

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory (B3912)

Studijní obor: BMOBIBO (1515R011)



Ján Kuzmík

Povrchová exprese CD47 na nádorových kmenových buňkách jako cíl protinádorové léčby

Cell surface CD47 expression in cancer stem cell-targeted tumor therapy

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel:

RNDr. Karel Drbal, Ph.D.

Praha, 2016

Prohlášení:

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

V Praze, 16. 8. 2016

Ján Kuzmík

Podakovanie:

Chcel by som poďakovať svojmu školiteľovi RNDr. Karolovi Drbalovi, Ph.D. za podrobné komentovanie priebežných verzií a vedenie tejto práce. Ďalej by som chcel vyjadriť vďaku svojim rodičom za podporu počas môjho štúdia.

Abstrakt

CD47 je transmembránový glykoproteín s vysokou mierou expresie na zdravých a nádorových (kmeňových) bunkách. Miera expresie CD47 je záporne korelovaná s prežitím pacientov s nádorovým ochorením. Väzba CD47 so SIRP α , lokalizovanom na fagocyte, spúšťa vnútrobunkovú signalizačnú kaskádu. Konečným účinkom tejto kaskády je defosforylácia nesvalového myozínu IIA, ktorá narúša jeho funkciu a akumuláciu do miesta fagocytickej synapsie. Blokovanie CD47-SIRP α signalizačnej osi za prítomnosti pro-fagocytického signálu indukuje fagocytózu nádorových buniek. Fagocyty následne môžu plniť úlohu antigén prezentujúcich buniek a spustiť protinádorovú T bunkovú odpoveď. Funkcia CD47-SIRP α signalizačnej osi v imunite robí z tejto osi cieľ testovania protinádorovej liečby. Preklinický výskum identifikoval terapeutickú účinnosť blokovania tejto signalizačnej osi. V súčasnosti prebieha prvá fáza klinického testovania. Najčastejším terapeutickým spôsobom blokovania signalizačnej osi CD47-SIRP α je použitie anti-CD47 blokujúcich monoklonálnych protilátok. Použitím týchto protilátok dochádza k miernej anémii. Avšak vyvíjané sú aj alternatívne spôsoby blokovania tejto signalizačnej osi. V tejto bakalárskej práci zhŕňam výskum spojený s blokovaním CD47-SIRP α signalizačnej osi ako protinádorovej liečby.

Kľúčové slová

CD47, SIRP α , expresný profil, blokovanie väzby, nádorové kmeňové bunky, nádorový biomarker, klinické testovanie, imunoterapia

Abstract

CD47 is a transmembrane glycoprotein with a high expression in both, healthy and cancer (stem) cells. Level of the CD47 expression is negatively correlated with survival of cancer patients. Binding of CD47 to SIRP α , localized on a phagocyte, triggers intracellular signaling cascade. The final effect of this cascade is dephosphorylation of nonmuscle myosin-IIA, which disrupts its function and accumulation to phagocytic synapse. The blockage of CD47-SIRP α signaling pathway in a presence of the pro-phagocytic signal induces phagocytosis of cancer cells. Afterwards, phagocytes can serve as the antigen presenting cells and prime T cell response. Role of CD47-SIRP α signaling pathway in immunity has established this pathway as a target of cancer therapy testing. Preclinical research has identified a positive therapeutic effect of blocking this signaling pathway. Nowadays, the first phase of clinical trials is being conducted. The most prevalent approach of blocking CD47-SIRP α signaling pathway in therapy is the use of anti-CD47 blocking monoclonal antibodies, which cause mild anemia. However, alternative approaches of blocking this pathway are also being developed. In this bachelor thesis, I have summarized the research related to the blockage of CD47-SIRP α signaling pathway as a cancer therapy.

Keywords

CD47, SIRP α , expression profile, binding inhibition, cancer stem cells, cancer biomarker, clinical trials, immunotherapy

Zoznam skratiek

AML	akútna myeloidná leukémia	acute myeloid leukemia
APC	antigén prezentujúca bunka	antigen presenting cell
CD	skupina povrchových znakov	cluster of differentiation
cOVA	cytoplazmatický ovalbumín	cytoplasmatic ovalbumin
CSC	nádorová kmeňová bunka	cancer stem cell
DC	dendritická bunka	dendritic cell
Fc	protilátkový konštantný fragment	antibody fragment crystallizable
FcR	receptor protilátkového konštantného fragmentu	antibody fragment crystallizable receptor
GFP	zelený fluorescenčný proteín	green fluorescent protein
Ig	imunoglobulín	immunoglobulin
SF	superrodina	superfamily
IQR	medzikvartilové rozpätie	interquartile range
IS	imunitný systém	immune system
ITIM	na tyrozíne založený imunoreceptorový inhibičný motív	immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
K_D	disociačná konštanta	dissociation constant
mAb	monoklonálna protilátka	monoclonal antibody
MHC	hlavný histokompatibilný komplex	major histocompatibility complex
NMM	nesvalový myozín	nonmuscle myosin
NOD	neobézny diabetický	non-obese diabetic
NSG	neobézny diabetický scid gamma	non-obese diabetic scid gamma
p	p -hodnota	p -value
σ	smerodajná odchylka	standard deviation

Obsah

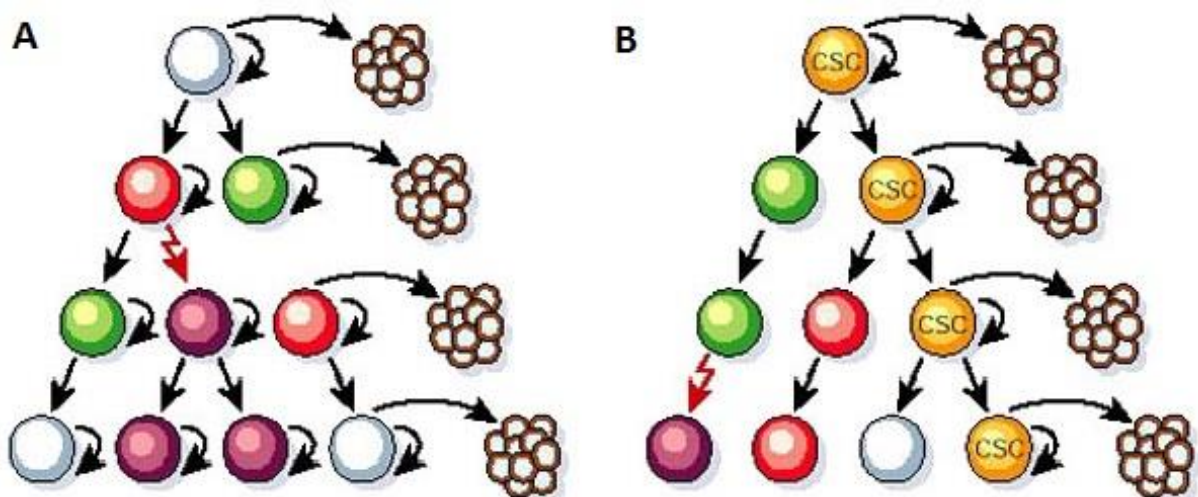
1. Úvod	1
1.1. Koncept nádorových kmeňových buniek	1
1.2. Fagocytóza.....	3
1.3. Úloha imunitného systému v nádorovom ochorení.....	3
1.3.1. Úloha makrofágov	4
1.3.2. Úloha T buniek.....	4
1.4. Molekuly CD47 a SIRP α	4
2. Miera expresie CD47	6
2.1. Spojitosť medzi zvýšenou expresiou CD47 a výskytom nádorového ochorenia	8
2.2. Expresia na nádorových kmeňových bunkách	9
3. Štruktúra CD47	10
4. Interakcia CD47-SIRP α	11
4.1. CD47-SIRP α ako os signalizácie inhibujúca fagocytózu	12
5. Blokovanie CD47-SIRP α signalizačnej osi ako protinádorová liečba	14
5.1. Makrofágy ako efektory anti-CD47 terapie.....	14
5.2. T bunky ako efektory anti-CD47 terapie	15
5.3. Alternatívy anti-CD47 mAb.....	18
5.4. Vedľajšie účinky blokovania	19
5.5. Klinické testovanie.....	20
6. Záver	22
7. Použitá literatúra	23

1. Úvod

Pred začatím testovania novej protinádorovej liečby je potrebné jej funkčné odôvodnenie. To je v prípade liečby zameranej na blokovanie CD47-SIRP α signalizačnej osi nasledovné: príčinou zvýšenej miery expície CD47 na nádorových (kmeňových) bunkách je potlačenie protinádorovej odpovede imunitného systému (ďalej IS) inhibíciou fagocytózy pomocou väzby s fagocytickým SIRP α . Blokováním tejto väzby, za prítomnosti pro-fagocytického signálu, zvyšuje fagocytózu nádorových buniek. Navyše, fagocyt môže následne plniť úlohu antigén prezentujúcej bunky (ďalej APC) a aktivovať T bunkovú odpoveď. V tejto práci sa zaoberám výskumom spojeným s racionalizáciou blokovania CD47-SIRP α signalizačnej osi ako protinádorovej liečby. Pre lepšie pochopenie mechanizmov zodpovedných za protinádorový účinok tohto blokovania, v úvode v krátkosti opíšem koncept nádorových kmeňových buniek (ďalej CSC), fenomén fagocytózy, úlohu IS v nádorovom ochorení a interagujúce molekuly.

1.1. Koncept nádorových kmeňových buniek

Existujú dva základné modely, ktoré vysvetľujú heterogenitu nádorov (Obrázok 1). Podstatným rozdielom medzi nimi je spôsob, akým vznikajú nové nádory. Kým v prvom modeli majú všetky bunky schopnosť vytvoriť nový nádor, druhý model poukazuje na špecializované progenitorové typy buniek (takzvané CSC) zodpovedné za túto vlastnosť nádorov.



Obrázok 1 **Dva modely heterogenity nádorov.** (A) Všetky nádorové bunky sú schopné proliferácie, samoobnovy a tvorby nových nádorov. (B) Väčšina nádorových buniek má iba obmedznú schopnosť proliferácie a iba CSC je schopná samoobnovy a tvorby nových nádorov. Prevzaté od [Reya et al. 2001](#).

Z klinického hľadiska je pre úplné vyliečenie pacienta nutné odstrániť všetky bunky schopné vytvoriť nový nádor. To je ale z pohľadu druhého modelu pri klasickej liečbe chemo- a rádioterapiou problematické, pretože CSC sú pripisované črty klasických kmeňových buniek, teda aj zvýšená odolnosť voči bunkovému stresu, ktorý je vyvolaný týmito terapiami ([Clevers 2011](#)). Spolu s ostatnými pripisovanými vlastnosťami ako schopnosť samoobnovy, dlhodobej neaktivity a obsadzovania nových ník v organizme ([Clevers 2011](#)) je druhý model schopný vysvetliť recidívu ochorenia aj po zdanlivo úspešnej liečbe, respektíve vytvorenie metastáz aj po dlhšej dobe od liečby. Z pohľadu druhého modelu je teda použitie CSC-účinnnej terapie nevyhnutné pre zabránenie týmto javom. Príkladom vývoja takejto terapie je výskum v oblasti blokovania CD47-SIRP α signalizačnej osi.

Pre validáciu druhého modelu je kľúčová identifikácia CSC. Ich experimentálne určovanie je založené na rozdelení kompletnej sady buniek nádoru pomocou bunkových znakov (napríklad povrchových molekúl ako CD44, CD47, CD90 a CD133 (2.2. Expresia na nádorových kmeňových bunkách)), respektíve ich kombinácií, na subpopulácie. Nasleduje určovanie schopností týchto subpopulácií vštípiť sa a obnoviť pôvodnú heterogenitu nádoru v imunodeficientných myšiach ([Clevers 2011](#)). Týmto spôsobom boli CSC identifikované v akútnej myeloidnej leukémii (ďalej AML), chronickej myeloblastovej leukémii, glioblastómoch, v karcinómoch prsníka, hrubého čreva, vaječníka a pankreasu ([Meacham a Morrison 2013](#)). Avšak o funkcii takto identifikovaných CSC v pôvodnom nádore prebieha diskusia. Jej dôvodom je metodologický spôsob tejto identifikácie. Jeho nedostatkom je proces xenotransplantácie, počas ktorého sú nádorové bunky vystavené stresu a následne sa ocitnú v prostredí nezodpovedajúcom pôvodnému nádoru, čo môže mať vplyv na ich životaschopnosť a fenotyp ([Clevers 2011](#)). Inak povedané, xenotransplantované nádorové bunky sú pred, počas a po procese vystavené navzájom odlišným signálom (významnými rozdielmi sú iné mikroprostredie a iný stav IS), ktoré vplývajú na ich fyziológiu. Vyvinutie nových metód a ďalší výskum v oblasti heterogenity nádorov je potrebný pre potvrdenie prítomnosti a fenotypovej stability CSC v primárnych nádoroch. Najmä otázka fenotypovej stability je kľúčová pre odôvodnenie použitia špecializovaných, na CSC mierených terapií. Na CSC mierené terapie by v prípade nestability CSC fenotypu neboli účinné, respektíve ich účinnosť by bola podmienená odstránením všetkých buniek schopných transformácie na CSC fenotyp.

Potreba potvrdenia prítomnosti a fenotypovej stability CSC neplatí pre odôvodnenie liečby zameranej na blokovanie CD47-SIRP α interakcie. Dôvodom je fakt, že CD47 je negatívny regulátor fagocytózy (4.1. CD47-SIRP α ako os signalizácie inhibujúca fagocytózu), ktorý svojou funkciou vo všeobecnosti napomáha vštípeniu sa (nádorových) buniek bez ohľadu na skutočnú schopnosť diferenciácie a samoobnovy vštepovaných buniek. To znamená, že medzi mierou expresie CD47 (a s ňou súvisiacou

reguláciou fagocytózy) a kmeňovosťou buniek nie je kauzalita (priamo príčinný vzťah) a teda terapia mierená na CD47 je podmienená expresiou tohto proteínu a nie CSC fenotypom cieľových buniek.

1.2. Fagocytóza

Fagocytóza je proces pri ktorom bunka-fagocyt, napríklad makrofág, alebo dendritická bunka (ďalej DC) internalizuje časticu väčšiu ako 0,5 μm ([Flannagan et al. 2012](#)). Hoci pôvodná funkcia v jednobunkovcoch je prijímanie potravy, najneskôr u sociálneho druhu améby *Dictyostelium discoideum* sa začala ustanovovať rola fagocytózy a špecializovaných fagocytov v prirodzenej imunite. U tohto druhu améby existujú špecializované strážne bunky schopné zvýšenej miery detoxifikácie a fagocytózy patogénov ([Chen et al. 2007](#)). U stavovcov je fagocyt schopný plniť úlohu APC, ktorá aktivuje naivné T bunky prezentáciou antigénov na hlavných histokompatibilných komplexoch (ďalej MHC) a kostimulačného signálu ([McCracken et al. 2015](#)). Tým prepájajú prirodzenú a adaptívnu zložku IS. Okrem imunitnej úlohy má fagocytóza ešte úlohu v embryogenéze a telovej organizácii mnohobunkových organizmov.

Fagocytóza je iniciovaná integráciou signalizačných kaskád stimulačných a inhibičných signálov na membráne fagocytu, pričom následne, ak je výsledný signál pozitívny, dochádza k rozsiahlym zmenám v cytoskelete, remodelácii bunkovej membrány a samotnej internalizácii cieľa. Väzba povrchovej molekuly CD47, nachádzajúcej sa na cieľovej bunke, so SIRP α je príkladom takéhoto fagocytózu inhibujúceho signálu ([Jaiswal et al. 2010](#)). Naproti tomu väzba protilátkového konštantného fragmentu (ďalej Fc) na Fc receptor (ďalej FcR) je príkladom stimulačného signálu.

1.3. Úloha imunitného systému v nádorovom ochorení

Úloha IS vo vývoji nádorového ochorenia nie je zjavná. Výskum indukovaných a spontánných nádorov v myších modeloch s neúplným IS preukázal schopnosť tohto systému negatívne regulovať nádorové bujnenie ([Vesely et al. 2011](#)). To viedlo k navrhnutiu schopnosti vyhnúť sa odpovedi IS ako jednej z charakteristických črt nádorového bujnenia ([Hanahan a Weinberg 2011](#)). Tento návrh podporuje aj vyššia imunogenita (schopnosť vyvolať odpoveď IS) nádorov, ktoré vznikli v jedincoch s neúplným IS ([Vesely et al. 2011](#)). Z toho možno usúdiť, že v transformovaných bunkách sa hromadia mutácie, ktorých efekt negatívne reguluje odpoveď IS proti nim a až po nahromadení dostatku takýchto mutácií dôjde k samotnému klinickému ochoreniu. Príkladom výsledku takéhoto procesu je zvýšená expresia CD47 v nádorových bunkách (2.1. Spojitosť medzi zvýšenou expresiou CD47 a výskytom nádorového ochorenia).

Napriek negatívnej regulácii sú imunitné bunky spájané aj so mutagénnym zápalovým prostredím, podporujúcim vývoj nádoru ([Hanahan a Weinberg 2011](#)). V nasledujúcich podkapitolách v krátkosti zhrniem úlohu makrofágov a T buniek, ktoré sú pre túto prácu dôležité.

1.3.1. Úloha makrofágov

Existuje mnoho subpopulácií makrofágov, ktoré sa pohybujú v rozmedzí od zápal podporujúceho fenotypu M1 do zápal potlačujúceho a obnovu tkaniva podporujúceho M2 fenotypu ([Jaiswal et al. 2010](#)). M1 makrofágy sú schopné fagocytózy a krížovej prezentácie nádorových antigénov, ale transformáciou M2 makrofágov vznikajú nádorovo asociované makrofágy, ktoré podporujú angiogénu a ich prítomnosť je spojená so zhoršeným vývojom ochorenia ([Hanahan a Weinberg 2011](#)).

1.3.2. Úloha T buniek

T bunky sú schopné prirodzenej protinádorovej odpovede, avšak tá je závislá od imunogenity nádoru. Najvyššiu imunogenitu majú vírusovo indukované nádory, pričom schopnosť indukovať T bunkovú odpoveď ostatnými typmi nádorov býva niekedy spochybnovaná ([Hanahan a Weinberg 2011](#)). Pre túto prácu jeho dôležitá schopnosť cytotoxických CD8⁺ T buniek antigén špecifickej odpovede na nádorové bunky ([McCracken et al. 2015](#)).

1.4. Molekuly CD47 a SIRP α

CD47 je transmembránový glykoproteín. Skladá sa z extracelulárnej N-koncovej ektodomény, patriacej do imunoglobulínovej superrodiny (ďalej IgSF) domén, piatich membránou prechádzajúcich úsekov a 4 až 36 aminokyselín dlhého intracelulárneho C-konca ([Lindberg et al. 1993](#); [Reinhold et al. 1995](#)). Je schopný cis-väzby s integrínmi $\alpha\beta3$, $\alpha1b\beta3$ a $\alpha2\beta1$, Rh antigénnym komplexom, SIRP α , VEGFR2 a Fas receptorom, trans-väzby s TSP1 a medzibunkovej väzby so SIRP α a SIRP γ ([Soto-Pantoja et al. 2013](#); [Brown a Frazier 2001](#)). Väzba TSP1 na CD47 znižuje bunkovú cGMP/NO signalizáciu, čím slúži ako regulátor kardiovaskulárnych funkcií, napríklad krvného tlaku, srdcovej činnosti a homeostázy krvných doštičiek ([Roberts et al. 2012](#)). Okrem toho je TSP1-CD47 signalizácia schopná zvýšiť bunkovú koncentráciu Ca²⁺, regulovať hladinu cAMP a indukovať apoptózu ([Roberts et al. 2012](#)). Funkcia CD47 ako receptoru, signalizujúceho do vnútra bunky, presahuje záber tejto práce, v ktorej sa zameriam iba na jeho schopnosť negatívne regulovať fagocytózu väzbou so SIRP α .

Vypočítaná molekulová hmotnosť CD47 je 32-35 kDa, v závislosti od dĺžky C-konca, avšak elektroforeticky bola určená na ~45-55 kDa ([Brown a Frazier 2001](#)). Rozdiel je zapríčinený posttranskripčnými úpravami, napríklad N-glykoziláciou IgSF domény. Známa je tiež >250 kDa ťažká

proteoglykánová izoforma, obsahujúca glykózaminoglykánové zvyšky na Ser⁶⁴ a Ser⁷⁹ IgSF domény ([Kaur et al. 2011](#)).

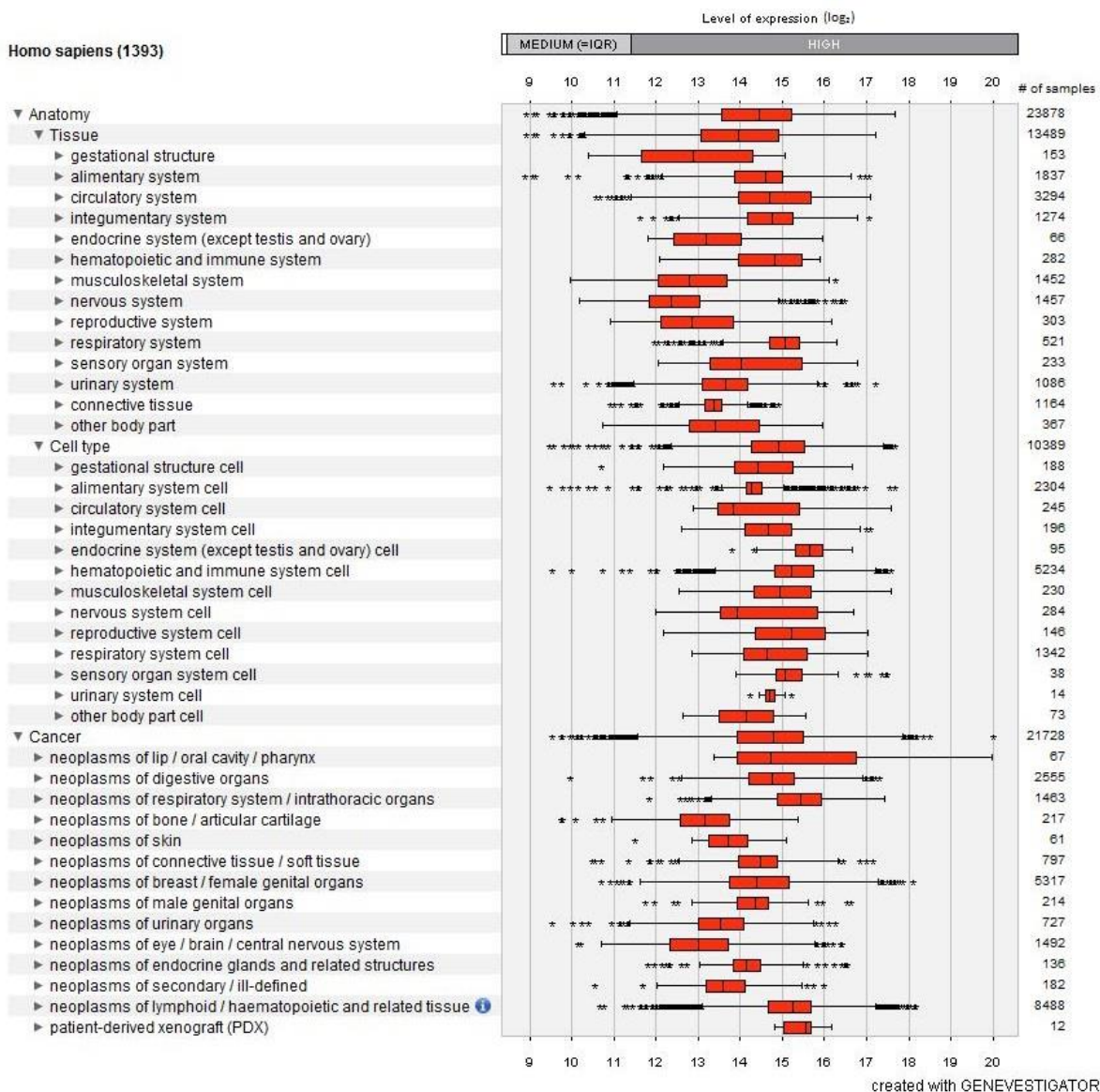
SIRP α je transmembránový proteín exprimovaný na neurónoch, monocytoch, subpopuláciach makrofágov, časti dendritických buniek, granulocytoch a niektorých progenitorových bunkách kostnej drene ([Barclay a Berg 2014](#)). Skladá sa z troch extracelulárnych IgSF domén, jedného transmembránového úseku a cytoplazmatického C-konca, ktorý obsahuje 4 tyrozíny, tvoriace 2 imunoreceptorové, na tyrozíne založené inhibičné motívy (ďalej ITIM) ([Barclay a Berg 2014](#)). Pre túto prácu je dôležitá jeho schopnosť spustiť signalizačnú kaskádu, ktorá negatívne reguluje fagocytózu CD47 exprimujúcich buniek (4.1. CD47-SIRP α ako os signalizácie inhibujúca fagocytózu).

V ďalších častiach popíšem mieru expresie CD47, štruktúru CD47, afinitu a štruktúru tejto interakcie a signalizačnú osu CD47-SIRP α .

2. Miera expresie CD47

Dva projekty RNA sekvenovania, publikované vo verejnej databáze *The Human Protein Atlas*, odhalili prítomnosť CD47 vo všetkých (konkrétne v 32, respektíve 28) meraných tkanivách ľudského tela ([Tissue expression of CD47 - Summary - The Human Protein Atlas](#)). Avšak fluorescenčné farbenie protilátkami tento výsledok nepotvrdilo, keďže až v 13 zo 44 testovaných tkanivách nebola prítomnosť CD47 týmto spôsobom detegovaná ([Tissue expression of CD47 - Summary - The Human Protein Atlas](#)). Spoľahlivosť značenia protilátkami a odborná anotácia dát z transkriptov ešte nebola vykonaná ([Tissue expression of CD47 - Summary - The Human Protein Atlas](#)). Dôvodom rozdielnych výsledkov môže byť nešpecifickosť protilátok a regulácia expresie CD47, spôsobujúca kvantitatívne rozdiely medzi transkriptom a skutočným množstvom proteínu schopného viazať protilátku.

Vysoká miera expresie CD47 je indikovaná výsledkami experimentov detekcie transkriptu technológiou hybridizačných mikročipov (Obrázok 2). Relatívne hodnoty expresie sú štandarizované na hodnotu 1000 (čo v logaritmickú stupnici s koeficientom 2 predstavuje hodnotu 10). Tá predstavuje priemernú hodnotu expresie všetkých transkriptov v experimentálnej vzorke ([Geneinvestigator® user manual](#)). Všetky IQR (medzikvartilové rozpätia, vysvetlené v popise Obrázok 2) hodnôt expresie sa nachádzajú v oblasti anotovanej ako oblasť vysokej expresie, ktorá je definovaná ako oblasť nad horným kvartilom všetkých hodnôt expresie v danej experimentálnej vzorke ([Geneinvestigator® user manual](#)). Navyše, v štandardnej desiatkovej sústave sú všetky IQR testovaných súborov vzoriek v rozmedzí jedného rádu (to znamená v rozmedzí približne 3,3 jednotiek na logaritmickú stupnici s koeficientom 2). V podobnom rozmedzí (od 12,47 po 15,45) sa nachádzajú aj priemery jednotlivých súborov vzoriek. Hoci sa niektoré odľahlé hodnoty nachádzajú v oblasti anotovanej ako stredná hodnota expresie, celkovo možno zhrnúť, že CD47 je vysokoexprimovaný proteín v zdravých aj rakovinových bunkách.



Obrázok 2 Škatuľový diagram (anglicky „boxplot“) expresie CD47. Expresia CD47 v ľudských tkanivách, bunkových typoch a nádoroch meraná pomocou relatívneho množstva mRNA. Diagram bol vytvorený mojou vlastnou analýzou verejne dostupných dát komerčným nástrojom Geneinvestigator® (Hruz et al. 2008) na základe 45606 hodnôt expresie získaných z databází *Gene Expression Omnibus* (Edgar et al. 2002) a *ArrayExpress* (Kolesnikov et al. 2015) a následne upravený. Použil som výsledky platformy vyvinutej spoločnosťou Affymetrix (*GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array | Affymetrix*) mapované próbou s identifikátorom 213857_s_at, ktorá bola nástrojom Geneinvestigator® označená ako najlepšia. Stupnica expresie je logaritmickej s koeficientom 2. Medzikvartilové rozpätia (ďalej IQR) medzi hornými a dolnými kvartilmi (to znamená hodnoty väčšie ako najmenších 25 % hodnôt z daného súboru vzoriek, ale zároveň menšie ako najväčších 25 % hodnôt z daného súboru) sú znázornené červenými obdĺžnikmi (anglicky „box“). Medián je znázornený zvislou čiarou. Fúzy (anglicky „whiskers“) predstavujú najnižšiu hodnotu nachádzajúcu sa vo vzdialenosti 1,5 násobku IQR od dolného kvartilu a najvyššiu hodnotu nachádzajúcu sa vo vzdialenosti 1,5 násobku IQR od horného kvartilu, pričom hodnoty mimo tento rozsah sú znázornené ako hviezdičky.

2.1. Spojitosť medzi zvýšenou expresiou CD47 a výskytom nádorového ochorenia

Priemerná hodnota relatívnej expresie (anglicky „mean“) 23878 anatomických vzoriek je podľa Obrázok 2 14,37 a priemerná hodnota relatívnej expresie 21728 nádorových vzoriek z rovnakého obrázku je 14,69. To je pri logaritmickej stupnici s koeficientom 2 v priemere o 25 % vyššia relatívna expresia CD47 v nádorových vzorkách. *P*-hodnota (ďalej *p*) vypočítaná na základe počtu vzoriek, priemerov a smerodajných odchýlok (ďalej σ) expresie nádorových ($\sigma=1,14$) a anatomických vzoriek ($\sigma=1,25$) Welchovým t-testom ([Welch's t-test](#)), ktorý testuje nulovú hypotézu rovnosti priemerných hodnôt súborov vzoriek, v závislosti od hodnôt priemerov, rozptylu a veľkosti súborov, je nižšia ako 0,0001. To znamená, že na tejto hladine pravdepodobnosti možno nulovú hypotézu zamietnuť. Inak povedané, vyššie spomínaným spôsobom som preukázal štatisticky významnú vyššiu expresiu nádorových vzoriek. Avšak napriek tomu tento výsledok nemá veľkú výpovednú hodnotu, pretože je založený na porovnaní celkových hodnôt expresie a jednotlivé počty vzoriek z rôznych častí tela (s rôznou mierou expresie) sa líšia. Navyše, rôzne sú aj priemerné hodnoty podsúborov anatomických vzoriek tkanív (13,95) a bunkových typov (14,92). V neposlednom rade ešte raz podotýkam, že sa jedná o relatívne hodnoty expresie transkriptu, ktorých prevod na skutočné hodnoty expresie sa mi nepodarilo realizovať. Podrobnejšia štatistická analýza, posudzujúca jednotlivé bunkové línie, by dokázala uspokojivejšie odpovedať na otázku o korelácii výskytu nádorového ochorenia a zvýšenej expresie CD47. Taká analýza ale z dôvodu veľkého množstva dostupných dát presahuje túto prácu. Preto sa v ďalšej časti svojej práce zameriam na dáta publikované vo vedeckej tlači.

Zvýšená miera expresie CD47 v nádorovom bujnení bola nameraná aj pomocou kvantitatívnej prietokovej cytometrie. Na nádorových bunkách karcinómov žalúdka, hrubého čreva, pľúc, obličiek a sarkómov bola v priemere 3,3-krát vyššia expresia CD47 ako na susedných nerakovinových bunkách (*p* nie je publikovaná) ([Willingham et al., 2012](#)). V AML bola rovnakou metódou nameraná 1,8-krát vyššia expresia CD47 na rakovinových bunkách oproti normálnym kmeňovým a multipotentným progenitorovým bunkám kostnej drene ($p < 0,005$) ([Majeti et al. 2009](#)).

Spojitosť medzi mierou expresie CD47 a výskytom nádorového ochorenia indikuje aj analýza jednonukleotidových polymorfizmov s potenciálnym vplyvom na expresiu CD47 na vzorke 613 pacientov s kolorektálnym karcinómom. Analýza identifikovala štyri takéto polymorfizmy v regulačných oblastiach CD47 ako potenciálne indikátory vývoja ochorenia ([Lascorz et al. 2013](#)).

Závažnosť miery expresie CD47 v súvislosti s nádorovým ochorením indikuje aj spojitosť medzi klinickým priebehom (skrátenu dĺžkou prežitia pacientov) a mierou expresie CD47 v nádorových bunkách. Spojitosť bola zistená analýzou jednonukleotidových polymorfizmov s vplyvom na expresiu

CD47 na vzorke 613 pacientov s kolorektálnym karcinómom ([Lascorz et al. 2013](#)), analýzou miery expresie CD47 mRNA u 383 pacientov s gliómom a u 191 pacientov s glioblastómom ([Willingham et al. 2012](#)) a tiež v karcinóme žalúdka na základe imunologického značenia vzoriek od 115 pacientov ([Yoshida et al. 2015](#)). Takáto spojitosť bola taktiež identifikovaná v AML ([Majeti et al. 2009](#)), avšak iná štúdia štatisticky významnú spojitosť neidentifikovala ([Galli et al. 2015](#)). Identifikovaná bola aj analýzou dvoch nezávislých dátových súborov 837 a 1117 pacientov s karcinómom prsníka ($p < 0,05$) ([Zhang et al. 2015](#)).

Publikovaná bola aj spojitosť medzi schopnosťou proliferácie a mierou expresie CD47 v bunkách karcinómu žalúdka ([Yoshida et al. 2015](#)).

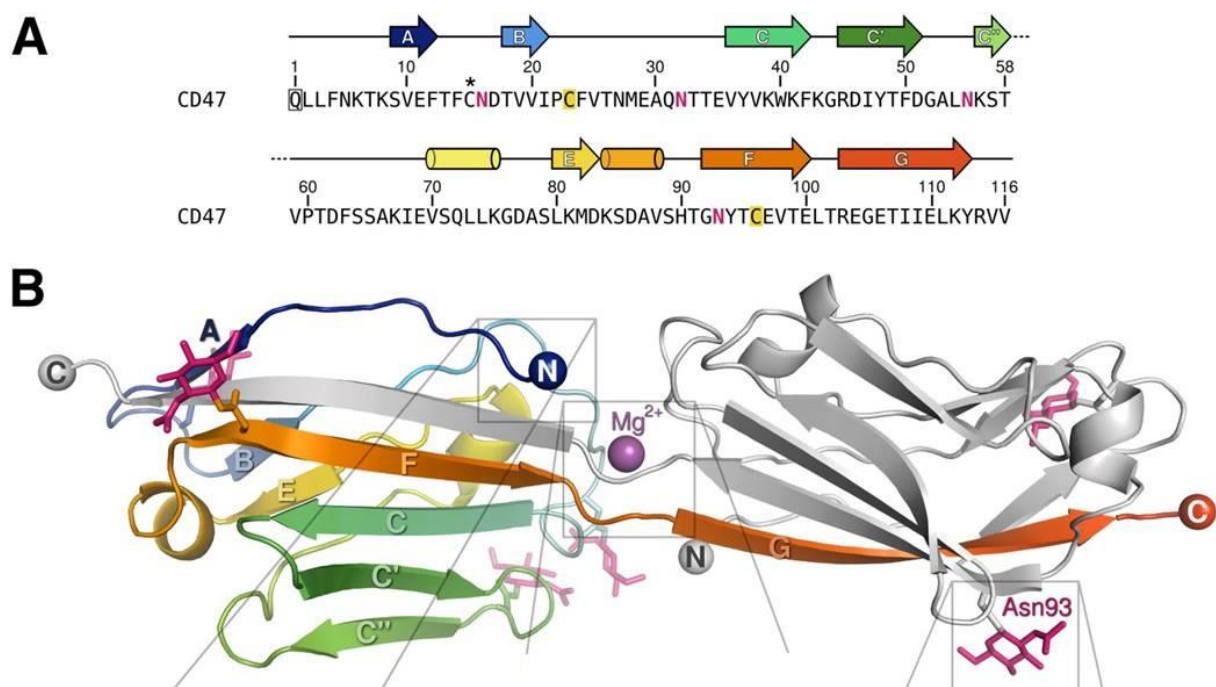
2.2. Expressia na nádorových kmeňových bunkách

V tejto podkapitole v krátkosti predstavím expresiu CD47 na definovaných populáciách CSC. Väčšina (77 až 97 %) CSC rakoviny pankreasu (CD133⁺ buniek, ďalej len skratkovito) je CD47⁺ ([Cioffi et al. 2015](#)). Avšak hodnota CD47⁺ buniek v CD133⁻ subpopulácii pre porovnanie miery expresie CD47 a diferenčného štádia bunky nie je publikovaná ([Cioffi et al. 2015](#)). Ďalej, CD47 expresia je zvýšená na CSC karcinómu močového mechúra (CD44⁺) oproti CD44⁻ subpopulácii ($p=0,03$) ([Chan et al. 2009](#)), CSC karcinómu prsníka (EPCAM⁺MET⁺CD44⁺) oproti EPCAM⁺MET⁺CD44⁻ subpopulácii ($p=0,0005$) ([Baccelli et al. 2013](#)) a je tiež zvýšená na CSC AML (Lin⁻CD34⁺CD38⁻CD90⁻) v porovnaní s klasickými hematopoetickými kmeňovými (Lin⁻CD34⁺CD38⁻CD90⁺; $p=0,003$) a multipotentnými progenitorovými bunkami (Lin⁻CD34⁺CD38⁻CD90⁻CD45RA⁻; $p=0,004$) ([Majeti et al. 2009](#)). Avšak medzi mierou expresie CD47 na CSC AML a súborom všetkých buniek AML nie je rozdiel ($p=0,5$) ([Majeti et al. 2009](#)), čo indikuje nezmenenú expresiu CD47 počas diferenciácie buniek AML. CSC karcinómu pečene, identifikované ako dva klony buniek odolných voči liečivu sorafenib, majú zvýšenú mieru expresie CD47 ($p=0,01$ a $p=0,04$) ([Lo et al. 2015](#)).

Na dobre definovaných CSC AML nie je CD47⁺ znakom diferenciácie a úloha ostaných definovaných CSC populácií v primárnom nádore si zasluhuje ďalší výskum (1.1. Koncept nádorových kmeňových buniek). Napriek tomu nie sú pochybnosti, že CD47 je vysokoexprimovaný proteín a že miera jeho expresie súvisí s nepriaznivým vývojom nádorového ochorenia. To z neho robí cieľ protinádorovej liečby.

3. Štruktúra CD47

Štruktúra IgSF ektodomény CD47 je znázornená na Obrázok 3. Číslovanie na Obrázok 3 a v texte tejto práce je bez N-koncového, 18 aminokyselín signálneho peptidu. Cys¹⁵, nachádzajúci sa na ektodoméne, tvorí spolu s Cys²⁴⁵, nachádzajúcom sa na ektoplazmatickej časti transmembránovej domény, disulfidickú väzbu (Rebres et al. 2001). V experimentálnom modeli znázornenom na Obrázok 3 bol, z dôvodu zabránenia tvorby nefyziologických väzieb, Cys¹⁵ mutovaný na Gly. Ektodoména znázornená na Obrázok 3 kryštalizovala vo forme diméru a C-koncové G vlákna sú medzi týmito doménami prehodené. Prehodenie týchto vlákien ani forma diméru nemajú preukázaný biologický význam, keďže CD47 sa na SIRP α viaže ako monomér (Obrázok 4) s nerozlíšiteľnou konformáciou (okrem slučky medzi F a G vláknom, ktorej úprava je nevyhnutná pre správnu polohu G vlákna) (Hatherley et al. 2008). Navyše, analýza výsledkov gélovej filtrácie nepreukázala prítomnosť dimerickej formy CD47 (Hatherley et al. 2008).

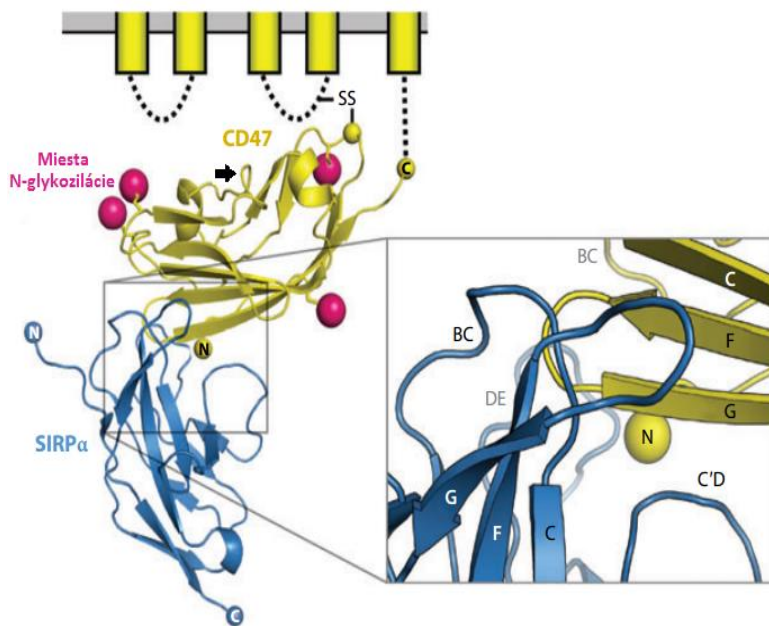


Obrázok 3 **Štruktúra ektodomény CD47** (A) Primárna a sekundárna štruktúra extraacelulárnej IgSF domény CD47. Valce predstavujú α -helixy a šípky predstavujú β -listy. N-koncový Gln¹, ktorý cyklizuje na pyroglutamát, je označený obdĺžnikom. Cys¹⁵ je označený hviezdčičkou. Cys²³ a Cys⁹⁶, tvoriace disulfidickú väzbu, sú zvýraznené žltou. Miesta N-glykozilácie sú zvýraznené fialovou. (B) Model diméru extracelulárnych IgSF ektodomén CD47 vytvorený na základe kryštalografických dát difrakcie v 1,9Å rozlíšení. Značenie sekundárnych štruktúr korešponduje so značením v (A). G vlákna jednotlivých ektodomén sú v tomto modeli prehodené. Prevzaté od (Hatherley et al. 2008), upravené.

4. Interakcia CD47-SIRP α

Interakcia medzi CD47 a SIRP α má relatívne nízku afinitu, disociačná konštanta (ďalej K_D) bola podľa analýzy výsledkov z viacerých meraní povrchovou plazmónovou rezonanciou určená na 0,6 μ M (Kwong et al. 2014), 1,2 μ M (Hatherley et al. 2008) a na 0,7 μ M (Hatherley et al. 2014). V tejto práci budem ďalej pracovať s hodnotou 0,8 μ M, ktorá je priemerom vyššie citovaných hodnôt.

Model štruktúry interakcie je znázornený na Obrázok 4. Miesta N-glykozilácie CD47 sa nachádzajú mimo oblasti interakcie so SIRP α , takže väzba nie je týmto spôsobom ovplyvnená (Obrázok 4) (Hatherley et al., 2008). V prípade >250 kDa ťažkej izoformy CD47 sa glykozilované Ser⁶⁴ a Ser⁷⁹ taktiež nachádzajú mimo časti interagujúcej so SIRP α (na Obrázok 4 je poloha Ser⁶⁴ označená šípkou a Ser⁷⁹ sa nachádza na odvrátenej strane molekuly). Avšak väzba tejto izoformy nebola preukázaná a kvôli veľkosti glykózaminoglykánových zvyškov na týchto serínoch sa ich interferencia s väzbou nedá vylúčiť. Neprítomnosť disulfidickej väzby medzi Cys¹⁵, nachádzajúcom sa na IgSF ektodoméne CD47, a Cys²⁴⁵, nachádzajúcom sa na ektoplazmazitckej časti transmembránovej domény, znižuje relevanciu modelu na Obrázok 4. Zánik tejto väzby pomocou mutácie jedného alebo oboch týchto cysteínov na seríny znižuje množstvo rozpustného fúzneho SIRP α 1-Fc proteínu viažuceho sa na membránový CD47 približne o 30 až 50 % (Rebres et al. 2001). To indikuje, že neprítomnosť tejto väzby má vplyv na štruktúru väzbového miesta IgSF ektodomény CD47.



Obrázok 4 Štruktúra komplexu CD47 (žltou) a SIRP α (modrou).

Model komplexu extracelulárnej ektodomény CD47 a N-koncovkej domény SIRP α vytvorený na základe kryštalografických dát difrakcie na dvoch formách kryštálov v 1,85Å a 2,3Å rozlíšení. Päť transmembránových helixov CD47 a disulfidická väzba medzi Cys¹⁵ (v experimentálnom modeli mutovanom na Gly; žltá guľa) a Cys²⁴⁵ sú znázornené schematicky. Miesta N-glykozilácie sú označené ako ružové gule. Ser⁶⁴ je označený

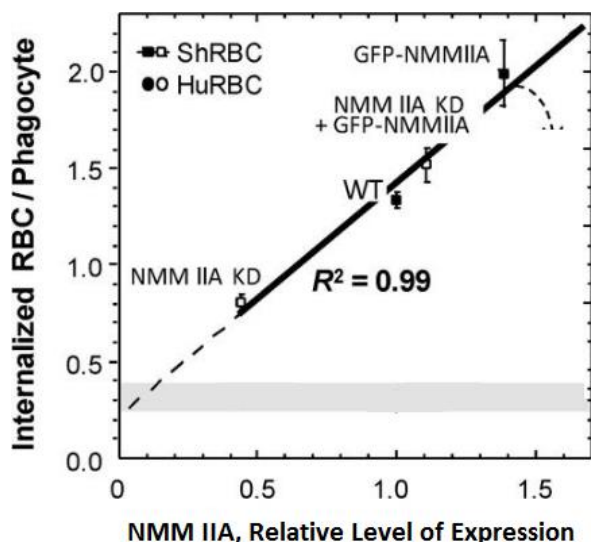
šípkou. Rozhranie CD47-SIRP α väzby a na nej sa podieľajúce slučky sú znázornené v detaile. Prevzaté od (Hatherley et al. 2008), upravené.

4.1. CD47-SIRPα ako os signalizácie inhibujúca fagocytózu

Pri aktivácii SIRPα pomocou CD47 dochádza, pravdepodobne pomocou aktivity Src kináz, k fosforylácii dvoch ITIM, nachádzajúcich sa na cytoplazmatickej časti SIRPα (Barclay a Berg 2014). Fosforylované ITIM aktivujú cytosólické tyrozínové fosfatázy SHP-1 a SHP-2, ktoré následne svojou aktivitou negatívne regulujú vnútrobunkovú signalizáciu. Konečným efektom tejto signalizačnej kaskády v makrofágoch je defosforylácia nesvalového myozínu IIA (ďalej NMM IIA). Pri funkčnej CD47-SIRPα signalizácii je množstvo fosfotyrozínu v tomto proteíne 3,3-násobne znížené (Tsai a Discher 2008).

Nevysvetleným ostáva spôsob aktivácie SIRPα pomocou CD47, keďže experimenty s vysokoafinitnou ektodoménou CD47 ukázali, že samotná obsadenosť SIRPα receptora nie je dostačujúca na spustenie vnútrobunkovej signalizácie (Ho et al. 2015). Ho et al. sa domnievajú, že istá miera zhlukovania a vytvorenie bunkového spoja sú podmienkami aktivácie SIRPα pomocou CD47 (Ho et al. 2015), ale pre objasnenie mechanizmu transdukcie signálu cez membránu je potrebný ďalší výskum.

Funkciu NMM IIA ako proteínu zodpovedného za internalizáciu cieľa indikuje priama závislosť počtu fagocytovaných červených krviniek od miery jeho (relatívnej) expresie (Obrázok 5) (Tsai a Discher 2008). Experiment s mutovanými formami tohto proteínu indikuje, že jeho defosforylácia má vplyv na jeho lokalizáciu do fagocytickej synapsie a na účinnosť fagocytózy (Tsai a Discher 2008). Okrem toho, blokovanie CD47 pomocou monoklonálnej protilátky (ďalej mAb) 3,8-násobne zvýšilo imunofluorescenciu NMM IIA v mieste kontaktu medzi makrofágom a erytrocytom (Tsai a Discher 2008). To potvrdzuje NMM IIA ako efektor CD47 spustenej SIRPα signalizácie. Úlohu NMM IIA ako efektora CD47 signalizácie potvrdzuje aj jeho neprítomnosť v okolí fagocytovanej nanočastice s na jej povrchu prichyteným CD47. Neprítomnosť NMM IIA bola meraná ako relatívna intenzita fluorescence (Rodriguez et al. 2013).



Obrázok 5 Závislosť fagocytózy a expresie NMM IIA. Model závislosti fagocytózy a expresie NMM IIA určený ako závislosť počtu fagocytovaných opsonizovaných červených krviniek na relatívnej miere expresie NMM IIA. Hodnota koeficientu determinácie je 99 %. Prevzaté od (Tsai a Discher 2008), upravené.

NMM IIA nie je kľúčový element pre základnú mieru fagocytózy. Dokladom toho je neschopnosť jeho inhibítora blebistatínu inhibovať fagocytózu ([Tsai a Discher 2008](#)). Okrem toho, priamka lineárnej závislosti fagocytózy a miery jeho expresie pretína vertikálnu os v kladnej, nenulovej hodnote (Obrázok 5). To indikuje prítomnosť základnej, na NMM IIA nezávislej miery fagocytózy (Obrázok 5, šedý pruh). Fagocytóza v šedej oblasti je zapríčinená opsonizáciou červených krviniek imunoglobulínom G (ďalej IgG), ktorý poskytuje pro-fagocytický signál väzbou na FcR.

5. Blokovanie CD47-SIRP α signalizačnej osi ako protinádorová liečba

Zvýšená miera expresie CD47 na nádorových (kmeňových) bunkách a jeho úloha, spolu so SIRP α , v inhibícii fagocytózy robí z týchto proteínov cieľ protinádorovej liečby. Výskum v tejto oblasti prebieha v *in vitro* kultúrach, xenotransplantačných a syngénnych myších modeloch a v súčasnosti prebieha aj prvá fáza klinického testovania. V tejto kapitole najprv tento výskum zhrniem z pohľadu dvoch bunkových typov protinádorovej imunitnej odpovede – makrofágov a T buniek. V tomto výskume bola až na výnimky CD47-SIRP α signalizácia blokováná pomocou anti-CD47 mAb. V ďalších častiach kapitoly sa zameriam na alternatívy k tomuto prístupu, vedľajšie účinky blokovania a prebiehajúce klinické testovanie.

5.1. Makrofágy ako efekторы anti-CD47 terapie

Pridanie anti-CD47 mAb do *in vitro* bunkovej kultúry indukuje fagocytózu makrofágmi rakovinových buniek karcinómu hrubého čreva ([Tseng et al. 2013](#)), žalúdka ([Yoshida et al. 2015](#)) a močového mechúra ([Chan et al. 2009](#)), adenokarcinómu pankreasu ([Cioffi et al. 2015](#)), AML ([Majeti et al. 2009](#)) a súboru vzoriek karcinómov vaječníka, hrubého čreva, prsníka a glioblastómov ([Willingham et al. 2012](#)). V uvedených štúdiách bola štandardne použitá anti-CD47 blokujúca protilátka B6H12 v porovnaní s kontrolou izotypickým IgG. Okrem toho, niektoré štúdie vykonali kontrolu aj v porovnaní s anti-CD47 neblokujúcou protilátkou 2D3, ktorá, podobne ako IgG kontrola, neindukovala fagocytózu ([Majeti et al. 2009](#); [Tseng et al. 2013](#); [Willingham et al. 2012](#)). Z toho vyplýva, že samotný efekt opsonizácie protilátkami nie je dostatočný na vysvetlenie pozorovanej miery fagocytózy. K tej dochádza iba pri blokovaní SIRP α väzbového miesta.

Autori štúdií sa väčšinou následne zamerali na efekt pridania protilátky B6H12 do myších *in vivo* xenotransplantačných modelov ľudskej rakoviny. Na tento účel boli zvolené imunodeficientné myšie kmene (najčastejšie bolo použité NSG („non-obese diabetic scid gamma“) myši bez T, B a NK bunkovej odpovede) z dôvodu minimalizácie odpovede IS na xenotransplantát. Tieto experimenty potvrdili terapeutický efekt anti-CD47 mAb, keďže mali vplyv na dĺžku prežitia xenotransplantačného modelu ľudskej rakoviny karcinómu žalúdka ([Yoshida et al. 2015](#)), vaječníka ([Willingham et al. 2012](#)), na veľkosť nádoru, ktorý vznikol z buniek ľudskeho osteosarkómu ([Xu et al. 2015](#)), karcinómu prsníka a hrubého čreva ([Willingham et al. 2012](#)), adenokarcinómu pankreasu ([Cioffi et al. 2015](#)) a glioblastómu ([Willingham et al. 2012](#)), na schopnosť tvoriť metastázy rakovinových buniek ľudskeho osteosarkómu, karcinómu močového mechúra a dlaždicového karcinómu hlavy a krku ([Xu](#)

[et al. 2015](#)) a na množstvo a fagocytózu rakovinových buniek v modeli AML ([Majeti et al. 2009](#)). Tieto experimenty boli vykonané v porovnaní s izotypickou IgG kontrolou.

Autori vyššie citovaných štúdií preukázali účinnosť anti-CD47 blokujúcej terapie a identifikovali fagocytózu ako proces zodpovedný za efekt tejto terapie. Avšak použitie imunodeficientných myší spochybňuje tento záver. Zásadným nedostatkom je práve neúplnosť IS, ktorá zabraňuje skúmaniu ďalších jeho zložiek. Navyše, použitie NSG kmeňa mohlo zvýrazniť fagocytický účinok blokovania. Príčinou je medzidruhové nastavenie modelov. NSG myši majú mutáciu v géne pre SIRP α , ktorá zvyšuje jeho afinitu k ľudskému CD47 ($K_D=0,08 \mu\text{M}$) približne 59-násobne v porovnaní s interakciou s vlastným, myším CD47 ($K_D=4,7 \mu\text{M}$) a 10-násobne oproti ľudskej CD47-SIRP α interakcii ($K_D=0,8 \mu\text{M}$) ([Kwong et al. 2014](#)). Vyššia disociačná konštanta znamená v priemere častejší výskyt interakcie CD47-SIRP α a s ňou spojenú signalizáciu. Z toho v tomto prípade vyplýva, že základná miera fagocytózy xenotransplantovaných ľudských (rakovinových) buniek je v tomto modeli znížená. To z nich robí model ľudských xenotransplantátov ([Kwong et al. 2014](#)). Avšak štatistická významnosť testov je z princípu citlivá práve na základnú hodnotu testovaného javu a preto pridanie anti-CD47 mAb blokujúcich túto vysokoafinitnú interakciu mohlo umelo zvýšiť významnosť pro-fagocytického účinku.

V ďalšej časti sa zameriam na výskum T bunkovej odpovede ako mechanizmu zodpovedného za terapeutický účinok blokovania interakcie CD47-SIRP α .

5.2. T bunky ako efekторы anti-CD47 terapie

Rolu T buniek v anti-CD47 terapii objasňujú dve série experimentov, ktoré preukázali schopnosť anti-CD47 terapie aktivovať CD8⁺ T bunkovú odpoveď ([Liu et al. 2015](#); [Tseng et al. 2013](#)).

Tseng et al. pripravili bunkovú líniu ľudských rakovinových buniek hrubého čreva DLD1 exprimujúcich cytoplazmatický ovalbumín a zelený fluorescenčný proteín (ďalej DLD1-cOVA-GFP bunky) ([Tseng et al. 2013](#)). Potom ukázali, že makrofágy kultivované *in vitro* s B6H12 protilátkou a DLD1-cOVA-GFP bunkami sú schopné tieto rakovinové bunky fagocytovať, krížovo prezentovať ovalbumínový peptid na MHC-I a do prostredia uvoľniť zápal podporujúce cytokíny ([Tseng et al. 2013](#)). Pridanie B6H12 protilátky k DC v obdobnom *in vitro* experimente síce vyústilo do štatisticky významnej miery fagocytózy ($p<0,05$ oproti IgG a 2D3 protilátkovej kontrole) ([Tseng et al. 2013](#)), ale relatívne množstvo fagocytujúcich DC bolo nižšie ako u makrofágov (približne 3 % DC a približne 16 % makrofágov) ([Tseng et al. 2013](#)). Autori štúdie určili množstvo fagocytujúcich DC ako primálne a rozhodli sa DC ďalej neskúmať.

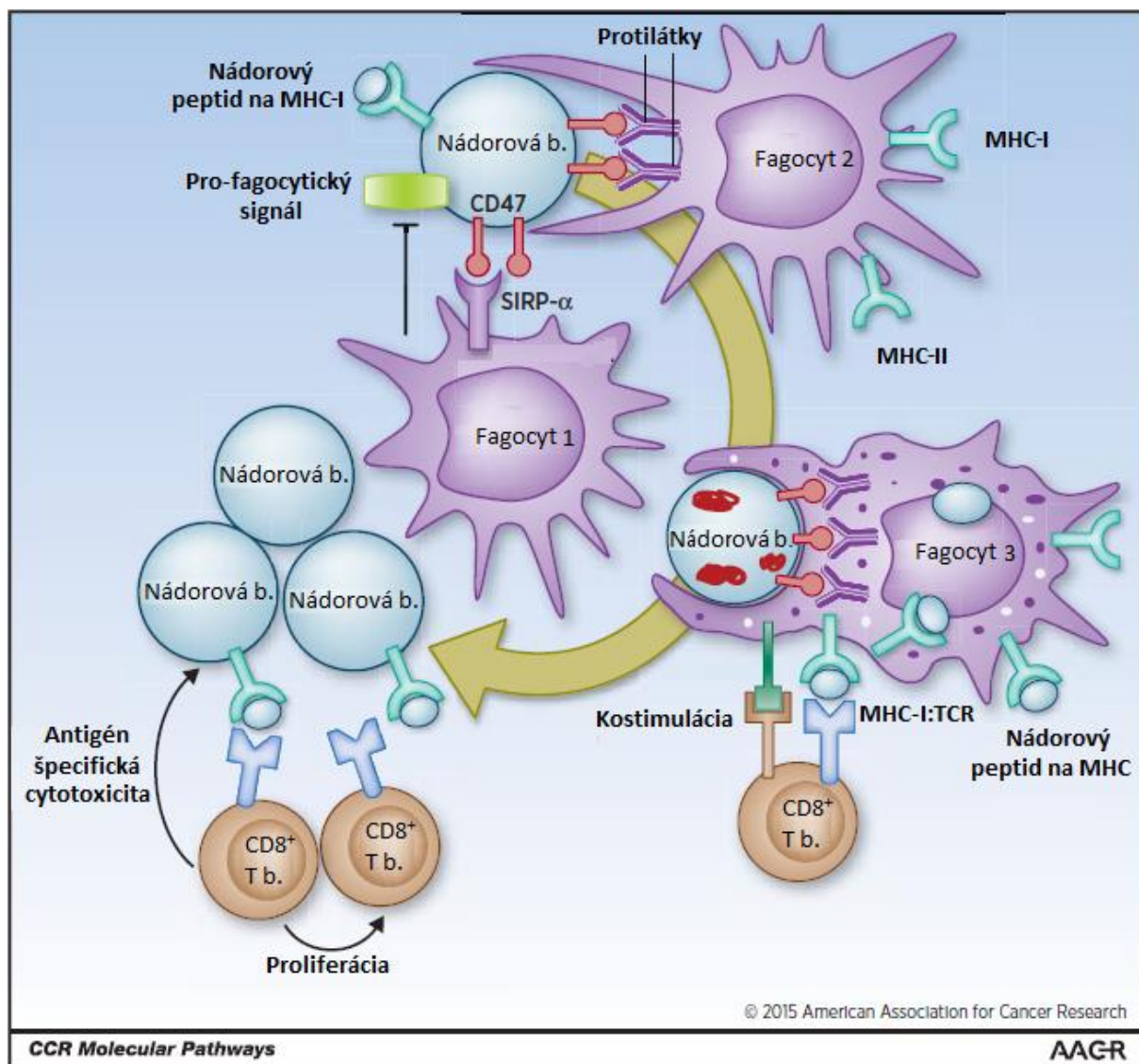
Vyššie spomínaným spôsobom *in vitro* kultivované makrofágy sú schopné zvýšiť proliferáciu transgénnych ovalbumín špecifických CD8⁺ T buniek (ďalej OT-I T buniek) a to v *in vitro*, ale aj *in vivo* podmienkach ([Tseng et al. 2013](#)). Cytotoxicita takto aktivovaných OT-I T buniek proti DLD1-cOVA-GFP bunkám bola overená v *in vivo* modeli. Ten bol pripravený dodaním OT-I T buniek, vyššie popísaným spôsobom kultivovaných makrofágov a DLD1-cOVA-GFP buniek, v uvedenom poradí, do prijímajúcich myší. Objem nádoru 7 až 14 dní po pridaní DLD1-cOVA-GFP buniek bol v kontrolných myšiach (pridané makrofágy boli kultivované za prítomnosti IgG kontrolnej protilátky) minimálny, rozdiel bol počas celej doby štatisticky významný ($p < 0,05$) a po 14 dňoch sa líšil už približne o jeden rád ([Tseng et al. 2013](#)).

Liu et al. potvrdili úlohu CD8⁺ T buniek v anti-CD47 mAb terapii použitím *in vivo* imunokompetentných syngénnych myších modelov ([Liu et al. 2015](#)). Docielili to meraním objemu nádoru po pridaní depletujúcej anti-CD8 protilátky spolu s anti-CD47 mAb a porovnaním s kontrolnou terapiou pozostávajúcou iba z anti-CD47 protilátky ($p < 0,01$) ([Liu et al. 2015](#)). Tým poukázali na nutnosť prítomnosti funkčných CD8⁺ T buniek pre účinok terapie. Pridanie depletujúcej anti-CD4 protilátky v obdobnom experimente nepreukázalo štatisticky významný výsledok ([Liu et al. 2015](#)). To znamená, že funkčné CD4⁺ T bunky nie sú v danom nastavení potrebné pre protinádorový účinok.

Liu et al. ďalej ukázali zvýšenú schopnosť nádor infiltrujúcich DC krížovo prezentovať CD8⁺ T bunkám po anti-CD47 terapii ([Liu et al. 2015](#)). Tá u makrofágov nebola pozorovaná ([Liu et al. 2015](#)). Ďalej ukázali, že zníženie množstva DC odstránilo protinádorový účinok anti-CD47 mAb *in vivo* ([Liu et al. 2015](#)). Avšak zníženie množstva makrofágov nemalo významný účinok na anti-CD47 terapiu ([Liu et al. 2015](#)). Na záver ukázali, že *in vitro* kultivácia DC bez prítomnosti krvného séra (spôsobom, aký použili Tseng et al.) zvyšuje ich apoptózu a narušuje ich funkciu ([Liu et al. 2015](#)), čo mohlo ovplyvniť vyššie citovaný výsledok testu fagocytózy nameraný Tseng et al. Týmto experimentmi Liu et al. preukázali nevyhnutnosť DC pre protinádorový účinok anti-CD47 terapie v *in vivo* modeli a poukázali na možnú príčinu rozporu výsledkov s Tseng et al., ktorí APC indukovali v nefyziologickom *in vitro* systéme.

Série experimentov Tseng et al. a Liu et al. ukazujú, že obidva skúmané typy fagocytov, makrofágy aj DC, sú schopné krížovej prezentácie nádorových peptidov a aktivácie CD8⁺ T bunkovej odpovede, avšak nádor infiltrujúce DC sa javia ako kritický bunkový typ nevyhnutný pre pozitívny účinok blokovania interakcie CD47-SIRP α *in vivo*. CD4⁺ T bunková odpoveď nebola v týchto experimentoch identifikovaná ako významná a preto ani nebola následne skúmaná ([Liu et al. 2015](#); [Tseng et al. 2013](#)).

Z dostupných výsledkov sa dá schematicky navrhnuť princíp účinku blokovania interakcie CD47-SIRP α založenom na aktivácii T bunkovej cytotoxicity (Obrázok 6). Navyše, okrem okamžitej cytotoxickej T bunkovej odpovede, pri tomto blokovaní bola experimentom s opätovným zavedeným nádorových buniek do myši 30 dní po podstúpení úspešnej anti-CD47 terapie preukázaná aj prítomnosť pamäťovej zložky tejto odpovede (v 0 zo 7 myši došlo k opätovnému nádorovému bujneniu oproti 7 zo 7 v kontrolnej vzorke) ([Liu et al. 2015](#)).



Obrázok 6 **Aktivácia T bunkovej cytotoxicity krížovou prezentáciou nádorových antigénov.** Väzba nádorového CD47 na fagocytický SIRP α blokuje pro-fagocytickú signalizáciu nádorovej bunky (Fagocyt 1). Blokovanie tejto väzby (napríklad pomocou protilátok) zvyšuje množstvo fagocytovaných nádorových buniek (Fagocyt 2). Fagocyt je schopný fagocytovanú nádorovú bunku spracovať a následne prezentovať nádorový peptid na MHC-I molekule naivným CD8⁺ T bunkám, ktoré sa týmto spôsobom, za prítomnosti kostimulácie, aktivujú (Fagocyt 3). Aktivované nádor špecifické CD8⁺ T bunky sú schopné proliferácie a antigén špecifickej cytotoxickej aktivity na zostávajúcich nádorových bunkách. Prevzaté od ([McCracken et al. 2015](#)), upravené.

5.3. Alternatívy anti-CD47 mAb

Z dôvodu zvýšenia účinnosti a odstránenia vedľajších účinkov (5.4. Vedľajšie účinky blokovania) sú vyvíjané aj alternatívne spôsoby blokovania tejto interakcie. Jedná sa o blokovanie CD47 pomocou rozpustnej vysokoafinitnej N-koncovej domény SIRP α ([Weiskopf et al. 2013](#)) a blokovanie SIRP α pomocou CD47 peptidu odvodeného od CD47 IgSF domény ([Rodriguez et al. 2013](#)), prípadne celou rozpustnou vysokoafinitnou ektodoménou CD47 ([Ho et al. 2015](#)). V nasledujúcej podkapitole v krátkosti zhrniem vývoj týchto alternatívnych spôsobov blokovania.

Weiskopf et al. použili *in vitro* systém zobrazenia mutovaných N-koncových, 14 kDa ťažkých, IgSF domén SIRP α (reziduá 1 až 118) na povrchu kvasinkových klonov ([Weiskopf et al. 2013](#)). Následne vykonali 10 kôl selekcie mutantov na základe ich schopnosti viazať IgSF doménu CD47. Tým vytvorili varianty FD6 a CV1 s dvanástimi, respektíve deviatimi mutovanými rezíduami. K_D väzby s CD47 určená meraním povrchovou plazmónovou rezonanciou bola 41,3 pM (FD6), respektíve 11,1 pM (CV1) ([Weiskopf et al. 2013](#)). To je zvýšenie afinity o štyri rády oproti klasickej CD47-SIRP α interakcii ($K_D=0,8 \mu\text{M}$). Napriek tomu si variant FD6 zachoval podobnú štruktúru väzby ako má klasická CD47-SIRP α interakcia (Obrázok 4), čo značí, že sa viaže na rovnaký epitop CD47 ako klasický SIRP α ([Weiskopf et al. 2013](#)). Z toho vyplýva, že môže byť jeho efektívnym antagonistom. Následne boli tieto varianty fúzované s protilátkovým Fc (ten poskytuje pro-fagocytický signál) a ich schopnosť indukovať fagocytózu rakovinových buniek *in vitro* bola potvrdená podobným spôsobom ako v predošlých štúdiách (5.1. Makrofágy ako efektoary anti-CD47 terapie) ([Weiskopf et al. 2013](#)). Okrem toho autori preukázali vysokú účinnosť kombinovaných terapií pozostávajúcich z CV1 monoméru a komerčných nádor špecifických protilátok ([Weiskopf et al. 2013](#)). Táto účinnosť bola vyššia ako v prípade monoterapií pomocou spomínaných liečiv ([Weiskopf et al. 2013](#)).

Rodriguez et al. pomocou počítačovej simulácie navrhli 21 aminokyselín dlhý peptid na základe sekvencie okolo slučky medzi F a G β vláknom (Obrázok 3) ([Rodriguez et al. 2013](#)). Tá sa účastní väzby so SIRP α (Obrázok 4, detail). Prichytenie tohto peptidu na povrch nanočastíc inhibuje ich fagocytózu. Počas cirkulácie v NSG myšiach meraný po 40 minútach je v porovnaní s rekombinantným CD47 o 65 % dlhší ([Rodriguez et al. 2013](#)). Afinita určená väzbou biotínovaného peptidu na nanočastice s naviazaným SIRP α a meraná fluorescenciou bivalentnej biotínovej protilátky prietokovou cytometriou stanovila K_D na 0,16 μM ([Rodriguez et al. 2013](#)). To značí 5-násobne zvýšenie afinity oproti klasickej interakcii CD47-SIRP α ($K_D=0,8 \mu\text{M}$). Avšak meranie afinity povrchovou plazmónovou rezonanciou nezistilo schopnosť tohto peptidu viazať SIRP α ([Hatherley et al. 2014](#)). Hatherley et al. sa domnievajú, že nepriama metóda meranie použitá Rodriguezom et al. neposkytuje

kvantitatívne výsledky. Príčinou je pravdepodobne použitie bivalentnej protilátky, ktorá v prípade prítomnosti agregovaného CD47 ovplyvňuje výsledok merania afinity aviditnými efektmi väzby ([Hatherley et al. 2014](#)). Protinádorový účinok vysokoafinitných peptidov nebol skúmaný a preto je potrebný ďalší výskum v tejto oblasti.

Ho et al. vytvorili vysokoafinitnú ektodoménu CD47 N3612 pridaním troch aminokyselín na N-koniec tejto domény, čím zväčšili plochu interakcie so SIRP α ([Ho et al. 2015](#)). Priemerom dvoch experimentov merania afinity povrchovou plazmónovou rezonanciou je K_D stanovená na 1,4 nM, čo značí zvýšenie afinity oproti klasickej interakcii CD47-SIRP α ($K_D=0,8 \mu\text{M}$) o dva rády ([Ho et al. 2015](#)). Autori následne potvrdili jej schopnosť antagonistu klasického CD47 meraním fagocytózy rakovinových buniek *in vitro* ([Ho et al. 2015](#)). Avšak štatisticky významný výsledok bol nameraný iba pri kombinácii s komerčnými, nádor špecifickými protilátkami ([Ho et al. 2015](#)).

CV1 a N3612 vo forme monoméru nedokázali indukovať fagocytózu, pretože neposkytujú pro-fagocytický signál. Poskytnutie tohto signálu komerčnými, nádor špecifickými protilátkami obnovilo účinok terapie ([Weiskopf et al. 2013](#); [Ho et al. 2015](#)) a odstránilo anemický efekt blokovania ([Rodriguez et al. 2013](#)). Vďaka tomu použitie kombinovanej terapie predstavuje riešenie nepriaznivých účinkov tohto blokovania čomu sa venujem v ďalšej podkapitole.

5.4. Vedľajšie účinky blokovania

Mnoho fyziologických funkcií CD47 (1.4. Molekuly CD47 a SIRP α) a vysoká miera expresie CD47 v zdravých tkanivách a bunkových typoch (Obrázok 2) vyvoláva otázku o nežiadúcich vedľajších účinkoch anti-CD47 mierených terapií. Pozorovaná bola anémia v myších modeloch po pridaní anti-CD47 mAb ([Willingham et al. 2012](#)) alebo fúzneho vysokoafinitného SIRP α Fc proteínu ([Weiskopf et al. 2013](#)). Anémia vyvolaná vysokoafinitným fúznym SIRP α Fc proteínom bola pozorovaná aj u primátov ([Weiskopf et al. 2013](#)). Riešením je použitie kombinovanej terapie tohto proteínu vo forme monoméru spolu s nádor špecifickými protilátkami. Kombinovaná terapia zvyšuje účinnosť a odstraňuje anemický účinok ([Weiskopf et al. 2013](#)).

Alternatívnym riešením je použitie SIRP α blokujúcich terapií, napríklad N3612 terapie. Jej *in vivo* toxicita nebola skúmaná.

Avšak aj blokovanie SIRP α môže mať vážne nepriaznivé vedľajšie účinky, napríklad blokovaním dozrievania B lymfocytov v slezine a kostnej dreni ([Kolan et al. 2015](#)). To bolo autormi štúdie nepriamo ukázané cez znížené množstvo zrelých B lymfocytov v krvi, slezine a kostnej dreni myší

s mutovanou SIRP α cytoplazmatickou doménou, zabraňujúcou bunkovej SIRP α signalizácii ([Kolan et al. 2015](#)). Toto zníženie bolo spojené so zvýšenou apoptózou dozrievajúcich B lymfocytov ([Kolan et al. 2015](#)). Okrem toho mali tieto myši približne o tretinu znížené množstvo krvných T lymfocytov ([Kolan et al. 2015](#)).

Doterajší výskum na zvieracích modeloch nezistil žiadnu neprijateľnú toxicitu, ale bezpečnosť a vedľajšie účinky u ľudí dokáže objasniť až klinický výskum, ktorý zhŕňam v nasledujúcej podkapitole.

5.5. Klinické testovanie

Pozitívne výsledky predošlých štúdií posunuli výskum blokovania interakcie CD47-SIRP α do klinického testovania (zhrnuté v Tabuľka 1). Testovanie je v dobe písania tejto práce (16. 8. 2016) v prvej fáze, zameranej na overenie bezpečnosti a určenie tolerancie dávkovania pre ďalšie fázy testovania.

Identifikátor	Klinická fáza	Typ liečiva	Liečivo	Typ rakoviny	Počet pacientov	Rok ukončenia
NCT02678338	1	anti-CD47 mAb	Hu5F9-G4	H	30	2018
NCT02641002	1	anti-CD47 mAb	CC-90002	H	78	2019
NCT02367196	1	anti-CD47 mAb	CC-90002	PN, H	100	2018
NCT02663518	1	SIRP α Fc	TTI-621	H	156	2019

Tabuľka 1 **Prebiehajúce klinické štúdie blokovania interakcie CD47-SIRP α** . Vysvetlivky: H – hematologický, PN – pevné nádory.

Konkrétne, v súčasnosti prebieha nábor pacientov na testovanie anti-CD47 mAb terapií: a/ 30 pacientov neodpovedajúcich na liečbu AML, respektíve ak majú recidívu tohto ochorenia, ktorí budú testovaní na určenie maximálnej tolerovanej dávky ([NCT02678338](#)); b/ 78 pacientov neodpovedajúcich na liečbu AML, respektíve ak majú recidívu tohto ochorenia alebo vysokorizikový myelodysplastický syndróm, ktorí budú testovaní na určenie tolerancie dávkovania, predbežnej účinnosti terapie, farmakokinetiky liečiva a výskyt a frekvenciu protilievkových protilátok ([NCT02641002](#)); c/ 100 pacientov s pokročilými, recidívnymi alebo na liečbu neodpovedajúcimi pevnými nádormi, mnohonásobným myelómom alebo non-Hodgkinovým lymfómom, ktorí budú testovaní na určenie tolerancie dávkovania, predbežnej účinnosti terapie, farmakokinetiky liečiva a výskyt a frekvenciu protilievkových protilátok ([NCT02367196](#)).

Alternatívny spôsob blokovania testuje štúdia s rozpustným rekombinantným fúznym SIRP α Fc proteínom na vzorke 156 pacientov neodpovedajúcich na liečbu lymfómu (alebo inej hematologickej

malignitídy), resp. ak majú recidívu tohto ochorenia. Títo budú testovaní na určenie tolerancie dávkovania, predbežnej účinnosti terapie, farmakokinetiky a bezpečnosti liečiva ([NCT02663518](#)).

Predpokladaná doba ukončenia týchto štúdií je v rokoch 2018-2019. V prípade pozitívnych výsledkov možno očakávať druhú a následne tretiu fázu testovania s postupným zvyšovaním počtu pacientov. Zámerom ďalších fáz testovania je určenie účinnosti, potvrdenie bezpečnosti a monitorovanie vedľajších účinkov terapií pred nasadením do klinickej praxe.

6. Záver

V tejto práci som zhrnul výskum v oblasti blokovania CD47-SIRP α signalizačnej osi ako protinádorovej liečby. Na expresnom profile CD47 som preukázal vysokú mieru expresie tohto proteínu na zdravých i nádorových ľudských bunkách. Štatistickou analýzou výsledkov som preukázal zvýšenie expresie na nádorových bunkách, ale zároveň som diskutoval nedostatočnú výpovednú hodnotu tejto analýzy. Zhrnul som spojitosť medzi klinickým vývojom ochorenia a mierou expresie CD47 na nádorových bunkách. CD47 expresia je zvýšená aj na CSC, avšak jej spojitosť so skutočným diferenciačným potenciálom nádorových buniek sa mi nepodarilo preukázať.

V ďalšej časti práce som opísal štruktúru interakcie CD47-SIRP α , ktorej disociačná konštanta je 0,8 μ M. SIRP α vnútrobunková signalizácia narušuje vytvorenie funkčného cytoskeletu v mieste fagocytickej synapsie defosforyláciou NMM IIA. Avšak presný mechanizmus aktivácie SIRP α pomocou CD47 si zasluhuje ďalší výskum.

Preklinický výskum som zhrnul z pohľadu makrofágov a T buniek. Skutočným protinádorovým mechanizmom anti-CD47 terapie sa javí aktivácia CD8⁺ T buniek pomocou krížovej prezentácie nádor infiltrujúcimi DC. Anti-CD47 mAb produkujú miernu anémiu. Jej riešením je použitie vysokoafinitnej N-koncovej IgSF domény SIRP α CV1, alebo vysokoafinitnej ektodomény CD47 N3612. Tie sú potvrdenými antagonistami prirodzene sa vyskytujúcej väzby. Ich použitie vo forme kombinovanej terapie s komerčnými nádor špecifickými protilátkami sa javí ako najúčinnejší spôsob blokovania.

V nasledujúcich rokoch výsledky prebiehajúcich, prípadne budúcich klinických štúdií ukážu, či interakciu CD47-SIRP α blokujúca liečba je účinná a bezpečná, či dokáže zabrániť recidíve ochorenia a či sa dlhoročné úsilie vedeckej komunity v tejto oblasti výskumu premietne do zdravia vyliečených pacientov.

7. Použitá literatura

BACCELLI, Irène, Andreas SCHNEEWEISS, Sabine RIETHDORF, Albrecht STENZINGER, Anja SCHILLERT, Vanessa VOGEL, Corinna KLEIN, Massimo SAINI, Tobias BÄUERLE, Markus WALLWIENER, Tim HOLLAND-LETZ, Thomas HÖFNER, Martin SPRICK, Martina SCHARPFF, Frederik MARMÉ, Hans Peter SINN, Klaus PANTEL, Wilko WEICHERT a Andreas TRUMPP, 2013. Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. *Nature Biotechnology* [online]. 2013, roč. 31, č. 6, s. 539–544. ISSN 1546-1696. Dostupné na: doi:10.1038/nbt.2576

BARCLAY, A. Neil a Timo K. van den BERG, 2014. The Interaction Between Signal Regulatory Protein Alpha (SIRP α) and CD47: Structure, Function, and Therapeutic Target. *Annual Review of Immunology* [online]. 2014, roč. 32, č. 1, s. 25–50. Dostupné na: doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120142

BROWN, Eric J. a William A. FRAZIER, 2001. Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. *Trends in Cell Biology* [online]. 2001, roč. 11, č. 3, s. 130–135. ISSN 0962-8924. Dostupné na: doi:10.1016/S0962-8924(00)01906-1

CIOFFI, Michele, Sara TRABULO, Manuel HIDALGO, Eithne COSTELLO, William GREENHALF, Mert ERKAN, Joerg KLEEFF, Bruno SAINZ a Christopher HEESCHEN, 2015. Inhibition of CD47 Effectively Targets Pancreatic Cancer Stem Cells via Dual Mechanisms. *Clinical Cancer Research* [online]. 2015, roč. 21, č. 10, s. 2325–2337. ISSN 1078-0432. Dostupné na: doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-1399

CLEVERS, Hans, 2011. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nature Medicine* [online]. 2011, roč. 17, č. 3, s. 313–319. ISSN 1078-8956. Dostupné na: doi:10.1038/nm.2304

EDGAR, Ron, Michael DOMRACHEV a Alex E. LASH, 2002. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Research* [online]. 2002, roč. 30, č. 1, s. 207–210. ISSN 0305-1048, 1362-4962. Dostupné na: doi:10.1093/nar/30.1.207

FLANNAGAN, Ronald S., Valentin JAUMOUILLÉ a Sergio GRINSTEIN, 2012. The cell biology of phagocytosis. *Annual Review of Pathology* [online]. 2012, roč. 7, s. 61–98. ISSN 1553-4014. Dostupné na: doi:10.1146/annurev-pathol-011811-132445

GALLI, Serena, Inti ZLOBEC, Christian SCHÜRCH, Aurel PERREN, Adrian F. OCHSENBEIN a Yara BANZ, 2015. CD47 protein expression in acute myeloid leukemia: A tissue microarray-based analysis. *Leukemia Research* [online]. 2015, roč. 39, č. 7, s. 749–756. ISSN 0145-2126. Dostupné na: doi:10.1016/j.leukres.2015.04.007

HANAHAN, Douglas a Robert A. WEINBERG, 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* [online]. 2011, roč. 144, č. 5, s. 646–674. ISSN 0092-8674. Dostupné na: doi:10.1016/j.cell.2011.02.013

HATHERLEY, Deborah, Stephen C. GRAHAM, Jessie TURNER, Karl HARLOS, David I. STUART a A. Neil BARCLAY, 2008. Paired Receptor Specificity Explained by Structures of Signal Regulatory Proteins Alone and Complexed with CD47. *Molecular Cell* [online]. 2008, roč. 31, č. 2, s. 266–277. ISSN 1097-2765. Dostupné na: doi:10.1016/j.molcel.2008.05.026

HATHERLEY, Deborah, Susan M. LEA, Steven JOHNSON a A. Neil BARCLAY, 2014. Polymorphisms in the Human Inhibitory Signal-regulatory Protein α Do Not Affect Binding to Its Ligand CD47. *Journal of*

Biological Chemistry [online]. 2014, roč. 289, č. 14, s. 10024–10028. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné na: doi:10.1074/jbc.M114.550558

HO, Chia Chi M., Nan GUO, Jonathan T. SOCKOLOSKY, Aaron M. RING, Kipp WEISKOPF, Engin ÖZKAN, Yasuo MORI, Irving L. WEISSMAN a K. Christopher GARCIA, 2015. “Velcro” Engineering of High Affinity CD47 Ectodomain as Signal Regulatory Protein α (SIRP α) Antagonists That Enhance Antibody-dependent Cellular Phagocytosis. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2015, roč. 290, č. 20, s. 12650–12663. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné na: doi:10.1074/jbc.M115.648220

HRUZ, Tomas, Oliver LAULE, Gabor SZABO, Frans WESSENDORP, Stefan BLEULER, Lukas OERTLE, Peter WIDMAYER, Wilhelm GRUISSEM, Philip ZIMMERMANN, Tomas HRUZ, Oliver LAULE, Gabor SZABO, Frans WESSENDORP, Stefan BLEULER, Lukas OERTLE, Peter WIDMAYER, Wilhelm GRUISSEM a Philip ZIMMERMANN, 2008. Genevestigator V3: A Reference Expression Database for the Meta-Analysis of Transcriptomes, Genevestigator V3: A Reference Expression Database for the Meta-Analysis of Transcriptomes. *Advances in Bioinformatics, Advances in Bioinformatics* [online]. 2008, roč. 2008, 2008, s. e420747. ISSN 1687-8027, 1687-8027. Dostupné na: doi:10.1155/2008/420747, 10.1155/2008/420747

CHAN, Keith Syson, Inigo ESPINOSA, Mark CHAO, David WONG, Laurie AILLES, Max DIEHN, Harcharan GILL, Joseph PRESTI, Howard Y. CHANG, Matt VAN DE RIJN, Linda SHORTLIFFE a Irving L. WEISSMAN, 2009. Identification, molecular characterization, clinical prognosis, and therapeutic targeting of human bladder tumor-initiating cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2009, roč. 106, č. 33, s. 14016–14021. ISSN 1091-6490. Dostupné na: doi:10.1073/pnas.0906549106

CHEN, Guokai, Olga ZHUCHENKO a Adam KUSPA, 2007. Immune-like Phagocyte Activity in the Social Amoeba. *Science* [online]. 2007, roč. 317, č. 5838, s. 678–681. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné na: doi:10.1126/science.1143991

JAISWAL, Siddhartha, Mark P. CHAO, Ravindra MAJETI a Irving L. WEISSMAN, 2010. Macrophages as mediators of tumor immunosurveillance. *Trends in immunology* [online]. 2010, roč. 31, č. 6, s. 212–219. ISSN 1471-4906. Dostupné na: doi:10.1016/j.it.2010.04.001

KAUR, Sukhbir, Svetlana A. KUZNETSOVA, Michael L. PENDRAK, John M. SIPES, Martin J. ROMEO, Zhuqing LI, Lijuan ZHANG a David D. ROBERTS, 2011. Heparan Sulfate Modification of the Transmembrane Receptor CD47 Is Necessary for Inhibition of T Cell Receptor Signaling by Thrombospondin-1. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. 2011, roč. 286, č. 17, s. 14991–15002. ISSN 0021-9258. Dostupné na: doi:10.1074/jbc.M110.179663

KOLAN, Shrikant Shantilal, Kristina LEJON, Cecilia Koskinen HOLM, Rima SULNIUTE, Pernilla LUNDBERG, Takashi MATOZAKI a Per-Arne OLDENBORG, 2015. Non-Hematopoietic and Hematopoietic SIRP α Signaling Differently Regulates Murine B Cell Maturation in Bone Marrow and Spleen. *Plos One* [online]. 2015, roč. 10, č. 7, s. e0134113. ISSN 1932-6203. Dostupné na: doi:10.1371/journal.pone.0134113

KOLESNIKOV, Nikolay, Emma HASTINGS, Maria KEAYS, Olga MELNICHUK, Y. Amy TANG, Eleanor WILLIAMS, Mirosław DYLAG, Natalja KURBATOVA, Marco BRANDIZI, Tony BURDETT, Karyn MEGY, Ekaterina PILICHEVA, Gabriella RUSTICI, Andrew TIKHONOV, Helen PARKINSON, Robert PETRYSZAK, Ugis SARKANS a Alvis BRAZMA, 2015. ArrayExpress update—simplifying data submissions. *Nucleic Acids Research* [online]. 2015, roč. 43, č. D1, s. D1113–D1116. ISSN 0305-1048, 1362-4962. Dostupné na: doi:10.1093/nar/gku1057

KWONG, Lai Shan, Marion H BROWN, A Neil BARCLAY a Deborah HATHERLEY, 2014. Signal-regulatory protein α from the NOD mouse binds human CD47 with an exceptionally high affinity – implications for engraftment of human cells. *Immunology* [online]. 2014, roč. 143, č. 1, s. 61–67. ISSN 0019-2805. Dostupné na: doi:10.1111/imm.12290

LASCORZ, Jesús, Melanie BEVIER, Witigo V SCHÖNFELS, Holger KALTHOFF, Heiko ASELMANN, Jan BECKMANN, Jan EGBERTS, Stephan BUCH, Thomas BECKER, Stefan SCHREIBER, Jochen HAMPE, Kari HEMMINKI, Clemens SCHAFMAYER a Asta FÖRSTI, 2013. Association study identifying polymorphisms in CD47 and other extracellular matrix pathway genes as putative prognostic markers for colorectal cancer. *International Journal Of Colorectal Disease* [online]. 2013, roč. 28, č. 2, s. 173–181. ISSN 1432-1262. Dostupné na: doi:10.1007/s00384-012-1541-4

LINDBERG, F. P., H. D. GRESHAM, E. SCHWARZ a E. J. BROWN, 1993. Molecular cloning of integrin-associated protein: an immunoglobulin family member with multiple membrane-spanning domains implicated in alpha v beta 3-dependent ligand binding. *The Journal of Cell Biology* [online]. 1993, roč. 123, č. 2, s. 485–496. ISSN 0021-9525, 1540-8140. Dostupné na: doi:10.1083/jcb.123.2.485

LIU, Xiaojuan, Yang PU, Kyle CRON, Liufu DENG, Justin KLINE, William A. FRAZIER, Hairong XU, Hua PENG, Yang-Xin FU a Meng Michelle XU, 2015. CD47 blockade triggers T cell-mediated destruction of immunogenic tumors. *Nature Medicine* [online]. 2015, roč. 21, č. 10, s. 1209–+. ISSN 1078-8956. Dostupné na: doi:10.1038/nm.3931

LO, Jessica, Eunice Yuen Ting LAU, Rachel Hiu Ha CHING, Bowie Yik Ling CHENG, Mark Kin Fai MA, Irene Oi Lin NG a Terence Kin Wah LEE, 2015. Nuclear factor kappa B-mediated CD47 up-regulation promotes sorafenib resistance and its blockade synergizes the effect of sorafenib in hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology* [online]. 2015, roč. 62, č. 2, s. 534–545. ISSN 1527-3350. Dostupné na: doi:10.1002/hep.27859

MAJETI, Ravindra, Mark P. CHAO, Ash A. ALIZADEH, Wendy W. PANG, Siddhartha JAISWAL, Kenneth D. GIBBS, Nico VAN ROOIJEN a Irving L. WEISSMAN, 2009. CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell* [online]. 2009, roč. 138, č. 2, s. 286–299. ISSN 0092-8674. Dostupné na: doi:10.1016/j.cell.2009.05.045

MCCRACKEN, Melissa N., Adriel C. CHA a Irving L. WEISSMAN, 2015. Molecular Pathways: Activating T Cells after Cancer Cell Phagocytosis from Blockade of CD47 “Don’t Eat Me” Signals. *Clinical Cancer Research* [online]. 2015, roč. 21, č. 16, s. 3597–3601. ISSN 1078-0432. Dostupné na: doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2520

MEACHAM, Corbin E. a Sean J. MORRISON, 2013. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature* [online]. 2013, roč. 501, č. 7467, s. 328–337. ISSN 0028-0836. Dostupné na: doi:10.1038/nature12624

REBRES, Robert A., Louise E. VAZ, Jennifer M. GREEN a Eric J. BROWN, 2001. Normal Ligand Binding and Signaling by CD47 (Integrin-associated Protein) Requires a Long Range Disulfide Bond between the Extracellular and Membrane-spanning Domains. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2001, roč. 276, č. 37, s. 34607–34616. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné na: doi:10.1074/jbc.M106107200

REINHOLD, M. I., F. P. LINDBERG, D. PLAS, S. REYNOLDS, M. G. PETERS a E. J. BROWN, 1995. In vivo expression of alternatively spliced forms of integrin-associated protein (CD47). *Journal of Cell Science*. 1995, roč. 108 (Pt 11), s. 3419–3425. ISSN 0021-9533.

REYA, Tannishtha, Sean J. MORRISON, Michael F. CLARKE a Irving L. WEISSMAN, 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* [online]. 2001, roč. 414, č. 6859, s. 105–111. ISSN 0028-0836. Dostupné na: doi:10.1038/35102167

ROBERTS, David D., Thomas W. MILLER, Natasha M. ROGERS, Mingyi YAO a Jeffrey S. ISENBERG, 2012. The Matricellular Protein Thrombospondin-1 Globally Regulates Cardiovascular Function and Responses to Stress via CD47. *Matrix Biology* [online]. 2012, roč. 31, č. 3, s. 162–169. ISSN 0945-053X. Dostupné na: doi:10.1016/j.matbio.2012.01.005

RODRIGUEZ, Pia L., Takamasa HARADA, David A. CHRISTIAN, Diego A. PANTANO, Richard K. TSAI a Dennis E. DISCHER, 2013. Minimal “Self” Peptides That Inhibit Phagocytic Clearance and Enhance Delivery of Nanoparticles. *Science* [online]. 2013, roč. 339, č. 6122, s. 971–975. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné na: doi:10.1126/science.1229568

SOTO-PANTOJA, David R., Erica V. STEIN, Natasha M. ROGERS, Maryam SHARIFI-SANJANI, Jeffrey S. ISENBERG a David D. ROBERTS, 2013. Therapeutic opportunities for targeting the ubiquitous cell surface receptor CD47. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* [online]. 2013, roč. 17, č. 1, s. 89–103. ISSN 1472-8222. Dostupné na: doi:10.1517/14728222.2013.733699

TSAI, Richard K. a Dennis E. DISCHER, 2008. Inhibition of “self” engulfment through deactivation of myosin-II at the phagocytic synapse between human cells. *The Journal of Cell Biology* [online]. 2008, roč. 180, č. 5, s. 989–1003. ISSN 0021-9525. Dostupné na: doi:10.1083/jcb.200708043

TSENG, Diane, Jens-Peter VOLKMER, Stephen B. WILLINGHAM, Humberto CONTRERAS-TRUJILLO, John W. FATHMAN, Nathaniel B. FERNHOFF, Jun SEITA, Matthew A. INLAY, Kipp WEISKOPF, Masanori MIYANISHI a Irving L. WEISSMAN, 2013. Anti-CD47 antibody-mediated phagocytosis of cancer by macrophages primes an effective antitumor T-cell response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2013, roč. 110, č. 27, s. 11103–11108. ISSN 1091-6490. Dostupné na: doi:10.1073/pnas.1305569110

VESELY, Matthew D., Michael H. KERSHAW, Robert D. SCHREIBER a Mark J. SMYTH, 2011. Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. *Annual Review of Immunology* [online]. 2011, roč. 29, č. 1, s. 235–271. Dostupné na: doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101324

WEISKOPF, Kipp, Aaron M. RING, Chia Chi M. HO, Jens-Peter VOLKMER, Aron M. LEVIN, Anne Kathrin VOLKMER, Engin OEZKAN, Nathaniel B. FERNHOFF, Matt VAN DE RIJN, Irving L. WEISSMAN a K. Christopher GARCIA, 2013. Engineered SIRP alpha Variants as Immunotherapeutic Adjuvants to Anticancer Antibodies. *Science* [online]. 2013, roč. 341, č. 6141, s. 88–91. ISSN 0036-8075. Dostupné na: doi:10.1126/science.1238856

WILLINGHAM, Stephen B., Jens-Peter VOLKMER, Andrew J. GENTLES, Debashis SAHOO, Piero DALERBA, Siddhartha S. MITRA, Jian WANG, Humberto CONTRERAS-TRUJILLO, Robin MARTIN, Justin D. COHEN, Patricia LOVELACE, Ferenc A. SCHEEREN, Mark P. CHAO, Kipp WEISKOPF, Chad TANG, Anne Kathrin VOLKMER, Tejaswitha J. NAIK, Theresa A. STORM, Adriane R. MOSLEY, Badreddin EDRIS, Seraina M. SCHMID, Chris K. SUN, Mei-Sze CHUA, Oihana MURILLO, Pradeep RAJENDRAN, Adriel C. CHA, Robert K. CHIN, Dongkyoon KIM, Maddalena ADORNO, Tal RAVEH, Diane TSENG, Siddhartha JAISWAL, Per Øyvind ENGER, Gary K. STEINBERG, Gordon LI, Samuel K. SO, Ravindra MAJETI, Griffith R. HARSH, Matt VAN DE RIJN, Nelson N. H. TENG, John B. SUNWOO, Ash A. ALIZADEH, Michael F. CLARKE a Irving L. WEISSMAN, 2012. The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPa) interaction is a therapeutic target for human solid tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2012, roč. 109, č. 17, s. 6662–6667. ISSN 1091-6490. Dostupné na: doi:10.1073/pnas.1121623109

XU, Ji-Feng, Xiao-Hong PAN, Shui-Jun ZHANG, Chen ZHAO, Bin-Song QIU, Hai-Feng GU, Jian-Fei HONG, Li CAO, Yu CHEN, Bing XIA, Qin BI a Ya-Ping WANG, 2015. CD47 blockade inhibits tumor progression human osteosarcoma in xenograft models. *Oncotarget*. 2015, roč. 6, č. 27, s. 23662–23670. ISSN 1949-2553.

YOSHIDA, Kazumichi, Hironori TSUJIMOTO, Kouji MATSUMURA, Manabu KINOSHITA, Risa TAKAHATA, Yusuke MATSUMOTO, Shuichi HIRAKI, Satoshi ONO, Shuhji SEKI, Junji YAMAMOTO a Kazuo HASE, 2015. CD47 is an adverse prognostic factor and a therapeutic target in gastric cancer. *Cancer Medicine* [online]. 2015, roč. 4, č. 9, s. 1322–1333. ISSN 2045-7634. Dostupné na: doi:10.1002/cam4.478

ZHANG, Huimin, Haiquan LU, Lisha XIANG, John W. BULLEN, Chuanzhao ZHANG, Debangshu SAMANTA, Daniele M. GILKES, Jianjun HE a Gregg L. SEMENZA, 2015. HIF-1 regulates CD47 expression in breast cancer cells to promote evasion of phagocytosis and maintenance of cancer stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2015, roč. 112, č. 45, s. E6215–E6223. ISSN 0027-8424. Dostupné na: doi:10.1073/pnas.1520032112

Klinické štúdie

NCT02367196. *clinicaltrials.gov* [online]. Dostupné na: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02367196> (prístup 16. 8. 2016)

NCT02641002. *clinicaltrials.gov* [online]. Dostupné na: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02641002> (prístup 16. 8. 2016)

NCT02663518. *clinicaltrials.gov* [online]. Dostupné na: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02663518> (prístup 16. 8. 2016)

NCT02678338. *clinicaltrials.gov* [online]. Dostupné na: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02678338> (prístup 16. 8. 2016)

Webové stránky a dokumenty

GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array | Affymetrix. *Affymetrix.com* [online]. Dostupné na : <http://www.affymetrix.com/catalog/131455/AFFY/Human+Genome+U133+Plus+2.0+Array> (prístup 16. 8. 2016)

Geneinvestigator® user manual. *Geneinvestagor.com* [online]. Dostupné na: https://geneinvestigator.com/gv/file/GENEVESTIGATOR_UserManual.pdf (prístup 16. 8. 2016)

Tissue expression of CD47 - Summary - The Human Protein Atlas. *V15.proteinatlas.org* [online]. Dostupné na: <http://v15.proteinatlas.org/ENSG00000196776-CD47> (prístup 16. 8. 2016)

Welch's t-test. *Wikipedia* [online]. Dostupné na: https://en.wikipedia.org/wiki/Welch%27s_t-test (prístup 16. 8. 2016)