrti, který má společné znaky jak s apoptózou, tak i s nekrózou. Aktivace nekroptózy je zprostředkována několika různými receptory včetně FAS, TNFR1, a PRRs (pathogen recognition receptors), mezi které patří toll-like receptory 3 a 4 (TLR3, TLR4) a Z-DNA binding protein I (ZBP1).<sup>5</sup> Pro nekroptózu je zásadní aktivace RIPK3 (receptor-interacting protein kinase 3), ke které může dojít různými způsoby. Jedním z nich je aktivace přes již výše zmíněný TNFR1, který vede k sestavení komplexu I z RIPK1 a dále může vést k sestavení komplexu II. K tomu, aby došlo k nekroptóze místo apoptózy je nutná inhibice kaspázy 8 přes efektorové proteiny, farmakologické inhibitory či ztráta kaspázy 8.<sup>23,24</sup> RIPK1 pak může aktivovat kinázu RIPK3. RIPK3 může být také aktivována dsRNA navázanou na TLR3, LPS (lipopolysacharidem) navázaným na TLR4, různými DAMPs na plazmatické membráně či endogenní nebo virovou DNA navázanou na ZBP1.<sup>25,26</sup> Aktivovaná RIPK3

pak může fosforylovat mixed-lineage kinase domain (MLKL), díky čemuž se zformují MLKL oligomery, které jsou translokovány na plazmatickou membránu, kde vedou k její permeabilizaci.<sup>27</sup> Následuje uvolnění DAMPs, které aktivují vrozené i adaptivní složky imunitního systému.<sup>15</sup>

### 2.2.3 Pyroptóza

Dalším typem RCD, který je většinou vyvolán mikrobiální infekcí a je znám pro svoji imunogenicitu je pyroptóza. Typicky se pyroptóza objevuje u makrofágů (ale dochází k ní i u buněk epiteliálních) po infekci patogenem a vyznačuje se zvětšením objemu buňky, které nakonec vede k permeabilizaci membrány a zvláštní kondenzací chromatinu, odlišné od kondenzace chromatinu u apoptózy.<sup>28,29</sup>

Jednou možností, jak buňky podléhají pyroptóze je klasická dráha závislá na vytvoření inflamazomu. Pro tento účel slouží receptory rodiny NLR (NBF leucine-rich repeat-containing receptor), například receptor NLRP3 nebo receptor AIM2 z proteinové rodiny PYHIN.<sup>30</sup> Inflamazom obsahuje kaspázu 1, která štěpí prekursorů prozánětlivých cytokinů interleukinu 1 $\beta$  a interleukinu 18 a indukuje pyroptózu tím, že štěpí protein gasdermin D. N-doména gasderminu D následně vytvoří pór v plazmatické membráně, což je spojeno s uvolněním DAMPs.<sup>28,31</sup> Neklasická inflamazomová cesta indukce apoptózy je započata navázáním lipopolysacharidu přímo na prokaspázy 4/5, čímž je indukovaná kaspázová aktivita a následně je štěpen gasdermin D.<sup>32</sup> K pyroptóze může dojít i bez sestavení inflamazomu aktivací kaspázy 3; ta štěpí další typ gasderminu, gasdermin E, jehož N doména také tvoří póry v plazmatické membráně a je aktivována po stimulaci TNF- $\alpha$  nebo po stimulaci některými chemoterapeutiky. Na myších s lidskými nádorovými buňkami, které exprimují gasdermin E, toto bylo potvrzeno po léčbě doxorubicinem, mitoxantronem a aktinomycinem-D.<sup>33</sup> Exprese gasderminu E vede ke zvýšené fagocytóze nádorových buněk makrofágy a zvýšení počtu natural-killer buněk a CD8<sup>+</sup> T lymfocytů, má tak poměrně významnou úlohu při aktivaci protinádorové aktivity. V mnoha nádorech je exprese gasderminu E potlačena metylací jeho mRNA.<sup>34</sup>

Další cesta aktivace pyroptózy je zprostředkovaná granzymovými proteázami, které jsou součástí zabíječských mechanismů NK (natural killer) buněk a cytotoxických T lymfocytů (CD8<sup>+</sup>). Proteáza granzym A je schopna štěpit gasdermin B, což vede k tvorbě pórů v plazmatické membráně a pyroptóze. Exprese gasderminu B je zvyšována produkcí

interferonu  $\gamma$  aktivovanými cytotoxickými lymfocyty. Zvýšená exprese gasderminu B byla pozorována u kolorektálního karcinomu nebo u karcinomu pankreatu.<sup>35</sup>

#### 2.2.4 Autofágie

Především homeostatickou funkci má programovaná buněčná smrt autofágie vyskytující se téměř u všech eukaryotických buněk. Tato forma buněčné smrti zajišťuje odstranění poškozených proteinů a poničených organel a její role je především cytoprotektivní. Příkladá se jí význam v udržování mládí.<sup>36</sup> Je indukovaná jak extracelulárním, tak intracelulárním stresem a zároveň je i součástí mnoha fyziologických procesů, jako například v rámci odpovědi buněk na nedostatek živin nebo energie a kontroly buněčného růstu.<sup>36</sup> Při autofágii je z membrány (původem z plazmatické membrány, endoplazmatického retikula nebo Golgiho aparátu) zformován tzv. fagofor, který obklopí proteiny nebo organely určené k degradaci, poté se uzavře, čímž vznikne autofagozóm, a ten nakonec splyne s lysozómem, který enzymaticky degraduje obsah autofagozómu. Proces autofágie je spojen s uvolněním ATP do extracelulárního prostředí.<sup>37</sup>

### 3 Imunogenní buněčná smrt

Imunogenní buněčná smrt (ICD) je indukována organelovým či buněčným stresem a vrcholí buněčnou smrtí doprovázenou expresí, aktivní sekrecí nebo pasivním uvolněním molekul značících nebezpečí, DAMPs.<sup>38</sup> To jsou molekuly významné pro mobilizaci antigen prezentujících buněk, jejich maturaci a následně pak i aktivaci vrozených i adaptivních mechanismů imunitního systému.<sup>39</sup> DAMPs by dále mohly být rozděleny na cDAMPs, konstitutivní, základní signály, které jsou uvolněny z buňky ještě před samotnou iniciací buněčné smrti a iDAMPs, indukovatelné signály, které jsou generovány *de novo* jako následek buněčné smrti či jsou aktivně generovány již v jejím průběhu, odráží se na nich tedy průběh buněčné smrti.<sup>40</sup> DAMPs jsou po uvolnění z buněk rozeznány PRRs na leukocytech a následně mohou aktivovat mechanismy vrozené i adaptivní imunitní odpovědi. Mezi hlavní rodiny PRRs patří toll-like receptory, NOD-like receptory (nucleotide oligomerization domain-like receptory; NLRs), RIG-like receptory (retinoic acid-inducible gene 1 receptory) a lektinové receptory typu C (CLR).

## 4 Damage associated molecular patterns

### 4.1 Interferony typu I

Interferony typu I (IFN I) jsou především známé tím, že jsou produkovány všemi buňkami napadenými virem (IFN- $\beta$ ) a zejména plazmacytoidními dendritickými buňkami (IFN- $\alpha$ ).<sup>41</sup> Masivní produkce IFN I však může být vyvolána i po chemoterapii založené na antracyklinech (např. doxorubicin).<sup>42</sup> Nádorové buňky u kterých je vyvolána imunogenní buněčná smrt, produkují IFN I po stimulaci TLR3, pravděpodobně vlastní RNA uvolněnou ze stresovaných a umírajících buněk.<sup>42</sup> Jinou možností produkce IFN I nádorovými buňkami, je stimulace přes cytosolickou cyklickou GMP-AMP syntázu (cGAS).<sup>43</sup> cGAS podléhá konformační změně po navázání mitochondriální DNA a následně produkuje cyclic GMP-AMP (cGAMP) z ATP a GTP. cGAMP funguje jako tzv. druhý posel, který je detekován cyclic-dinucleotide senzorem STING (stimulator of interferon response cGAMP interactor 1), což je transmembránový protein na endoplazmatickém retikulu. Ve finále je fosforylován transkripční faktor pro produkci IFN I.<sup>44</sup>

Uvolněné IFN- $\alpha$  a IFN- $\beta$  se váží k heterodimerickému transmembránovému receptoru IFNAR (IFN $\alpha$  receptor) na nádorových buňkách, který je složen z podjednotek IFNAR1 a IFNAR2.<sup>45</sup> IFNAR dále aktivuje proteintyrosinkinázu JAK1 (Janus kinase 1) a tyrosinkinázu TYK2, které fosforylují cytoplazmatické proteiny STAT1 a STAT2.<sup>45</sup> Tyto proteiny následně dimerizují a jsou translokovány do jádra, kde působí jako transkripční faktory. Jejich komplex s ISGF3 (IFN-stimulated gene factor 3) se váže na DNA, kde aktivuje transkripci ISGs (IFN-stimulated genes). Proteiny kódované ISGs navozují antivirový stav buněk, který spočívá v inhibici virové transkripce, translace a replikace a degradace virové nukleové kyseliny.<sup>46,47</sup>

Imunostimulačních efektů IFN I je několik, jedním z nich je posílení cytotoxických funkcí CD8<sup>+</sup> T buněk a NK buněk. Byl pozorován vliv IFN I na protinádorovou odpověď NK buněk – myši byly infikovány lymfocytární meningitidou, čímž se zesílila aktivace NK buněk, a dále byly injikovány nádorovou linií TC-1 a zároveň jim byly podány protilátky proti receptoru pro IFN I, proti membránovému glykoproteinu NK1.1, který má důležitou roli při aktivaci NK buněk, nebo byla použita kombinace obou blokačních protilátek. Blokace receptoru pro IFN I vedla k 20% zvýšení nádorových metastáz, což značí významnou roli IFN I při protinádorové odpovědi. Zvýšení tvorby metastáz však

nebylo pozorováno při použití samotné protilátky proti NK1.1 ani při kombinaci této protilátky s protilátkami proti receptoru pro IFN I. NK buňky tedy pro svou protinádorovou aktivitu nezbytně potřebují IFN I.<sup>48</sup>

Dalším imunostimulačním efektem IFN I je vliv na tzv. zkříženou prezentaci. Apoptóza zprostředkovaná přes navázání *in vitro* připravené specifické RNA na receptor RIG-I (retinoic acid-inducible gene I) na melanomových buňkách je spojena s uvolněním IFN I. To bylo potvrzeno *in vivo* při použití melanomové linie, která byla deficientní pro transkripční faktory pro RIG-I a wild-type linie s funkčním RIG-I. Takto umírající buňky byly kultivovány s dendritickými buňkami *in vitro*. Uvolněný IFN I stimuloval maturaci dendritických buněk a vedl k expanzi a aktivaci tumor-antigen specifických cytotoxických T lymfocytů.<sup>49</sup>

#### **4.1.1 Ovlivnění aktivity IFN I při léčbě nádorů**

##### **4.1.1.1 STING agonista**

Jednou možností, jak využít IFN I v nádorové terapii, je použití agonisty transmembránového proteinu STING na endoplazmatickém retikulu, jehož aktivace vede k produkci IFN I. První molekulou, která byla použita jako agonista STING, byla kyselina flavonová (flavone acetic acid; FAA). Výsledky použití FAA na myších modelech a ve fázi I klinického testování však nevykazovaly výraznou protinádorovou odpověď.<sup>50</sup> Následně byl vyvinut derivát FAA, DMXAA (5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid). DMXAA měl velmi příznivé výsledky u několika myších modelů různých karcinomů a ukázal se být efektivní i při kombinaci s různými typy nádorových terapií. Nejprve byl v I. fázi klinického testování použit samotný DMXAA při léčbě solidních nádorů – ukázalo se ale, že porušuje funkci oční retiny inhibicí fosfodiesteráz a vykazuje některé benefity při léčbě nádorů až při použití neobvykle vysoké dávky.<sup>51</sup> Další testy pak byly prováděny s použitím kombinace DMXAA s cytostatikem (docetaxelem) a tato kombinace se dostala až do III. fáze klinického testování pro léčbu velkobuněčného karcinomu plic, ale studie však byla předčasně ukončena pro svou neúčinnost.<sup>52</sup> Podobně dopadly i další testy prováděné na jiných karcinomech.<sup>53</sup> Neúčinnost DMXAA v klinickém testování byla vysvětlena v roce 2013 – DMXAA se váže specificky na myší STING, ale ne na lidský STING.<sup>54</sup>

Ve II. fázi klinického testování se nyní nachází dva agonisté STING. Jedním z nich je cyklický dinukleotid MK-1454, který je testován v kombinaci s anti-PD1 terapií u

pacientů se skvamózním karcinomem hlavy a krku.<sup>55</sup> Dalším testovaným agonistou STING je cyklický dinukleotid ADU-S100.<sup>53</sup>

#### 4.1.1.2 Pegylované interferony

Navazání polyetylen glykolu (PEG; „pegylace“) zvyšuje obecně stabilitu proteinů, a u různých cytokinů včetně interferonů také redukuje jejich toxicitu. Jako adjuvantní léčivo byl pro pacienty s melanomy ve fázi II a III schválen pegylovaný IFN- $\alpha$ 2b. Léčba vedla ke zlepšení RFS (relapse-free survival); tedy prodloužení doby od konce primární léčby do vzniku nových symptomů nádoru, avšak nedošlo ke změně délky doby přežití pacientů od diagnózy.<sup>56</sup>

Pegylovaný IFN- $\alpha$  použitý u pacientů s melanomem může vést k účinnější odpovědi na blokaci PD1 receptoru na T lymfocytech. 25 pacientů s melanomem ve III/IV fázi bylo pozorováno po léčbě pegylovanými IFN- $\alpha$  a následně monoklonálními anti-PD-1 protilátkami (pembrolizumab). Recidiva melanomu se nevyskytla u žádného pacienta v prvních 2 měsících a pouze u 4 pacientů se vyskytla v prvních 4 měsících po léčbě. V kontrolní skupině pacientů, kterým nebyly podány pegylované IFN- $\alpha$ , se recidiva objevila u 2 z 31 pacientů v prvních 2 měsících a u 13 pacientů v prvních 4 měsících po léčbě protilátkami pembrolizumab. Během 6-8 měsíců po léčbě byla recidiva nádoru u pacientů s podanými pegylovanými IFN- $\alpha$  výrazně nižší než u skupiny, které IFN podány nebyly. Tato kombinace terapie pro pacienty s melanomy se tedy jeví do budoucna poměrně nadějně a zaslouží si další pozorování.<sup>57</sup>

## 4.2 Kalretikulin (CALR)

Kalretikulin je protein, který se normálně vyskytuje v endoplazmatickém retikulu všech buněk, kde má několik funkcí. Je důležitým  $\text{Ca}^{2+}$  vazebným proteinem, který reguluje vápníkovou homeostázu a je důležitým chaperonovým proteinem.<sup>58</sup> Společně s kalnexinem napomáhá skládání glykoproteinů procházejících přes ER, včetně MHC I glykoproteinů.<sup>59</sup> Je složen ze tří domén, N-terminální globulární domény, která zajišťuje správné skládání proteinů, prolin-bohaté domény vysoce afinitní k  $\text{Ca}^{2+}$  a C-domény, která rovněž, avšak s nižší afinitou váže  $\text{Ca}^{2+}$ .<sup>60</sup>

Buněčná smrt navozená cytostatikem odvozeným od antrachinonu mitoxantronem (MTX), oxaliplatinou (OXP), některými dalšími cytostatiky či ultrafialovým-C zářením (UVC) vede k translokaci CALR na povrch plazmatického retikula již po několika hodinách po podání látky.<sup>61</sup> MTX, OXP či UVC záření způsobují rychlou fosforylaci

eIF2 $\alpha$  (eukaryotic Initiation Factor 2) serin/threoninovou kinázou PERK.<sup>62</sup> Hyperfosforylace eIF2 $\alpha$  je typická během stresu ER.<sup>61,63</sup> Translokace CALR probíhá exocytózou zprostředkovanou SNARE proteiny.<sup>62</sup> Buňky s CALR na povrchu jsou fagocytovány ještě před samotným započítím apoptózy, to znamená kondenzací chromatinu či ztrátou mitochondriálního transmembránového potenciálu.<sup>61</sup> CALR posléze interaguje s molekulou ERp57 a vytváří CRT/ERp57 komplex, který funguje jako tzv. „eat me“ signál pro fagocytující buňky, včetně dendritických buněk. ERp57 je multifunkční protein, který se nachází v několika buněčných lokacích a má několik různých funkcí, například napomáhání CALR a kalnexinu při skládání proteinů v ER.<sup>62,64</sup> CALR exprimovaný na plazmatické membráně není induktorem imunitní odpovědi, pokud jeho translokace není důsledkem buněčné smrti navozené cytostatiky či UVC. Takový CALR funguje jako „eat me“ signál pro makrofágy, ale ne pro dendritické buňky. Makrofágy mají receptor CD91 (také známý jako low-density lipoprotein-related receptor protein 1, LRP1), který se naváže na CALR a tím dojde k makropinocytóze.<sup>65</sup>

Po několika hodinách podání MTX/OXP/ozáření UVC dochází v buňkách i k aktivaci kaspázy 8 a následně konformační změně Bcl2-associated X proteinu (BAX) and Bcl2-antagonist/killer 1 proteinu (BAK). To jsou proapoptické proteiny rodiny Bcl-2, které způsobují permeabilizaci vnější mitochondriální membrány.<sup>62,66</sup> Proto, aby byl CALR na povrch translokován jsou nutné oba kroky – jak aktivace PERK a fosforylace eIF2 $\alpha$ , tak aktivace kaspázy-8, Bax a Bak.<sup>62</sup> Na povrchu se CALR může svou C-doménou vázat na molekuly fosfatidylserinu (PS), který se v živé buňce nachází na vnitřní straně plazmatické membrány a po indukci apoptózy je translokován na stranu vnější, kde funguje jako „eat me“ signál pro fagocyty. CALR však může být translokován na vnější stranu membrány ještě ve velmi raných fázích apoptózy a vyskytnout se na membráně dříve než PS.<sup>67,68</sup>

K rozpoznání apoptických buněk a vyvolání imunogenní odpovědi slouží i molekula C1q, která je součástí komplementového systému.<sup>69</sup> Tato molekula funguje jako opsonin, označuje buňky určené k pohlcení fagocyty.<sup>70</sup> Ukázalo se, že C1q spolupracuje s CALR a PS - C-terminální globulární doména CALR se váže na C1q molekulu v přítomnosti Ca<sup>2+</sup> a ta je dále propojena s globulární doménou PS.<sup>71,72</sup> V případě deficiencie CALR může C1q částečně jeho roli kompenzovat zvýšením produkce interleukinu 6 (IL-6), což je prozánětlivý cytokin s četnými funkcemi při regulaci imunitní odpovědi.<sup>73</sup> CALR může také snížit produkci interleukinu 8, který může nádoru napomáhat svou schopností



podporovat angiogenezi.<sup>72,74</sup> Nadměrná produkce interleukinu 8 nádorovými buňkami vede také k chemotaktické migraci leukocytů, důsledkem čehož je zvýšeno množství pronádorových růstových faktorů.<sup>75</sup>

TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) se běžně nachází na NK buňkách, T buňkách a NKT buňkách a po navázání na TRAIL receptor vede k sestavení DISC a následně k apoptóze aktivované vnější dráhou. Tento ligand je rovněž schopen interagovat s CALR a vést k jeho expozici na plazmatickou membránu.<sup>76</sup>

CALR se může nacházet i na povrchu zdravých buněk, avšak takové buňky produkují dostatek „do not eat me“ signálů, jako například CD47 nebo CD31, které zabraňují fagocytóze.<sup>77</sup> Řada typů nádorových buněk exprimuje na svém povrchu zvýšené množství CD47 nebo CD31 jako jeden z mechanismů úniku nádoru před aktivitou imunitních mechanismů. Při apoptóze dochází k redistribuci CD47 molekul na membráně a nárůstu CALR.<sup>65</sup>

#### **4.2.1 CALR v protinádorové terapii**

Expres CALR na nádorových buňkách byla spojena s lepším průběhem nemoci u pacientů s kolorektálním karcinomem, s malobuněčným karcinomem plic, u žen s karcinomem ovarií nebo u pacientů s akutní myeloidní leukémií.<sup>78-81</sup> Naopak s horším průběhem nemoci byla spojena vysoká exprese CALR například u pacientů s neuroblastomy nebo pacientek s nádory prsu.<sup>82,83</sup>

Na myších s modelem karcinomu hlavy a krku (SCCVII) byl pozorován efekt vyvolaný fotodynamickou terapií (PDT) v kombinaci s přidáním rekombinantním lidským CALR. PDT v kombinaci s CALR prodloužila dobu, za kterou nádor vyrostl do velikosti 200 mm<sup>3</sup> o 21 dní v porovnání s neléčenými nádorovými buňkami a o 17 dní v porovnání s využitím samotné PDT. O 21 dní byla prodloužena doba růstu nádoru i při použití PDT společně s mitoxantronem. Na nádor nemělo žádný vliv použití samotného CALR nebo mitoxantronu a žádný pozitivní efekt se při použití PDT a CALR nevyskytl u imunodeficientních myší, což značí zapojení adaptivní imunity u imunokompetentních myší.<sup>84</sup>

Mutace v exonu 9 v genu pro CALR jsou zaznamenávány u pacientů s primární myelofibrózou nebo esenciální trombocytémií. U obou nemocí to jsou mutace způsobené posunem čtecího rámce o 1 bp. Mutovaná sekvence aminokyselin pro CALR je zcela rozdílná od sekvence nemutované a může být využita pro imunoterapii. Skupina M.

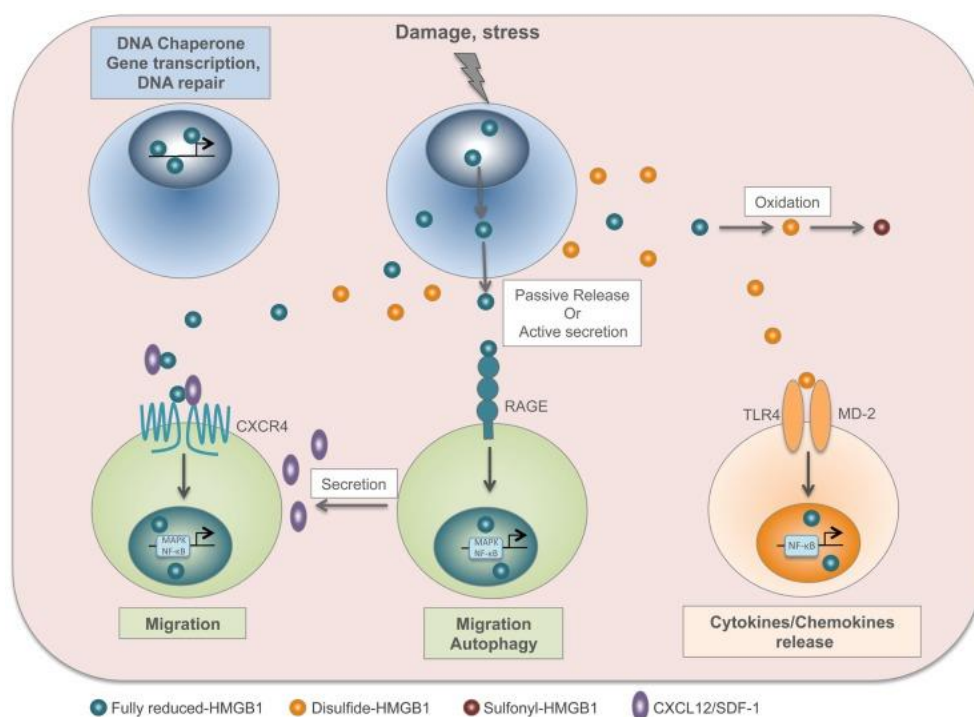
Holmströma vyvinula specifické CD4<sup>+</sup> T lymfocyty pro mutovanou sekvenci CALR. Takové lymfocyty jsou schopny zabít buňky s mutovaným CALR a mohly by být v budoucnu potenciálně využívány v protinádorové terapii.<sup>85</sup>

### 4.3 High-mobility group box 1 (HMGB1)

HMGB1 je protein, o velikosti menší než 30 kDa, který se v normálním stavu nachází v jádře všech buněk kromě mozkových neuronů. V jádře buňky je navázán na chromatin a působí jako transkripční faktor, zároveň se zde stará o opravy DNA a udržuje homeostázu telomer zachováváním aktivní telomerázy.<sup>86,87,88</sup> HMGB1 funguje jako DAMP, když je pasivně uvolněn do extracelulárního prostředí umírajícími či poškozenými buňkami nebo může být aktivně uvolňován leukocyty, případně nádorovými buňkami. Ukázalo se, že HMGB1 má roli jak imunostimulační, tak i imunosupresivní a může pak napomáhat přežití nádorových buněk. Aktivita proteinu HMGB1 ovlivňuje jeho redoxní stav; vnitřní dráha aktivace apoptózy vede k produkci ROS, které oxidují HMGB1 a oxidovaný HMGB1 je tolerogenní.<sup>21</sup>

Nukleární HMGB1 vyskytující se v „klidných“ buňkách je v plně redukované formě, tedy jeho 3 cysteiny (Cys23, Cys45, Cys106) exprimují thiolové skupiny. Pokud je redukovaný protein HMGB1 uvolněn do extracelulárního prostředí v důsledku nekrotické smrti buňky, tvoří komplex s chemokinem CXCL12 a funguje jako chemoatraktant pro leukocyty.<sup>89</sup> Pokud je HMGB1 částečně oxidovaný a je vytvořena disulfidická vazba mezi Cys23 a Cys45, ale Cys106 zůstává v redukované formě, extracelulární HMGB1 stimuluje TLR4 a vede k produkci TNF a jiných prozánětlivých cytokinů makrofágy (např. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, macrophage inflammatory protein (MIP)-1 $\alpha$  a MIP-1 $\beta$ ).<sup>90</sup> Další oxidace HMGB1 vede k vytvoření sulfonylových skupin na jednom nebo více cysteinech a HMGB1 tím ztrácí veškeré prozánětlivé schopnosti. Jakmile dojde k vytvoření sulfonylové skupiny, proces je ireverzibilní.<sup>91</sup>

HMGB1 v extracelulárním prostředí se s vysokou afinitou váže na několik receptorů, především na advanced glycosylation end-product-specific receptory (RAGEs), pokud je redukovaný a na TLR2 a TLR4, pokud je částečně oxidovaný. TLR4 je znám pro svou vazbu s LPS gram-negativních bakterií.<sup>92</sup> K vazbě LPS na TLR4 je nutná přítomnost koreceptorů MD2 a CD14, k následující signalizační kaskádě, která vrcholí translokací NF- $\kappa$ B do jádra, jsou pak využity proteiny myeloid differentiation primary response 88 (MyD88) a TIR domain-containing adapter-inducing interferon  $\beta$  (TRIF).<sup>93,94,95,96</sup> HMGB1 stejně jako LPS potřebuje k aktivaci TLR4 přítomnost koreceptorů CD14 a MD2 a signalizační kaskáda probíhá přes MyD88.<sup>97,98,99</sup> Vazba redukovaného HMGB1 na RAGE receptor vede k aktivaci NF- $\kappa$ B a tvorbě cytokinů.<sup>100</sup>



Obr. 3: role HMGB1 – v jádře funguje plně redukovaný HMGB1 jako DNA chaperon. Když je buňka poškozena nebo podléhá buněčnému stresu, uvolní HMGB1 do extracelulárního prostředí. V závislosti na redoxním stavu HMGB1 může dojít k migraci buněk díky chemoatraktivní roli redukovaného HMGB1, k uvolnění cytokinů díky částečně oxidovanému HMGB1 nebo jeho uvolnění zůstane bez odezvy v případě, že je plně oxidovaný. Obrázek převzat z<sup>97</sup>.

Extracelulární proteiny HMGB1 pocházející z nádorových buněk indukují apoptózu v dendritických buňkách a zvyšují tvorbu tlumivého cytokinu IL-10 tumor-asociovanými Treg.<sup>101,102</sup> Zvýšená exprese HMGB1 je v nádorových buňkách způsobena jejich sekrecí interleukinu 15 a TGF- $\alpha$  (transforming growth factor  $\alpha$ ) a byla prokázána u

kolorektálního karcinomu nebo u maligního mezoteliomu, u kterého byla po inhibici vazby HMGB1 na RAGE výrazně snížena životnost nádorových buněk.<sup>103,104,105</sup>

#### 4.3.1 Využití HMGB1 v protinádorové terapii

Zkoumána byla přímá i nepřímá inhibice extracelulárního HMGB1 v nádorové terapii. Jako antagonisté HMGB1 fungují rekombinantní HMGB1 A box protein, protein RAP (RAGE antagonist peptide), který inhibuje signální kaskádu zprostředkovanou přes RAGE receptor, glycyrrhizin, který se přímo váže na HMGB1 a blokuje jeho aktivitu nebo ethylpyruvát (alifatický ester kyseliny pyrohroznové; EP). Pro zjištění efektu inhibice HMGB1 v protinádorové terapii *in vivo* byly použity tři různé myši modely nádorů prsu (basal-like breast cancer 4T1, 67NR and EpRas) a jeden model velkobuněčného karcinomu plic. U všech čtyřech myších modelů byl pozorován výrazný pokles v nárůstu nádorů po inhibici HMGB1 a všechny čtyři použité inhibitory vykazovaly podobné protinádorové aktivity. Po inhibici HMGB1 došlo k poklesu monocytických a granulocytických myeloidních supresorových buněk (MDSCs), které vykazují imunosupresivní aktivitu. Dále byl pozorován vyšší poměr M1 makrofágů vůči M2 makrofágům a pokles Treg. Naopak byla zvýšena aktivace antigen prezentujících buněk a byl také zvýšen počet apoptických buněk. Inhibice HMGB1 také posiluje efekt anti-PD1 terapie u všech čtyřech pozorovaných nádorů.<sup>106</sup> Inhibitory HMGB1 se zatím nedostaly do klinické fáze testování. Kromě výše zmíněných inhibitorů přichází v úvahu pro klinický výzkum ještě několik dalších molekul; například peptid P5779, který specificky blokuje HMGB1-TLR4/MD-2 dráhu nebo monoklonální HMGB1 protilátky (m2G7 nebo #10–22).<sup>107</sup>

#### 4.4 ATP

Extracelulární ATP je dobře známý „find me“ signál pro neaktivované dendritické buňky a makrofágy uvolňovaný z apoptických buněk. Váže se na purinergní receptor P<sub>2</sub>Y<sub>2</sub> monocytů, které mobilizuje vůči apoptickým buňkám.<sup>108</sup> Narušení této signální dráhy enzymatickým odstraněním ATP nebo inhibicí P<sub>2</sub>Y<sub>2</sub> receptoru vedlo k výraznému snížení odstraňování apoptických buněk.<sup>108</sup> Ukázalo se, že k účinné imunitní odpovědi navozené chemoterapeutiky je zapotřebí přítomnost extracelulárního ATP uvolněného z nádorových buněk.<sup>109</sup> Uvolnění ATP je velmi často blokováno v nádorových buňkách díky inaktivaci genů zodpovědných za spuštění autofágie.<sup>37</sup> Samotná indukce autofágie farmakologickými stimulanty, například rapamycinem, nevede k účinnému uvolnění ATP, musí být tedy spojena s kaspázově-závislou buněčnou smrtí.<sup>37</sup> Na autofágii

nezávislý způsob uvolnění ATP je přenos přes membránový kanál pannexin 1 (PANX1); i tento způsob uvolnění je spojen s aktivitou kaspáz.<sup>110</sup> Pasivně může být ATP uvolňováno v pozdní fázi apoptózy porušenou plazmatickou membránou.<sup>111</sup>

Uvolněné ATP se kromě P<sub>2</sub>Y<sub>2</sub> receptoru může vázat i na purinergní receptory P<sub>2</sub>X<sub>7</sub> na dendritických buňkách a makrofázích. Ligace tohoto receptoru způsobí sestavení inflamazómu a následuje aktivace kaspázy-1 a uvolnění interleukinu 1β, který se účastní protinádorové odpovědi – například je na něm pravděpodobně závislá produkce cytokinů IL-2 a IFN-γ T1 pomocnými lymfocyty.<sup>112,113</sup> P<sub>2</sub>X<sub>7</sub> receptory se však nachází ve velké míře i na většině nádorových buněk, včetně buněk rakoviny prsu, prostaty, kolorektálního karcinomu a dalších.<sup>114,115,116</sup> U rakoviny prostaty vede aktivace P<sub>2</sub>X<sub>7</sub> k významnému zvýšení migrace a invazivity nádorových buněk, u rakoviny prsu byl zaznamenán podobný efekt.<sup>117,118</sup> U kolorektálního karcinomu vysoká exprese P<sub>2</sub>X<sub>7</sub> receptoru koreluje s velikostí tumoru a metastázemi lymfatických uzlin.<sup>119</sup> Aktivace P<sub>2</sub>X<sub>7</sub> receptoru vyvolá u buněk kolorektálního karcinomu aktivaci NF-κB, která vede k vyprovokování maligního fenotypu a zvýšené proliferaci nádorových buněk.<sup>119</sup> Vysoká exprese P<sub>2</sub>X<sub>7</sub> receptorů v nádorových buňkách vede k aktivaci transkripčního faktoru NFATc1, který má klíčovou roli v nádorovém růstu a rychlém uvolňování vaskulárního endotelového růstového faktoru (VEGF), který je hlavním mediátorem v angiogenezi.<sup>120</sup> Blokace receptoru P<sub>2</sub>X<sub>7</sub>, stejně jako blokace VEGF monoklonální protilátkou bevacizumab (Avastin) potvrdila výrazný pokles rychlosti růstu a velikosti nádoru.<sup>120</sup>

Zda se ATP naváže na receptor P<sub>2</sub>X<sub>7</sub> nebo na receptor P<sub>2</sub>Y<sub>2</sub> zřejmě záleží na jeho koncentraci. Pro aktivaci P<sub>2</sub>X<sub>7</sub> receptoru je efektivní koncentrace EC<sub>50</sub> > 100 μM, ale pro aktivaci P<sub>2</sub>Y<sub>2</sub> receptoru je tato koncentrace pouze EC<sub>50</sub> < 1 μM.<sup>121</sup>

Hydrolyzovaná forma ATP adenosin má však imunosupresivní efekt. Hydrolýzu během sekund vykonají povrchové ektonukleotidázy, jako například CD39 (Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1; ENTPD1) a CD73 (ecto-5'-nucleotidase).<sup>122,123</sup> Hydrolýza ATP na adenosindifosfát (ADP) a následně na adenosinmonofosfát (AMP) je přednostně katalyzována nukleotidázou CD39, přičemž dochází k minimálnímu úniku ADP; většina je hydrolyzována na AMP.<sup>122</sup> CD73 pak katalyzuje konverzi AMP na adenosin.<sup>123</sup> Hydrolýza katalyzovaná nukleotidázou CD39 je reverzibilní díky aktivitě extracelulárních nucleoside-diphosphate (NDP) kináz, zatímco hydrolýza katalyzovaná CD73 nukleotidázou je reverzibilní pouze po transportu adenosinu do intracelulárního prostředí, kde se vyskytuje adenosin kináza.<sup>123</sup> Adenosin aktivuje receptory spjaté s G-

proteiny, známé jsou A<sub>1</sub>, A<sub>3</sub>, A<sub>2A</sub> a A<sub>2B</sub> receptory. Stimulace A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> receptorů na T lymfocytech vede k aktivaci adenylátcyklázy a zvýšenému množství cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP), který funguje v mnoha reakcích jako tzv. druhý posel.<sup>124</sup> Zvýšené množství cAMP vede k aktivaci cAMP-dependent protein kinázy I (PKA), která fosforyluje COOH-terminal Src kinázy (Csk).<sup>125</sup> Fosforylovaná Csk pak fosforyluje lymphocyte-specific tyrosine kinázu (Lck), která se tímto deaktivuje a nemůže aktivovat T receptor a produkci IFN- $\gamma$ .<sup>125</sup> Zvýšená produkce cAMP také blokuje aktivaci NF- $\kappa$ B v B lymfocytech a snižuje tak jejich proliferaci.<sup>126</sup> Naopak aktivace A<sub>1</sub> a A<sub>3</sub> receptorů inhibuje produkci cAMP a tyto receptory jsou tedy vnímány jako imunostimulační.<sup>127,128</sup>

Se špatnou prognózou jsou spojeny nádory vykazující zvýšené množství exprimovaných CD73 nukleotidáz. Mezi takové nádory patří triple-negativní karcinom prsu (TNBC), u kterého se navíc vyskytuje i rezistence k imunogenní buněčné smrti indukované antracykliny, dále pak high grade serózní karcinomy (HGSC) ovarií nebo kolorektální karcinom.<sup>129,130,131</sup> Exprese CD73 u pacientů s maligním melanomem s mutací BRAF genu není nutně vysoká, ale u případů, kdy vysoká je, je spojena s mutací genu *TP53* pro tumor supresivní protein p53.<sup>132,133</sup> Zvýšený výskyt této mutace je i u výše popsaných typů nádorů, u kterých se vyskytuje vyšší exprese CD73 nukleotidázy.<sup>129,130</sup>

Protein p53 také přímo ovlivňuje expresi receptoru A<sub>2B</sub>.<sup>134</sup> A<sub>2B</sub> má výrazně menší afinitu k adenosinu než ostatní známé receptory pro adenosin a předpokládá se, že ho stimuluje pouze nadměrně vysoké hladiny adenosinu.<sup>135</sup> Stimulace A<sub>2B</sub> pak za normálních podmínek vede k apoptóze indukované přes p53 protein, při které se výrazně sníží množství proteinů Bcl-2, které podporují přežití buňky a zvýší množství proapoptického Puma proteinu z proteinové rodiny BH3. Tento typ apoptózy byl navozen chemoterapeutikem cisplatinou.<sup>134</sup>

#### 4.4.1 Využití ATP v protinádorové terapii

Nadějně se jeví zesílení protinádorové odpovědi pomocí inhibice endonukleotidáz CD39 a CD73 a blokace A<sub>2A</sub> a A<sub>2B</sub> receptorů. Vliv kombinace inhibice CD73 a A<sub>2A</sub> receptoru byl zkoumán na geneticky modifikovaných myších deficientních pro CD73 i A<sub>2A</sub> receptory, pouze CD73 nebo A<sub>2A</sub> receptor a myších s normálním fenotypem. Byl použit AT-3 myší karcinom a SM1WT1 BRAF-mutovaný melanom, které jsou rezistentní k anti-PD1 terapii. Inhibice CD73 i A<sub>2A</sub> receptoru vedla k výraznému zmenšení nádoru v porovnání s myši, které měly inhibovanou expresi pouze CD73 nebo A<sub>2A</sub> receptoru

nebo s myši s wild-type fenotypem.<sup>136</sup> Podobně účinná byla tato kombinace i při redukci tvorby metastáz u modelu experimentálního metastatického melanomu LWT1 a vyšší přežití vykazovaly i myši s inhibovaným CD73 a A<sub>2A</sub> receptorem s přenesenými nádorovými RMA-s lymfatickými buňkami, které postrádají hlavní histokompatibilní komplex I. třídy (MHCI).<sup>136</sup> Takto pozitivní výsledek byl vysvětlen především úspěšnou infiltrací CD8<sup>+</sup> T lymfocytů do nitra nádoru (tumor core). Toto pozorování pak bylo dále potvrzeno, jelikož odstraněním CD8<sup>+</sup> T buněk došlo ke ztrátě kontroly nad nádorem.<sup>136</sup> V jiné studii byl pozorován efekt způsobený delecí pouze A<sub>2A</sub> receptoru na myeloidních buňkách. Hustota takových buněk v nádoru v porovnání s myeloidními buňkami s nedeletovaným A<sub>2A</sub> receptorem sice zůstala beze změny, ale byla u nich prokázána vyšší exprese hlavního histokompatibilního komplexu II (MHCII) a prozánětlivého IL-12 tumor-asociovanými makrofágy a výrazně nižší exprese intracelulárního IL-10 antigen-prezentujícími buňkami, který inhibuje buněčnou imunitu. Delece A<sub>2A</sub> receptoru vedla také k vyššímu počtu NK buněk a CD8<sup>+</sup> T lymfocytů v nádoru.<sup>137</sup> V další studii byl vyvinut selektivní antagonist A<sub>2B</sub> receptoru, díky kterému byl snížen růst nádorů močového měchýře a snížen růst a vznik plicních metastáz nádoru prsu.<sup>138</sup> Ve druhé fázi klinického testování se nachází využití duálního antagonisty A<sub>2A</sub> a A<sub>2B</sub> receptorů AB928 pro léčbu karcinomu rekta.<sup>139</sup>

## **4.5 Heat-shock proteiny**

Fyziologický stres buněk způsobuje poškození a nesprávné sbalení proteinů. Jedny z proteinů sloužících k obnově buněčné homeostázy jsou vysoce konzervované heat shock proteiny (HSP). Tyto proteiny nejčastěji slouží jako molekulární chaperony, váží se na denaturované proteiny a asistují při jejich sbalování do nativní konformace.<sup>140</sup> Savčí HSP byly rozděleny podle molekulární hmotnosti do 4 skupin: HSP90, HSP70, HSP60 a malé HSPs o velikosti okolo 15-30 kDa.<sup>141</sup>

### **4.5.1 Heat shock protein 90**

Chaperonový HSP90 je exprimován všemi savčími buňkami a ke své správné funkci je závislý na několika ko-chaperonových proteinech a ATP.<sup>142</sup> Mnoho proteinů, které HSP90 ovlivňuje, jsou proteiny podporující přežití buňky a proliferaci. Jedním z nich je například matrixová metaloproteináza (MMP2) se kterou interaguje extracelulární isoforma HSP90- $\alpha$ .<sup>143</sup> MMP2 je spojena s angiogenezí, invazivností a růstem karcinomu močového měchýře, její exprese je zvýšená také u karcinomu žaludku, kde se vykytuje i

zvýšená hladina VEGF.<sup>144,145</sup> Podobně se nachází vysoké hladiny MMP2 a VEGF i u karcinomu ledvin.<sup>146</sup> Další z proteinů, který je ovlivňován HSP90 je proapoptický Bcl-2 protein. Na mitochondriální membráně a v přítomnosti Ca<sup>2+</sup>-kaldmodulinu se nachází protein FKBP38, který zabraňuje apoptóze interakcí s proapoptickým Bcl-2; FKBP38 protein interaguje s HSP90 (v přítomnosti Ca<sup>2+</sup>-kaldmodulinu) a touto interakcí je zabráněno vazbě na Bcl-2, čímž je podpořena apoptóza.<sup>147</sup> HSP90 také přímo interaguje s kinázou RIPK1 a je nezbytný k tomu, aby tato kináza mohla přenášet signál přes TNFR1 po stimulaci TNF. Inhibice HSP90 specifickým inhibitorem geldanamycinem (GA) vedla k blokaci aktivace NF-κB a tedy k zcitlivění buněk k TNF-indukované apoptóze.<sup>148</sup>

Dalším proteinem, který je ovlivňován HSP90, je tumor supresivní protein p53. Tento protein je velmi nestabilní a především při stresových podmínkách potřebuje být stabilizován, k tomu slouží právě HSP90.<sup>149</sup> Bez přítomnosti HSP90 ztrácí při vyšších teplotách protein p53 nenávratně svoji schopnost vazby na DNA.<sup>149</sup> U nádorových buněk se vyskytuje mutovaný protein p53, který má místo tumor-supresivní schopnosti onkogenní schopnost (shrnutí v <sup>150</sup>). Nádorové buňky například vykazují zvýšený příjem glukózy, který je spojen s aerobní glykolýzou; mutovaný protein p53 udržuje příjem glukózy díky interakcím s glukózovým transportérem GLUT1. Buňky tak mohou růst v hypoxickém prostředí, které je nepříznivé pro buňky imunitního systému zajišťující imunitní dohled.<sup>151</sup> Další onkogenní schopností mutovaného p53 proteinu je potlačení autofágie; například přímou inhibicí kinázy AMPK (AMP-activated protein kinase), která při metabolickém stresu indukuje autofági.<sup>152</sup>

Bylo vyvinuto několik různých inhibitorů HSP90. V rané fázi klinických testů bylo několik různých inhibitorů (Retaspimycin (IPI-504), AUY922 nebo Ganetespib), ale výsledky neodpovídaly pozitivnímu efektu na nádorový růst v preklinických fázích testů a vývoj těchto inhibitorů byl přerušen.<sup>153</sup>

#### **4.5.2 Heat shock protein 70**

Dalším z rodiny heat shock proteinů je HSP70. Tento protein je schopen fungovat jako chaperon i cytokin; jeho uvolnění z poškozených a umírajících buněk aktivuje imunitní odpověď vazbou na TLR2 a TLR4 receptory na monocitech.<sup>154</sup> Signální kaskáda vedoucí k produkci prozánětlivých cytokinů, jako je například TNF-α, IL-6 a IL-1β, je



zprostředkována přes adaptorový protein MyD88 a transkripční faktor NF- $\kappa$ B a je nutná přítomnost koreceptoru CD14.<sup>154</sup>

HSP70 je nadměrně exprimován u nádorových buněk. Je pro ně výhodný svou schopností zabránit různým druhům buněčné smrti – kaspázově závislé i nezávislé apoptóze, nekróze i autofágii. Mechanismus inhibice buněčné smrti spočívá v supresi aktivace RIPK1 kinázy ztrátou E3 ligáz a zabránění tvorbě komplexu II.<sup>155</sup> Zajímavé také je, že buněčná smrt vyvolaná inhibicí HSP70 byla nezávislá na Bcl-x<sub>L</sub> proapoptickým proteinu.<sup>155</sup> Pokud byly kaspázy zablokovány kaspázovým inhibitorem z-VAD.fmk, tak byla stejně vyvolána buněčná smrt a to nekroptóza.<sup>155</sup> Vysoká exprese HSP70 byla prokázána u akutní leukémie, rakoviny žaludku, prsu a endometria (shrnutí v <sup>156</sup>).

Vysoká exprese HSP90 proteinu se vyskytuje i u karcinomu močového měchýře.<sup>157</sup> Při použití 7-N-allylamino-17-demethoxygeldanamycinu (17-AAG), inhibitoru HSP90, byl zesílen cytotoxický efekt různých chemoterapeutik (cisplatinu, docetaxelu a gemcitabinu).<sup>157</sup> Inhibice HSP90 však způsobila zvýšenou expresi HSP70, čímž by se vysvětlila možná rezistence nádorů vůči terapii cílené na inhibici HSP90.<sup>157</sup> Samotná inhibice HSP70 inhibitorem pifithrin- $\mu$  (PFT- $\mu$ ) také zesílila cytotoxický efekt chemoterapeutik.<sup>157</sup> Kombinace obou inhibitorů indukovala více apoptóz ve spojení se všemi třemi chemoterapeutiky a jeví se velmi nadějně pro léčbu karcinomu močového měchýře.<sup>157</sup>

## **5 Možnosti ovlivnění imunogenní buněčné smrti v léčbě nádorů**

### **5.1 Belantamab mafodotin (GSK2857916)**

Pacienti s diagnózou mnohočetného myelomu vykazují zvýšenou expresi B-cell maturation antigenu (BCMA). BCMA je transmembránový receptor rodiny TNFR, který je stimulován dvěma známými ligandy – B-cell activating factor (BAFF) a proliferation-inducing ligand (APRIL). Vazba těchto ligandů podporuje proliferaci a přežití především plazmatických buněk v pozdějším stádiu diferenciaci. Maligní myelom je charakterizován abnormální akumulací imunoglobulin-produkujících plazmatických buněk v kostní dřeni. Belantamab mafodotin (GSK2857916) je konjugát protilátky proti BCMA a cytotoxického inhibitoru mikrotubulární polymerizace monometyl auristatinu-F. Léčba mnohočetného myelomu tímto konjugátem vedla nejen k výraznému snížení životaschopnosti BCMA exprimujících buněk, ale hlavně k vystavení CALR na plazmatickou membránu a sekreci HMGB1, ATP, HSP70 i HSP90, což vedlo k aktivaci

specifické imunitní odpovědi. Belantamab mafodotin také indukoval zvýšenou expresi kostimulační molekuly OX40 v CD8<sup>+</sup> i CD4<sup>+</sup> T buňkách – ligand OX40 udržuje aktivované T lymfocyty živé a zvyšuje u nich produkci cytokinů. Proto byla testována kombinace belantamabu mafodotinu s OX86, myším ligandem OX40 receptoru, což vedlo ke kompletní léčbě nádoru u 70 %, 40 % nebo 50 % myší v závislosti na dávce OX86. Tato kombinace se tedy jeví velmi nadějně i pro klinické využití.<sup>158</sup>

## 5.2 Lurbinectedin

Lurbinectedin se váže do malého žlábků DNA, kde tvoří kovalentní vazbu s exocyklickými guaniny. V různých nádorových buňkách specificky a nevratně degraduje polymerázu II a odsuzuje tím buňky k apoptóze.<sup>159</sup> Ukázalo se, že lurbinectedin má i významnou roli v indukci imunogenní buněčné smrti u mnoha různých nádorových linií; u lidského osteosarkomu, kolorektálního karcinomu, rakoviny prsu i myšího fibrosarkomu byla pozorována zvýšená translokace CALR na membránu, výrazné snížení intracelulárního ATP značící jeho sekreci a zvýšená produkce IFN I. Zároveň byla pozorována zvýšená fosforylace eIF2 $\alpha$  a inhibice mRNA transkripce. Zajímavé výsledky přinesla kombinace lurbinectedinu s checkpoint inhibitory cílenými na CTLA4 a PD1 inhibiční receptory na T-lymfocytech vyzkoušená na myších s fibrosarkomem MCA205. Tato kombinace výrazně prodloužila dobu přežití a u 3 z 8 myší vedla k úplnému vymizení tumoru.<sup>160</sup> Lurbinectedin se momentálně nachází ve 3. fázi klinického testování pro léčbu malobuněčného karcinomu plic.<sup>161</sup>

## 6 Závěr

Imunogenní buněčná smrt nádorových buněk může vést ke specifické odpovědi imunitního systému proti nádorovým buňkám, a to díky uvolnění molekul značících nebezpečí. Uvolnění těchto molekul je spojeno s kaspázově nezávislou buněčnou smrtí, nekroptózou, pyroptózou nebo autofágií. Nádorové buňky mají různé mechanismy, jak se brání vyvolání imunogenní buněčné smrti. Přímě zabraňují buněčné smrti například metylací mRNA pro gasdermin E, jehož štěpení vede k pyroptóze nebo nadměrnou expresí HSP70. Pokud dojde k buněčné smrti, snaží se nádorové buňky alespoň zabránit její imunogenicitě – předchází uvolnění DAMPs mutací jejich genů (mutace v exonu 9 pro CALR) či využívají jejich uvolnění pro svůj vlastní prospěch (exprese P<sub>2</sub>X<sub>7</sub> receptoru pro ATP, zvýšená exprese CD73 nukleotidáz).

V této práci je probráno 5 různých DAMPs; IFN typu I, kalretikulin, HMGB1, ATP a HSPs. Tyto DAMPs mají účinky jak imunostimulační, tak i imunosupresivní a pro jejich využití v nádorové imunoterapii je zapotřebí správné porozumění jejich mechanismu účinku ve zdravých i nádorových buňkách. Využití DAMPs v nádorové imunoterapii se momentálně většinou nachází v preklinické fázi testování. V klinické fázi testování už jsou agonisté STING receptoru, indukující produkci IFN I, pegylovaný IFN- $\alpha$  pro léčbu pacientů s melanomem nebo duální antagonisty  $A_{2A}$  a  $A_{2B}$  receptorů pro adenosin AB928 pro léčbu pacientů s karcinomem rekta. Do raných fází klinických testů se dostávají i inhibitory HSP70 a HSP90, avšak u nich výsledky nejsou příliš povzbudivé.<sup>153</sup> Velmi nadějně se jeví využití belantamab mafodotinu (GSK2857916), který vyvolává imunogenní buněčnou smrt u buněk maligního myelomu nebo lurbinectedin, který vyvolává imunogenní buněčnou smrt u více typů nádorových onemocnění a velmi dobře funguje u léčby malobuněčného karcinomu plic.

Pouhé vyvolání imunogenní buněčné smrti nebo posílení efektu některé molekuly značí nebezpečí zřejmě nikdy nebude stačit pro likvidaci nádoru. V kombinaci s ostatními typy dosavadních léčebných metod však může být klíčovým faktorem pro definitivní odstranění nádoru, jelikož je specificky aktivován adaptivní imunitní systém, který je schopen rozpoznat případné nově se objevující nádorové buňky při relapsu nemoci.

## 7 Literatura

1. Dunn, G. P., Old, L. J. & Schreiber, R. D. The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 329–360 (2004).
2. Fuchs, Y. & Steller, H. Programmed Cell Death in Animal Development and Disease. *Cell* **147**, 742–758 (2011).
3. Kroemer, G. *et al.* Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ.* **12**, 1463–1467 (2005).
4. Kroemer, G. & Jäätelä, M. Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 886–897 (2005).
5. Galluzzi, L. *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* **25**, 486–541 (2018).
6. Degterev, A. & Yuan, J. Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 378–390 (2008).
7. Walczak, H. & Krammer, P. H. The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) Apoptosis Systems. *Exp. Cell Res.* **256**, 58–66 (2000).
8. Kischkel, F. C. *et al.* Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* **14**, 5579–5588 (1995).
9. Pennarun, B. *et al.* Playing the DISC: Turning on TRAIL death receptor-mediated apoptosis in cancer. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* **1805**, 123–140 (2010).
10. Hughes, M. A. *et al.* Co-operative and Hierarchical Binding of c-FLIP and Caspase-8: A Unified Model Defines How c-FLIP Isoforms Differentially Control Cell Fate. *Mol. Cell* **61**, 834–849 (2016).
11. Annibaldi, A. & Meier, P. Checkpoints in TNF-Induced Cell Death: Implications in Inflammation and Cancer. *Trends Mol. Med.* **24**, 49–65 (2018).
12. Walczak, H. TNF and ubiquitin at the crossroads of gene activation, cell death, inflammation, and cancer: The TNF receptor 1 signaling complex. *Immunol. Rev.* **244**, 9–28 (2011).

13. Zhao, H. *et al.* Role of necroptosis in the pathogenesis of solid organ injury. *Cell Death Dis.* **6**, e1975–e1975 (2015).
14. Bredesen, D. E., Mehlen, P. & Rabizadeh, S. Apoptosis and Dependence Receptors: A Molecular Basis for Cellular Addiction. *Physiol. Rev.* **84**, 411–430 (2004).
15. Ahmed, A. & Tait, S. W. G. Targeting immunogenic cell death in cancer. *Mol. Oncol.* **14**, 2994–3006 (2020).
16. Chipuk, J. E., Bouchier-Hayes, L. & Green, D. R. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death Differ.* **13**, 1396–1402 (2006).
17. Campbell, K. J. & Tait, S. W. G. Targeting BCL-2 regulated apoptosis in cancer. *Open Biol.* **8**, 180002 (2018).
18. Tait, S. W. G., Ichim, G. & Green, D. R. Die another way – non-apoptotic mechanisms of cell death. *J. Cell Sci.* **127**, 2135–2144 (2014).
19. White, M. J. *et al.* Apoptotic Caspases Suppress mtDNA-Induced STING-Mediated Type I IFN Production. *Cell* **159**, 1549–1562 (2014).
20. Ning, X. *et al.* Apoptotic Caspases Suppress Type I Interferon Production via the Cleavage of cGAS, MAVS, and IRF3. *Mol. Cell* **74**, 19-31.e7 (2019).
21. Kazama, H. *et al.* Induction of Immunological Tolerance by Apoptotic Cells Requires Caspase-Dependent Oxidation of High-Mobility Group Box-1 Protein. *Immunity* **29**, 21–32 (2008).
22. Giampazolias, E. *et al.* Mitochondrial permeabilization engages NF- $\kappa$ B-dependent anti-tumour activity under caspase deficiency. *Nat. Cell Biol.* **19**, 1116–1129 (2017).
23. Upton, J. W., Kaiser, W. J. & Mocarski, E. S. Virus Inhibition of RIP3-Dependent Necrosis. *Cell Host Microbe* **7**, 302–313 (2010).
24. Stupack, D. G. Caspase-8 as a therapeutic target in cancer. *Cancer Lett.* **332**, 133–140 (2013).
25. Kaiser, W. J. *et al.* Toll-like Receptor 3-mediated Necrosis via TRIF, RIP3, and MLKL. *J. Biol. Chem.* **288**, 31268–31279 (2013).

26. Maelfait, J. *et al.* Sensing of viral and endogenous RNA by ZBP 1/ DAI induces necroptosis. *EMBO J.* **36**, 2529–2543 (2017).
27. Murphy, J. M. *et al.* The Pseudokinase MLKL Mediates Necroptosis via a Molecular Switch Mechanism. *Immunity* **39**, 443–453 (2013).
28. Broz, P., Pelegrín, P. & Shao, F. The gasdermins, a protein family executing cell death and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 143–157 (2020).
29. Jorgensen, I. & Miao, E. A. Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens. *Immunol. Rev.* **265**, 130–142 (2015).
30. Latz, E., Xiao, T. S. & Stutz, A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 397–411 (2013).
31. Tan, Y. *et al.* Pyroptosis: a new paradigm of cell death for fighting against cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **40**, 153 (2021).
32. Viganò, E. *et al.* Human caspase-4 and caspase-5 regulate the one-step non-canonical inflammasome activation in monocytes. *Nat. Commun.* **6**, 8761 (2015).
33. Wang, Y. *et al.* Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin. *Nature* **547**, 99–103 (2017).
34. Xia, X. *et al.* The role of pyroptosis in cancer: pro-cancer or pro-“host”? *Cell Death Dis.* **10**, 650 (2019).
35. Zhou, Z. *et al.* Granzyme A from cytotoxic lymphocytes cleaves GSDMB to trigger pyroptosis in target cells. *Science* **368**, eaaz7548 (2020).
36. Levine, B. & Klionsky, D. J. Development by Self-Digestion: Molecular Mechanisms and Biological Functions of Autophagy. *Dev. Cell* **6**, 463–477 (2004).
37. Martins, I. *et al.* Premortem autophagy determines the immunogenicity of chemotherapy-induced cancer cell death. *Autophagy* **8**, 413–415 (2012).
38. Galluzzi, L. *et al.* Consensus guidelines for the definition, detection and interpretation of immunogenic cell death. *J. Immunother. Cancer* **8**, e000337 (2020).
39. Gong, T., Liu, L., Jiang, W. & Zhou, R. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 95–112 (2020).

40. Yatim, N., Cullen, S. & Albert, M. L. Dying cells actively regulate adaptive immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 262–275 (2017).
41. Ivashkiv, L. B. & Donlin, L. T. Regulation of type I interferon responses. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 36–49 (2014).
42. Sistigu, A. *et al.* Cancer cell–autonomous contribution of type I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy. *Nat. Med.* **20**, 1301–1309 (2014).
43. Hopfner, K.-P. & Hornung, V. Molecular mechanisms and cellular functions of cGAS–STING signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **21**, 501–521 (2020).
44. Ishikawa, H. & Barber, G. N. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* **455**, 674–678 (2008).
45. Budhwani, M., Mazzieri, R. & Dolcetti, R. Plasticity of Type I Interferon-Mediated Responses in Cancer Therapy: From Anti-tumor Immunity to Resistance. *Front. Oncol.* **8**, 322 (2018).
46. Stark, G. R. & Darnell, J. E. The JAK-STAT pathway at twenty. *Immunity* **36**, 503–514 (2012).
47. MacMicking, J. D. Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 367–382 (2012).
48. Oh, J. H. *et al.* Sustained Type I Interferon Reinforces NK Cell–Mediated Cancer Immunosurveillance during Chronic Virus Infection. *Cancer Immunol. Res.* **7**, 584–599 (2019).
49. Bek, S. *et al.* Targeting intrinsic RIG-I signaling turns melanoma cells into type I interferon-releasing cellular antitumor vaccines. *OncolImmunology* **8**, e1570779 (2019).
50. Kerr, D. J. *et al.* Phase I and pharmacokinetic study of LM985 (flavone acetic acid ester). *Cancer Res.* **46**, 3142–3146 (1986).
51. Jameson, M. B. *et al.* Transient Retinal Effects of 5,6-Dimethylxanthenone-4-acetic Acid (DMXAA, ASA404), an Antitumor Vascular-Disrupting Agent in Phase I Clinical Trials. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **50**, 2553–2559 (2009).

52. Baguley, B. C. & Siemann, D. W. Temporal Aspects of the Action of ASA404 (Vadimezan; DMXAA). *Expert Opin. Investig. Drugs* **19**, 1413–1425 (2010).
53. Le Naour, J., Zitvogel, L., Galluzzi, L., Vacchelli, E. & Kroemer, G. Trial watch: STING agonists in cancer therapy. *Oncoimmunology* **9**, 1777624.
54. Conlon, J. *et al.* Mouse, but not human STING, binds and signals in response to the vascular disrupting agent DMXAA. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **190**, 5216–5225 (2013).
55. Merck Sharp & Dohme Corp. *A Phase 2 Study in First Line Metastatic or Unresectable, Recurrent Head and Neck Squamous Cell Carcinoma to Evaluate Intratumoral MK-1454 in Combination With IV Pembrolizumab vs IV Pembrolizumab Monotherapy.* <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04220866> (2021).
56. Eggermont, A. M. *et al.* Adjuvant therapy with pegylated interferon alfa-2b versus observation alone in resected stage III melanoma: final results of EORTC 18991, a randomised phase III trial. *The Lancet* **372**, 117–126 (2008).
57. Jia, D.-D. *et al.* Prior Therapy With Pegylated-Interferon Alfa-2b Improves the Efficacy of Adjuvant Pembrolizumab in Resectable Advanced Melanoma. *Front. Oncol.* **11**, (2021).
58. Mesaeli, N. *et al.* Calreticulin Is Essential for Cardiac Development. *J. Cell Biol.* **144**, 857–868 (1999).
59. Michalak, M., Groenendyk, J., Szabo, E., Gold, L. I. & Opas, M. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem. J.* **417**, 651–666 (2009).
60. Coppelino, M. G. & Dedhar, S. Calreticulin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **30**, 553–558 (1998).
61. Obeid, M. *et al.* Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat. Med.* **13**, 54–61 (2007).
62. Panaretakis, T. *et al.* Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *EMBO J.* **28**, 578–590 (2009).
63. Zhang, K. & Kaufman, R. J. Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **279**, 25935–25938 (2004).



64. Hettinghouse, A., Liu, R. & Liu, C. Multifunctional Molecule ERp57: From Cancer To Neurodegenerative Diseases. *Pharmacol. Ther.* **181**, 34–48 (2018).
65. Gardai, S. J. *et al.* Cell-Surface Calreticulin Initiates Clearance of Viable or Apoptotic Cells through trans-Activation of LRP on the Phagocyte. *Cell* **123**, 321–334 (2005).
66. Wei, M. C. *et al.* Proapoptotic BAX and BAK: A Requisite Gateway to Mitochondrial Dysfunction and Death. *Science* **292**, 727–730 (2001).
67. Schcolnik-Cabrera, A. *et al.* Calreticulin in phagocytosis and cancer: opposite roles in immune response outcomes. *Apoptosis* **24**, 245–255 (2019).
68. Wijeyesakere, S. J., Bedi, S. K., Huynh, D. & Raghavan, M. The C-Terminal Acidic Region of Calreticulin Mediates Phosphatidylserine Binding and Apoptotic Cell Phagocytosis. *J. Immunol.* **196**, 3896–3909 (2016).
69. Korb, L. C. & Ahearn, J. M. C1q binds directly and specifically to surface blebs of apoptotic human keratinocytes: complement deficiency and systemic lupus erythematosus revisited. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **158**, 4525–4528 (1997).
70. Fraser, D. A., Laust, A. K., Nelson, E. L. & Tenner, A. J. C1q Differentially Modulates Phagocytosis and Cytokine Responses during Ingestion of Apoptotic Cells by Human Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. *J. Immunol.* **183**, 6175–6185 (2009).
71. Païdassi, H. *et al.* C1q Binds Phosphatidylserine and Likely Acts as a Multiligand-Bridging Molecule in Apoptotic Cell Recognition. *J. Immunol.* **180**, 2329–2338 (2008).
72. Verneret, M. *et al.* Relative Contribution of C1q and Apoptotic Cell-Surface Calreticulin to Macrophage Phagocytosis. *J. Innate Immun.* **6**, 426–434 (2014).
73. Tanaka, T., Narazaki, M. & Kishimoto, T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**, a016295 (2014).
74. Koch, A. E. *et al.* Interleukin-8 as a Macrophage-Derived Mediator of Angiogenesis. *Science* **258**, 1798–1801 (1992).
75. Luppi, F., Longo, A. M., de Boer, W. I., Rabe, K. F. & Hiemstra, P. S. Interleukin-8 stimulates cell proliferation in non-small cell lung cancer through epidermal growth factor receptor transactivation. *Lung Cancer* **56**, 25–33 (2007).

76. de Bruyn, M., Wiersma, V. R., Helfrich, W., Eggleton, P. & Bremer, E. The Ever-Expanding Immunomodulatory Role of Calreticulin in Cancer Immunity. *Front. Oncol.* **5**, (2015).
77. Krysko, D. V., Ravichandran, K. S. & Vandenabeele, P. Macrophages regulate the clearance of living cells by calreticulin. *Nat. Commun.* **9**, 4644 (2018).
78. Peng, R.-Q. *et al.* Expression of calreticulin is associated with infiltration of T-cells in stage IIIB colon cancer. *World J. Gastroenterol. WJG* **16**, 2428–2434 (2010).
79. Fucikova, J. *et al.* Calreticulin Expression in Human Non–Small Cell Lung Cancers Correlates with Increased Accumulation of Antitumor Immune Cells and Favorable Prognosis. *Cancer Res.* **76**, 1746–1756 (2016).
80. Kasikova, L. *et al.* Calreticulin exposure correlates with robust adaptive antitumor immunity and favorable prognosis in ovarian carcinoma patients. *J. Immunother. Cancer* **7**, 312 (2019).
81. Fucikova, J. *et al.* Calreticulin exposure by malignant blasts correlates with robust anticancer immunity and improved clinical outcome in AML patients. *Blood* **128**, 3113–3124 (2016).
82. Chao, M. P. *et al.* Calreticulin is the dominant pro-phagocytic signal on multiple human cancers and is counterbalanced by CD47. *Sci. Transl. Med.* **2**, 63ra94 (2010).
83. Lwin, Z.-M. *et al.* Clinicopathological significance of calreticulin in breast invasive ductal carcinoma. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* **23**, 1559–1566 (2010).
84. Korbelik, M., Banáth, J., Saw, K. M., Zhang, W. & Čiplýs, E. Calreticulin as Cancer Treatment Adjuvant: Combination with Photodynamic Therapy and Photodynamic Therapy-Generated Vaccines. *Front. Oncol.* **5**, 15 (2015).
85. Holmström, M. O. *et al.* The calreticulin (CALR) exon 9 mutations are promising targets for cancer immune therapy. *Leukemia* **32**, 429–437 (2018).
86. Bianchi, M. E. & Agresti, A. HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **15**, 496–506 (2005).

87. Lange, S. S. & Vasquez, K. M. HMGB1: the jack-of-all-trades protein is a master DNA repair mechanic. *Mol. Carcinog.* **48**, 571–580 (2009).
88. Polanská, E., Dobšáková, Z., Dvořáčková, M., Fajkus, J. & Štros, M. HMGB1 gene knockout in mouse embryonic fibroblasts results in reduced telomerase activity and telomere dysfunction. *Chromosoma* **121**, 419–431 (2012).
89. Venereau, E. *et al.* Mutually exclusive redox forms of HMGB1 promote cell recruitment or proinflammatory cytokine release. *J. Exp. Med.* **209**, 1519–1528 (2012).
90. Andersson, U. *et al.* High Mobility Group 1 Protein (Hmg-1) Stimulates Proinflammatory Cytokine Synthesis in Human Monocytes. *J. Exp. Med.* **192**, 565–570 (2000).
91. Yang, H. *et al.* A critical cysteine is required for HMGB1 binding to Toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 11942–11947 (2010).
92. Poltorak, A. *et al.* Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in Tlr4 Gene. *Science* **282**, 2085–2088 (1998).
93. Fitzgerald, K. A., Rowe, D. C. & Golenbock, D. T. Endotoxin recognition and signal transduction by the TLR4/MD2-complex. *Microbes Infect.* **6**, 1361–1367 (2004).
94. Kopp, E. B. & Medzhitov, R. The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **11**, 13–18 (1999).
95. Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K. & Akira, S. Unresponsiveness of MyD88-Deficient Mice to Endotoxin. *Immunity* **11**, 115–122 (1999).
96. Yamamoto, M. *et al.* Role of Adaptor TRIF in the MyD88-Independent Toll-Like Receptor Signaling Pathway. *Science* **301**, 640–643 (2003).
97. Kim, S. *et al.* Signaling of High Mobility Group Box 1 (HMGB1) through Toll-like Receptor 4 in Macrophages Requires CD14. *Mol. Med.* **19**, 88–98 (2013).
98. Yang, H. *et al.* MD-2 is required for disulfide HMGB1-dependent TLR4 signaling. *J. Exp. Med.* **212**, 5–14 (2015).
99. Medzhitov, R. *et al.* MyD88 Is an Adaptor Protein in the hToll/IL-1 Receptor Family Signaling Pathways. *Mol. Cell* **2**, 253–258 (1998).

100. Kokkola, R. *et al.* RAGE is the Major Receptor for the Proinflammatory Activity of HMGB1 in Rodent Macrophages. *Scand. J. Immunol.* **61**, 1–9 (2005).
101. Kusume, A. *et al.* Suppression of Dendritic Cells by HMGB1 Is Associated with Lymph Node Metastasis of Human Colon Cancer. *Pathobiology* **76**, 155–162 (2009).
102. Liu, Z., Falo, L. D. & You, Z. Knockdown of High Mobility Group Box 1 in Tumor Cells Attenuates Their Ability to Induce Regulatory T Cells and Uncovers Naturally Acquired CD8 T Cell-dependent Antitumor Immunity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **187**, 118–125 (2011).
103. Sasahira, T., Sasaki, T. & Kuniyasu, H. Interleukin-15 and transforming growth factor alpha are associated with depletion of tumor-associated macrophages in colon cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* **24**, 69–74 (2005).
104. Lee, H. *et al.* High mobility group box-1 is phosphorylated by protein kinase C zeta and secreted in colon cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **424**, 321–326 (2012).
105. Jube, S. *et al.* Cancer cell secretion of the DAMP protein HMGB1 supports progression in malignant mesothelioma. *Cancer Res.* **72**, 3290–3301 (2012).
106. Hubert, P. *et al.* Extracellular HMGB1 blockade inhibits tumor growth through profoundly remodeling immune microenvironment and enhances checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *J. Immunother. Cancer* **9**, e001966 (2021).
107. Yang, H., Wang, H. & Andersson, U. Targeting Inflammation Driven by HMGB1. *Front. Immunol.* **11**, (2020).
108. Elliott, M. R. *et al.* Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* **461**, 282–286 (2009).
109. Martins, I. *et al.* Chemotherapy induces ATP release from tumor cells. *Cell Cycle* **8**, 3723–3728 (2009).
110. Chekeni, F. B. *et al.* Pannexin 1 channels mediate ‘find-me’ signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature* **467**, 863–867 (2010).
111. Krysko, D. V. *et al.* Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 860–875 (2012).

112. Ghiringhelli, F. *et al.* Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1 $\beta$ -dependent adaptive immunity against tumors. *Nat. Med.* **15**, 1170–1178 (2009).
113. Haabeth, O. A. W., Lorvik, K. B., Yagita, H., Bogen, B. & Corthay, A. Interleukin-1 is required for cancer eradication mediated by tumor-specific Th1 cells. *Oncoimmunology* **5**, e1039763 (2016).
114. Park, M. *et al.* Involvement of the P2X7 receptor in the migration and metastasis of tamoxifen-resistant breast cancer: effects on small extracellular vesicles production. *Sci. Rep.* **9**, 11587 (2019).
115. Solini, A. *et al.* Genetic interaction of P2X7 receptor and VEGFR-2 polymorphisms identifies a favorable prognostic profile in prostate cancer patients. *Oncotarget* **6**, 28743–28754 (2015).
116. Zhang, Y., Ding, J. & Wang, L. The role of P2X7 receptor in prognosis and metastasis of colorectal cancer. *Adv. Med. Sci.* **64**, 388–394 (2019).
117. Qiu, Y. *et al.* P2X7 Mediates ATP-Driven Invasiveness in Prostate Cancer Cells. *PLOS ONE* **9**, e114371 (2014).
118. Chadet, S. *et al.* The activation of P2Y2 receptors increases MCF-7 breast cancer cells migration through the MEK-ERK1/2 signalling pathway. *Carcinogenesis* **35**, 1238–1247 (2014).
119. Qian, F. *et al.* High expression of P2X7R is an independent postoperative indicator of poor prognosis in colorectal cancer. *Hum. Pathol.* **64**, 61–68 (2017).
120. Adinolfi, E. *et al.* Expression of P2X7 receptor increases in vivo tumor growth. *Cancer Res.* **72**, 2957–2969 (2012).
121. Bours, M. J. L., Swennen, E. L. R., Di Virgilio, F., Cronstein, B. N. & Dagnelie, P. C. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol. Ther.* **112**, 358–404 (2006).
122. Robson, S. C., Sévigny, J. & Zimmermann, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal.* **2**, 409–430 (2006).

123. Beavis, Paul. A., Stagg, J., Darcy, P. K. & Smyth, M. J. CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses. *Trends Immunol.* **33**, 231–237 (2012).
124. Stiles, G. L. Adenosine receptors. *J. Biol. Chem.* **267**, 6451–6454 (1992).
125. Vang, T. *et al.* Activation of the C-terminal Src Kinase (Csk) by Camp-Dependent Protein Kinase Inhibits Signaling through the T Cell Receptor. *J. Exp. Med.* **193**, 497–508 (2001).
126. Minguet, S. *et al.* Adenosine and cAMP are potent inhibitors of the NF- $\kappa$ B pathway downstream of immunoreceptors. *Eur. J. Immunol.* **35**, 31–41 (2005).
127. Cronstein, B. N. *et al.* Neutrophil adherence to endothelium is enhanced via adenosine A1 receptors and inhibited via adenosine A2 receptors. *J. Immunol.* **148**, 2201–2206 (1992).
128. Butler, M. *et al.* Impairment of adenosine A3 receptor activity disrupts neutrophil migratory capacity and impacts innate immune function in vivo. *Eur. J. Immunol.* **42**, 3358–3368 (2012).
129. Loi, S. *et al.* CD73 promotes anthracycline resistance and poor prognosis in triple negative breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 11091–11096 (2013).
130. Turcotte, M. *et al.* CD73 Is Associated with Poor Prognosis in High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Cancer Res.* **75**, 4494–4503 (2015).
131. Wu, X.-R. *et al.* High expression of CD73 as a poor prognostic biomarker in human colorectal cancer. *J. Surg. Oncol.* **106**, 130–137 (2012).
132. Matlashewski, G. *et al.* Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene. *EMBO J.* **3**, 3257–3262 (1984).
133. Young, A. *et al.* Targeting Adenosine in BRAF-Mutant Melanoma Reduces Tumor Growth and Metastasis. *Cancer Res.* **77**, 4684–4696 (2017).
134. Long, J. S. *et al.* Extracellular Adenosine Sensing—A Metabolic Cell Death Priming Mechanism Downstream of p53. *Mol. Cell* **50**, 394–406 (2013).
135. Beukers, M. W., den Dulk, H., van Tilburg, E. W., Brouwer, J. & Ijzerman, A. P. Why Are A<sub>2B</sub> Receptors Low-Affinity Adenosine Receptors? Mutation of Asn273 to Tyr Increases

- Affinity of Human A<sub>2B</sub> Receptor for 2-(1-Hexynyl)adenosine. *Mol. Pharmacol.* **58**, 1349–1356 (2000).
136. Young, A. *et al.* Co-inhibition of CD73 and A2AR Adenosine Signaling Improves Anti-tumor Immune Responses. *Cancer Cell* **30**, 391–403 (2016).
137. Cekic, C., Day, Y.-J., Sag, D. & Linden, J. Myeloid expression of Adenosine A2A receptor suppresses T and NK cell responses in the solid tumor microenvironment. *Cancer Res.* **74**, 7250–7259 (2014).
138. Cekic, C. *et al.* Adenosine A2B Receptor Blockade Slows Growth of Bladder and Breast Tumors. *J. Immunol.* **188**, 198–205 (2012).
139. Weill Medical College of Cornell University. *A Phase II Study to Test the Efficacy of AB928 (Dual Adenosine Receptor Antagonist) and AB122 (a PD1 Checkpoint Inhibitor) in Combination With Short Course Radiotherapy and Consolidation Chemotherapy for Rectal Cancer.* <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05024097> (2022).
140. Ellis, R. J. & Hemmingsen, S. M. Molecular chaperones: proteins essential for the biogenesis of some macromolecular structures. *Trends Biochem. Sci.* **14**, 339–342 (1989).
141. Jegou, G., Hazoumé, A., Seigneuric, R. & Garrido, C. Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer Lett.* **332**, 275–285 (2013).
142. Obermann, W. M. J., Sondermann, H., Russo, A. A., Pavletich, N. P. & Hartl, F. U. In Vivo Function of Hsp90 Is Dependent on ATP Binding and ATP Hydrolysis. *J. Cell Biol.* **143**, 901–910 (1998).
143. Eustace, B. K. *et al.* Functional proteomic screens reveal an essential extracellular role for hsp90 $\alpha$  in cancer cell invasiveness. *Nat. Cell Biol.* **6**, 507–514 (2004).
144. Elkin, M. *et al.* Inhibition of bladder carcinoma angiogenesis, stromal support, and tumor growth by halofuginone. *Cancer Res.* **59**, 4111–4118 (1999).
145. Partyka, R., Gonciarz, M., Jałowiecki, P., Kokocińska, D. & Byrczek, T. VEGF and metalloproteinase 2 (MMP 2) expression in gastric cancer tissue. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* **18**, BR130-134 (2012).

146. Ahmad, S., Singh, V., Sinha, R. J., Srivastava, A. & Mandhani, A. Role of MMP-2, MMP-9 and VEGF as serum biomarker in early prognosis of renal cell carcinoma. *Afr. J. Urol.* **24**, 255–263 (2018).
147. Edlich, F. *et al.* The Bcl-2 Regulator FKBP38-Calmodulin-Ca<sup>2+</sup> Is Inhibited by Hsp90\*. *J. Biol. Chem.* **282**, 15341–15348 (2007).
148. Lewis, J. *et al.* Disruption of Hsp90 Function Results in Degradation of the Death Domain Kinase, Receptor-interacting Protein (RIP), and Blockage of Tumor Necrosis Factor-induced Nuclear Factor- $\kappa$ B Activation \*. *J. Biol. Chem.* **275**, 10519–10526 (2000).
149. Müller, L., Schaupp, A., Walerych, D., Wegele, H. & Buchner, J. Hsp90 Regulates the Activity of Wild Type p53 under Physiological and Elevated Temperatures\*. *J. Biol. Chem.* **279**, 48846–48854 (2004).
150. Mantovani, F., Collavin, L. & Del Sal, G. Mutant p53 as a guardian of the cancer cell. *Cell Death Differ.* **26**, 199–212 (2019).
151. Goetze, K. Lactate enhances motility of tumor cells and inhibits monocyte migration and cytokine release. *Int. J. Oncol.* (2011) doi:10.3892/ijo.2011.1055.
152. Cordani, M. *et al.* Mutant p53 proteins counteract autophagic mechanism sensitizing cancer cells to mTOR inhibition. *Mol. Oncol.* **10**, 1008–1029 (2016).
153. Hendriks, L. E. L. & Dingemans, A.-M. C. Heat shock protein antagonists in early stage clinical trials for NSCLC. *Expert Opin. Investig. Drugs* **26**, 541–550 (2017).
154. Asea, A. *et al.* Novel Signal Transduction Pathway Utilized by Extracellular HSP70: ROLE OF Toll-LIKE RECEPTOR (TLR) 2 AND TLR4\*. *J. Biol. Chem.* **277**, 15028–15034 (2002).
155. Srinivasan, S. R. *et al.* Heat Shock Protein 70 (Hsp70) Suppresses RIP1-Dependent Apoptotic and Necroptotic Cascades. *Mol. Cancer Res. MCR* **16**, 58–68 (2018).
156. Kumar, S. *et al.* Targeting Hsp70: A possible therapy for cancer. *Cancer Lett.* **374**, 156–166 (2016).



157. MA, L. *et al.* Dual targeting of heat shock proteins 90 and 70 promotes cell death and enhances the anticancer effect of chemotherapeutic agents in bladder cancer. *Oncol. Rep.* **31**, 2482–2492 (2014).
158. Montes de Oca, R. *et al.* Belantamab Mafodotin (GSK2857916) Drives Immunogenic Cell Death and Immune-mediated Antitumor Responses In Vivo. *Mol. Cancer Ther.* **20**, 1941–1955 (2021).
159. Santamaría Nuñez, G. *et al.* Lurbinectedin Specifically Triggers the Degradation of Phosphorylated RNA Polymerase II and the Formation of DNA Breaks in Cancer Cells. *Mol. Cancer Ther.* **15**, 2399–2412 (2016).
160. Xie, W. *et al.* Lurbinectedin synergizes with immune checkpoint blockade to generate anticancer immunity. *Oncoimmunology* **8**, e1656502 (2019).
161. Hoffmann-La Roche. *A Phase III, Randomized, Open-Label, Multicenter Study of Lurbinectedin in Combination With Atezolizumab Compared With Atezolizumab as Maintenance Therapy in Participants With Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer (ES-SCLC) Following First-Line Induction Therapy With Carboplatin, Etoposide and Atezolizumab.* <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05091567> (2022).