

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA



Imunogenní buněčná smrt a její aplikace v imunoterapeutických protokolech

Dizertace

PharmDr. Jitka Fučíková

Postgraduální studium biomedicíny
Oborová rada: Imunologie

Školitel: Doc. MUDr. Radek Špišek, PhD.

Praha 2011

Prohlašuji, že jsem tuto disertační práci vypracovala samostatně s uvedením použité literatury. Dále prohlašuji, že tato práce ani její jednotlivé části nebyly použity k získání stejného ani jiného akademického titulu.

Praha 2011

Jitka Fučíková

Podkování

Děkuji svému školiteli Doc. MUDr. Radku Špiškoví, PhD. za odborné vedení, pomoc při psaní manuskriptů a zaslání do laboratorních metod. Celému kolektivu pracovníků Ústavu Imunologie děkuji za výjimečné přátelské prostředí, pomoc při provádění experimentů a cennou diskusi ohledně řešených projektů.

Dále bych chtěla podkovat všechny členy Laboratoře molekulární genetiky a Laboratoře protokové cytometrie pracovní skupiny CLIP na Klinice dětské hematologie FN Motol za technické zázemí, cenné rady a vstřícnost.

Speciální podkování za podporu, důvěru a lásku patří mé rodině a zejména Petrovi.

Obsah

1.	Úvod	8
2.	Role imunitního systému v obraně proti nádorům	9
2.1.	Vývojové aspekty souvisejících znalostí o vztahu imunitního systému a nádor	9
2.2.	„Cancer immune editing“ – editace nádoru imunitním systémem	10
2.3.	Stimulace nádorového onemocnění imunitním systémem	12
3.	Základní charakteristiky nádorových buněk	13
3.1.	Nádorové antigeny	13
3.2.	Autokrinní stimulace	15
3.3.	Schopnost neodpovídat na protirakovinné signály	15
3.4.	Schopnost inhibovat apoptózu	15
3.5.	Neomezená schopnost se dělit	16
3.6.	Invazivita do okolních tkání a zakládání metastáz	16
3.7.	Mechanismy úniku nádorových buněk před imunitním systémem	16
4.	Interakce mrtvých nádorových buněk s buňkami imunitního systému	17
4.1.	Imunogenní buněčná smrt	17
4.2.	Molekulární parametry imunogenní buněčné smrti	19
4.2.1.	Heat shock proteiny	20
4.2.2.	Calreticulin.....	21
4.2.3.	Zánětlivé cytokiny uvolňované nádorovými buňkami	22
4.2.4.	High mobility group box 1	23
4.2.5.	Kyselina močová	23
4.2.6.	Degradace produktů pozdní fáze buněčné smrti s prozánětlivými vlastnostmi	24
4.2.7.	Aktivace p53 v nádorových buňkách	24
5.	Imunoterapie.....	26
5.1.	Základní typy imunoterapeutických protokolů	27
5.2.	Racionální přístup k imunoprevenci	27
5.3.	Imunoprevence nádorových onemocnění a její klinická aplikace	28
6.	Imunoterapie dendritickými buňkami	29
6.1.	Základní charakteristiky a životní cyklus dendritických buněk	29
6.2.	Diferenciace dendritických buněk in vitro	30
6.3.	Historie imunoterapie založené na dendritických buňkách	30
6.4.	Protokol vakcinace dendritickými buňkami	30
6.5.	Aspekty přípravy vakcín z dendritických buněk	31
6.6.	Vliv maturationálního stavu dendritických buněk na účinnost vakcín	32
6.7.	Klinická aplikace vakcín	33
6.8.	Budoucnost DC vakcín v imunoterapii.....	34
7.	Cíle práce	36

8.	Výsledky a diskuze	38
8.1.	Imunoterapeutický protokol založený na dendritických buňkách generovaných v CellGro a aktivovaných pomocí PolyI:C	39
8.2.	Lidské nádorové buňky ošetřené antracykliny indukují protinádorovou specifickou imunitní odpověď	64
8.3.	Kombinovaná chemo-imunoterapie v léčbě hormon-refrakterního metastazujícího karcinomu prostaty	78
9.	Závěr	88
10.	Seznam citované literatury	90
11.	Seznam vlastních publikací	104

Seznam zkratek

ADCC	protilátkou zprostředkovaná buněčná toxicita
AFP	alfa-fetoprotein
APAF-1	název proteinu „apoptotic protease-activating factor-1“
APC	antigen prezentující buňky
CCL	chemokin
CCR	chemokinový receptor
CEA	karcino-embryonální antigen
CRT	calreticulin
CT	cancer-testis antigeny
CTL	cytotoxické T lymfocyty
DC	dendritické buňky
DISC	„death inducing signalling complex“
DU145	název pro lidskou nádorovou prostatickou linii
ER	endoplazmatické retikulum
FDA	food and drug association
GM-CSF	granulocytární-makrofágový kolonie stimulující faktor
HLA	„human leukocyte antigen“, lidský leukocytární antigen
HMGB1	„high mobility group box 1“
HSP	proteiny teplotního šoku
IAP	inhibitory apoptotických proteinů
IFN-	interferon gamma
IL	interleukin
LNCap	název pro lidskou nádorovou prostatickou linii
LPS	lipopolysacharid
MHC I	hlavní histokompatibilní komplex I
NK	„natural killers“, přirozený zabíječ
OV90	název pro lidskou nádorovou ovariální linii
PGE	prostaglandin
PolyI:C	polyinosinová-polycytidylová kyselina
REH	název pro nádorovou linii lidské T-ALL
TAA	antigeny asociované s nádory

T-ALL	lidská akutní lymfocytární leukémie
Tc	cytotoxické T lymfocyty
TGF-	transformující r stový faktor
Th	pomocné T lymfocyty
TLR	toll like receptor
TNF	faktor způsobující nekrózu nádor
TSTA	nádorově specifické transplantační antigeny

1. Úvod

Jeden z nejvýznamnějších úspěchů imunologie a moderní medicíny představuje eradikace neštovic zavedením preventivních očkovacích programů roku 1798 Edwardem Jennerem (Ada, 2001). A koliv je primární funkcí imunitního systému ochrana před patogeny, úspěch vakcinace proti infekčním chorobám vedl ke snahám o využití imunitního systému také v boji proti nádorovým onemocněním. Poznání klíčové role dendritických buněk v procesu zahájení imunitní reakce a možnost jejich produkce ve velkém množství *in vitro* vedly k úvahám o jejich využití v imunoterapii nádorových onemocnění. Zavedení buněčné terapie do klinické praxe však podléhá administrativním opatřením, celý postup produkce musí probíhat v podmínkách správné výrobní praxe na základě schválení regulací autoritami. Přestože jsou teoretické předpoklady nejlepší účinnosti vakcinace v různých stádiích onemocnění, v klinické praxi se aplikace imunoterapie, jakožto nové léčebné metody, omezuje spíše na pokročilá stadia onemocnění. V těchto případech je pak potřeba kombinovat imunoterapii s chemoterapií, která je standardem léčebné péče. Ukazuje se však, že imunoterapie a chemoterapie mohou být navzájem potencující se modalitami. Příspěvkem mé disertační práce do problematiky protinádorové imunoterapie je optimalizace protokolu výroby dendritických buněk z krevních monocytů za podmínek správné výrobní praxe. Výsledky této publikované práce byly součástí farmaceutické dokumentace, která vedla ke schválení výrobního postupu i klinické studie u pacientů s karcinomem prostaty regulacími autoritami. Další práce se zabývá testováním imunogenicity lidských primárních nádorových buněk a nádorových linií, u nichž byla navozena buněčná smrt klinicky používanými chemoterapeutiky. Výsledky této *in vitro* studie korelují s daty získanými na myších modelech. Ty definují antracykliny jako chemoterapeutika schopná navodit imunogenní buněčnou smrt u nádorových buněk. Těmto příspěvkem je shrnutí principu chemo-imunoterapie na kazuistice konkrétního pacienta s karcinomem prostaty, u něhož byl tento postup aplikován. Tyto tři publikace tvoří základ disertační práce.

2. Role imunitního systému v obraně proti nádorům

2.1. Vývojové aspekty souvisejících znalostí o vztahu imunitního systému a nádor

Zásadní pro racionální využití imunitního systému v léčbě nádorů je předpoklad, že imunitní systém je schopen rozpoznat neoplastické buňky a zničit je dříve, než se projeví jako klinicky závažné onemocnění. Nádorové buňky exprimují na svém povrchu antigenní struktury, které se na jiných buněčných typech nevyskytují vůbec, nebo pouze ve velmi malé míře. Tčto tzv. nádorově specifických, resp. asociovaných antigenů je již popsáno velké množství. Problémem však je, že nádorové buňky samy nemohou fungovat jako antigen prezentující buňky, jelikož na svém povrchu neexprimují kostimulační molekuly. Další úskalí představuje fakt, že nádorové buňky disponují celou řadou mechanismů, pomocí nichž jsou schopné uniknout imunitnímu systému.

Myšlenka, že imunitní systém je schopen rozeznat nádorové bujení a odpovídat na něj, byla poprvé formulována na počátku dvacátého století americkým chirurgem W. Coleyem, jenž zaznamenal regresí nádorů v průběhu bakteriálních infekcí (Coley, 1898). V roce 1950 byly publikovány studie, které ukázaly, že inbrední myši mohou být imunizovány proti nádorům indukovaným karcinogeny a že protilátky vytvořené proti odvrženému tumoru byly specifické. Tyto objevy vedly v roce 1957 k formulaci hypotézy o protinádorovém imunitním dohledu. Hypotéza byla vyslovena Thomasem a Burnetem a hovořila o existenci ochranných buněk z thymu, které monitorují přítomnost transformovaných nádorových buněk (Burnet *et al.*, 1970).

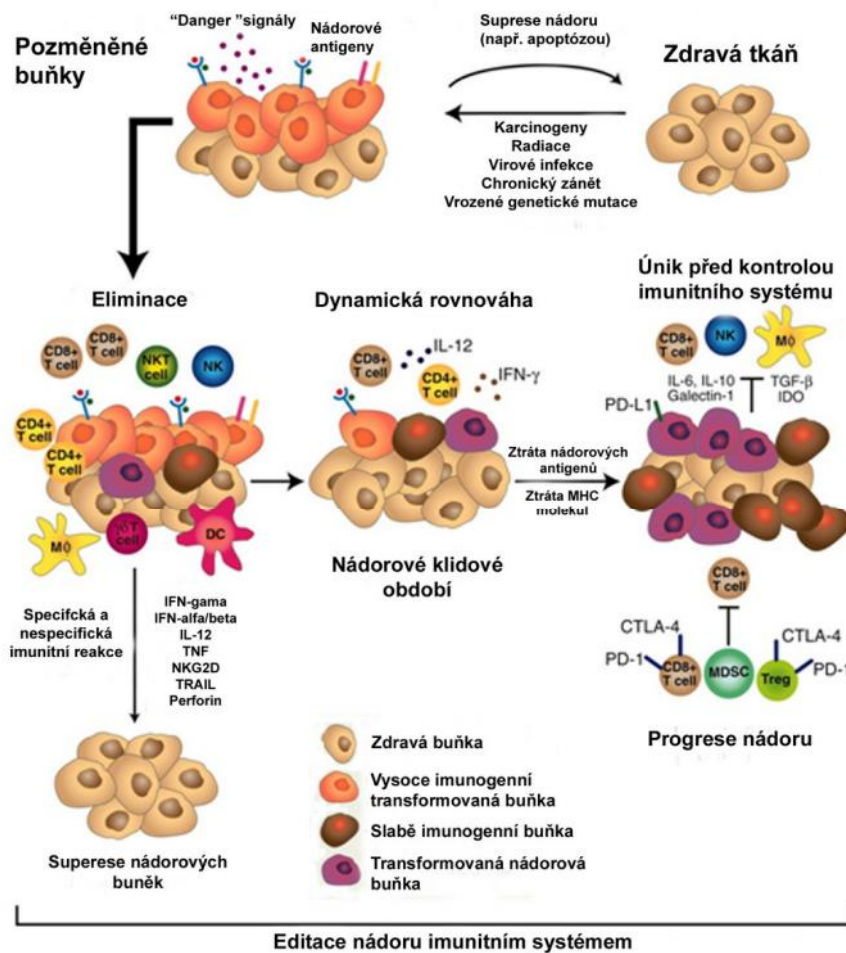
Rozhodující důkazy o roli imunitního systému v obraně proti nádorům poskytly studie na myších bez funkčních genů pro rekombinaci T a B buněčných receptorů RAG-1 a RAG-2 (RAG^{-/-}). RAG^{-/-} myši vyvíjejí chemicky indukované nádory rychleji a s vyšší frekvencí než imunokompetentní kontroly, ale také tvoří mnohem více spontánních tumorů, pokud experiment probíhá delší dobu (Shankaran *et al.*, 2001).

Analogické studie na dalších myších modelech identifikovaly roli dalších buněčných komponent imunitního systému v prevenci nádorového onemocnění. Selektivní eliminace NK buněk u myší, jimž byly podány anti-asialo-GM1 protilátky, je inítkrát vnímavější k chemicky indukovaným tumorům (Smyth *et al.*, 2011). Podobný kmen myší, které nemají NKT buňky, má vyšší incidenci chemicky indukovaných tumorů (Smyth *et al.*, 2000; Smyth *et al.*, 2001; Street *et al.*, 2001).

Dalším příkladem jsou studie Roberta Schreibera na univerzitě ve Washingtonu, jež hovoří o zásadní roli interferonu- γ v imunitním dohledu (Kaplan *et al.*, 1998). Ztráta funkce IFN- γ pomocí neutralizace monoklonálními protilátkami nebo pomocí genetické manipulace zvyšuje vnímavost k chemicky indukovaným i spontánním nádorům (Dighe *et al.*, 1994). IFN- γ podporuje tvorbu antigen-specifických CD4⁺ Th1 buněk a cytotoxických T lymfocytů (CTL), podporuje aktivaci dendritických buněk a makrofágů a inhibuje angiogenezi (Bach *et al.*, 1997; Hayakawa *et al.*, 2002). Dokonce samotné nádorové buňky se ukázaly být významným buněčným cílem účinku IFN- γ , protože tento cytokin indukuje zvýšení exprese některých složek MHC I (hlavní histokompatibilní komplex I) (Wong *et al.*, 1997). V dalších experimentech byl jako důležitá molekula protinádorové obrany identifikován také perforin (van den Broek *et al.*, 1996).

2.2. „Cancer immune editing“ – editace nádoru imunitním systémem

Převodní teorie Thomase a Burneta byla brzy rozšířena novými poznatky získanými na imunodeficientních myších modelech RAG. Jde o hypotézu Dunna *et al.*, nazvanou „Cancer immune Editing“, tj. editace nádoru imunitním systémem (Dunn *et al.*, 2004). Pokusy ukazují významné rozdíly v imunogenitě nádorů v závislosti na hostiteli, ve které rostly (Shankaran *et al.*, 2001). Pokud byl tumor, izolovaný z RAG-2^{-/-} myši bez funkčního imunitního systému, transplantován do myši stejného kmene, rostl se stejnou kinetikou. Přenos nádoru rostoucího v imunokompetentní myši do kontrolní myši téhož kmene také vedl k rychlé implantaci a rozvoji všech tumorů. Zajímavé a nečekané je ovšem zjištění, že 50 % tumorů rostoucích v RAG-2^{-/-} imunokompetentní myši do kontrolní myši bylo odvrženo po přenosu do imunokompetentního hostitele. Nádory rostoucí v nepřítomnosti funkčního imunitního systému, jsou tedy více imunogenní než tumory vytvořené v imunokompetentních hostitelích. Tyto výsledky ukazují, že imunitní systém vyvíjí na nádorové buňky neustálý selekční tlak, který vede k selekci takových variant transformovaných buněk, které dokáží uniknout efektorovým mechanismům imunitního systému. Dunn odlišuje tři odlišné úrovně boje imunitního systému proti nádorovým buňkám – eliminaci transformované buňky (elimination), ustanovení rovnováhy mezi transformovanou buňkou a organismem (equilibrium) a únik transformované buňky před kontrolou imunitního systému (escape) (obr.1).



Upraveno podle Schreiber RD et al, Science 2011

Obr. 1 Teorie protinádorového dohledu, editace nádoru imunitním systémem a klinický korelát jednotlivých stádií

Ve většině případů je nádorová buňka rozpoznána v raných stádiích transformace a zničena imunitním systémem. Celý proces však může skončit nebo přejít do dalších fází. Ve fázi ustanovení rovnováhy hostitelský imunitní systém a přežívající nádorové buňky vcházejí do stadia dynamické rovnováhy. Nesmírná plasticita nádorových buněk, vyplývající z rostoucí genetické nestability, dává nakonec vzniknout novým genotypům, které zmenší imunogenicitu a může dojít k fázi úniku této buňky před vlivem imunitního systému. Fáze ustanovení rovnováhy je nejdelší z těchto procesů a klinicky se nejvíce shoduje s preneoplastickým onemocněním, které nejprve zůstává nedagnostikované. Výsledkem stadia rovnováhy mohou být tři různé situace: 1. kompletní eliminace

nádorových buněk; 2. dlouhodobé udržení dynamické rovnováhy mezi aktivní imunitní odpovědí a vymezenou populací nádorových buněk; 3. únik před kontrolou imunitní reakce a rozvoj klinického onemocnění.

Pokud imunitní systém nádorové bučky rozpozná, bojuje proti nim všemi hlavními imunitními mechanismy, a to jak nespecifickými (neutrofilní granulocyty, aktivované makrofágy, NK bučky („natural killers“, přirozeně zabíječi)), tak specifickými (T_{H1} a T_C bučky, protilátky aktivující komplement nebo protilátky zprostředkávající buněčnou toxicitu („antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity“, ADCC)).

2.3. Stimulace nádorového onemocnění imunitním systémem

Skutečnost, že zánět je silně propojený s nádorovým onemocněním, je v dnešní době již dobře známým faktem. Zejména zánět chronicky přispívá k rozvoji nádorového onemocnění.

Tato zjištění však nepopírají hypotézu imunitního dohledu. Specifická imunitní odpověď namířená proti nádorovým bučkám má vést k jejich eliminaci, zatímco chronický zánět udržovaný přetrvávající virovou infekcí nebo dlouhodobou expozicí karcinogenem vede k produkci cytokinů, chemokinů, růstových faktorů a ke zvýšení genetické nestability (Hussain SP *et al.*, 2003). Zároveň se uvažuje o možnosti, že chronický zánět potlačuje specifickou imunitní odpověď proti nádorovému onemocnění. Změny v nádorovém mikroprostředí patří mezi hlavní předpoklady imunoterapie v léčbě nádorového onemocnění.

3. Základní charakteristiky nádorových buněk

3.1. Nádorové antigeny

K maligní transformaci buňky může dojít mnoha způsoby. Většinou jde o důsledky selhání mechanismů regulace buněčného dělení. Tyto poruchy vyvolávají nejčastěji mutace v onkogenech a anti-onkogenech. Nádorové buňky se vyvíjejí z buněk organismu vlastních, od kterých se liší expresí nádorových antigenů. Základní předpoklad pro interakci imunitního systému s nádorovou buňkou je existence nádorově specifických povrchových antigenů, jež by umožnily rozpoznání nádorových buněk. Navzdory této skutečnosti nádorové buňky imunitnímu systému unikají, díky malé odlišnosti od zdravých buněk.

V roce 1943 Gross ověřil, že sarkomy indukované chemickými karcinogeny na myším modelu jsou schopny vyvolávat imunitní reakce. Později bylo zjištěno, že tyto imunitní reakce vznikají, jak proti nádorům indukovaným působením karcinogenů (chemických i fyzikálních), tak i proti nádorům vznikajícím bez umělé indukce (Kripke, 1974; Srivastava a Old, 1988). Tyto výsledky vedly ke vzniku teorie, že nádory bez ohledu na způsob svého vzniku, exprimují jediné nebo několik nádorových antigenů, které umožňují jejich rozpoznání a následnou eliminaci (Srivastava a Old, 1988).

Buněčné proteiny, z kterých jsou odvozovány nádorové antigeny, jsou si u myši a lidí vzájemně podobné. V současné době je identifikována řada lidských nádorových antigenů, což umožnil zejména výzkum na inbredních myších liniích. Nádorové antigeny jsou u myši většinou nádorově a individuálně specifické, zatímco u člověka je známo několik sdílených, univerzálních antigenů.

Cílem je hledat takové nádorové antigeny, které: jsou intenzivně exprimovány v různých nádorech, ale minimálně ve zdravých tkáních; jsou nepostradatelné v procesu karcinogeneze, a to nejlépe v pozdních stádiích; obsahují co nejvíce imunogenních epitopů s vysokou afinitou k HLA systému; jsou rozpoznávány T buňkami schopnými vyvolat imunitní odpověď; obsahují epitopy, které jsou přirozeně zpracovávány v proteasomu nádorové buňky (Schultze a Vonderheide, 2001).

Jak bylo zmíněno v úvodu této kapitoly, a koliv nádorové buňky pocházejí z vlastních tkání, vystavují často na buněném povrchu mutacemi změněné molekuly, nádorové antigeny. Tyto antigeny mohou, ale nemusí souviset s maligní transformací. Nádorové antigeny, lze rozdělit do čtyř základních skupin:

- **Produkty mutovaných onkogen a supresorových genů nádor**

Takto změněné proteiny vznikají bodovými mutacemi, delecemi a chromozomálními translokacemi nebo inzercí virových genomů do proto-onkogenů a supresorových genů nádor (Novellino *et al.*, 2005). Vznikají tak proteiny se zcela odlišnou funkcí a nádorově specifické. V roce 1996 Dudley a Roopenian upozornili na významnou imunogenitu takto vzniklých proteinů u myších modelů.

- **Produkty dalších mutovaných genů**

Tato skupina proteinů není přímo zodpovědná za malignitu buňky, pouze maligní transformaci doprovází. Do této skupiny patří například tumor-specifické transplantátové antigeny (TSTA), které se vyskytují u chemicky indukovaných nádorů.

- **Antigeny kódované geny onkogenních DNA a RNA virů**

Jedná se o produkty virových genů, které jsou exprimovány v nádorech asociovaných s virovou infekcí. Proteiny tumorogenních virů jsou velmi specifické a mimo zmíněné nádory se nevyskytují. Aminokyselinová sekvence těchto proteinů je díky jejich postupu zpravidla známá a je tedy možné je za účelem detailního prozkoumání synteticky vyrábět.

- **Embryonální proteiny (onkofetální antigeny)**

V této skupině antigenů nacházíme zejména proteiny, které jsou produkovány během embryonálního života a u dospělých se s nimi setkáváme ve zvýšeném množství jen v souvislosti s patologickými stavy, nádory a nespecifickými záněty (De Smet *et al.*, 1994; De Smet *et al.*, 1999). Mezi nejznámější antigeny této skupiny patří alfa-fetoprotein (AFP) a karcino-embryonální antigen (CEA).

3.2. Autokrinní stimulace

Nádorové buňky během svého vývoje podléhají kontrole imunitního systému, zároveň neodpovídají na produkci různých faktorů od ostatních buněk. Naproti tomu produkují celou řadu různých faktorů, na které samy odpovídají. Některé z těchto faktorů mohou ovlivňovat imunitní systém. Například IL-4 a IL-10 jsou autokrinními faktory karcinomu štítné žlázy (Stassi *et al.*, 2003; Nabarro *et al.*, 2005). Oba tyto cytokiny polarizují T lymfocytární odpověď směrem k Th1 do Th2, což přispívá k inhibici protinádorové imunitní odpovědi, která převážně závisí na Th1 vlivu. Dalším příkladem je cytokin IL-6, autokrinní faktor nádorových buněk, který blokuje kontakt mezi přirozenou a adaptivní imunitní reakcí u rozsáhlého spektra lidských nádorových onemocnění (Kryczek *et al.*, 2006).

3.3. Schopnost neodpovídat na protirakovinné signály

Ve zdravé tkáni funguje celá řada antiproliferativních signálů, které udržují tkáňovou homeostázu. Jedním z nejvýznamnějších antiproliferativních signálů je transformující růstový faktor (TGF- β) (Ghiringhelli *et al.*, 2005; Gorelik *et al.*, 2002). TGF- β ovlivňuje mnoho populací buněk svým imunosupresivním účinkem. V případě dendritických buněk blokuje schopnost jejich antigenní prezentace. Dále inhibuje aktivitu IFN- γ , redukuje proliferaci T buněk, snižuje cytotoxickou aktivitu NK buněk a stimuluje proliferaci regulačních lymfocytů.

3.4. Schopnost inhibovat apoptózu

Apoptóza může být spuštěna dvěma základními cestami. Mitochondriální dráhou, která zahrnuje rozrušení vnější mitochondriální membrány (Green *et al.*, 2004) a dráhou přes „death receptor“, která zahrnuje formaci komplexu DISC (death-inducing signalling complex) (Debatin *et al.*, 2004). Nádorové buňky jsou však schopné vyvinout resistenci k hlavním signálům spouštějícím apoptózu. Mezi endogenní inhibitory MOMP (mitochondria outer membrane permeabilization) patří například anti-apoptotické proteiny BCL-2, BCL-X a MCL1 produkované B buněčným lymfomem. Dále bylo zjištěno, že nádorové buňky často postrádají expresi funkční molekuly APAF1 (apoptotic-protease-activating factor-1), která je nezbytná pro apoptosomové-dependetní aktivaci kaspáz. Dalším příkladem je zvýšená exprese inhibitorů apoptotických proteinů (IAPs) na povrchu nádorových buněk, které také inhibují aktivaci kaspáz.

3.5. Neomezená schopnost se dít

Nádorové buňky jsou schopné pomocí upregulace exprese enzymu telomerázy procházet neomezeným množením. K „nesmrtelnosti“ nádorových buněk také přispívají různé mutace, jako mutace v proteinu p53 a jeho naprostá ztráta. Pokud nádorová buňka neexprimuje protein p53 (Ichiki *et al.*, 2004), exprese regulátoru buněného cyklu B1 je také snížena a buňka prochází neomezenými cykly buněného dělení.

3.6. Invazivita do okolních tkání a zakládání metastáz

Většina úmrtí spojených s nádorovými onemocněními je spojená s jejich schopností metastazovat. Nádorové buňky mohou inaktivovat celou řadu proteinů, jako je například nectin-like 2 protein (NECL2). Inaktivace tohoto proteinu umožní buňkám odpoutat se od ložiska primárního nádoru a volně se pohybovat krevním oběhem (Boles *et al.*, 2005). Podobný efekt mají proteolytické enzymy například katepsin, jež umožňuje buňkám odpoutat se od ložiska primárního nádoru a zakládat metastázy.

3.7. Mechanismy úniku nádorových buněk před imunitním systémem

Nádorové buňky jsou schopné uniknout kontrole imunitního systému pomocí celé řady strategií (Zitvogel *et al.*, 2006). Důležitým mechanismem je produkce cytokinů, které inhibují protinádorovou imunitní reakci, jako je TGF- β a IL-10. Oba zmíněné cytokiny jsou schopné přímo inhibovat maturaci dendritických buněk. Dalším únikovým mechanismem jsou mutace v genech, které kódují bílkoviny důležité pro prezentaci antigenů v APC (antigen prezentujících buňkách). Příkladem mohou být mutace v genech pro β -2-mikroglobulin, TAP (transporter associated with antigen processing) a v genech kódujících podjednotky proteasomu (Marincola *et al.*, 2000). Tyto závažné mutace vedou ke vzniku rezistence k CD8⁺ T lymfocytům. Tento fakt je obtížné překonat, protože snížená exprese MHC I vede k vyšší vnímavosti nádorových buněk k NK buňkám. Nádorové buňky také exprimují molekuly B7-H1, B7-H4 nebo indolamin 2,3-oxygenázu, jež indukují anergii antigen specifických T lymfocytů (Uyttenhove *et al.*, 2003).

4. Interakce mrtvých nádorových buněk s buňkami imunitního systému

4.1. Imunogenní buněčná smrt

Apoptóza byla vždy považována za neimunogenní typ buněčné smrti (Savill *et al.*, 2002). Naopak nekrotická buněčná smrt byla označována jako imunogenní typ buněčné smrti zejména proto, že při ní dochází k rozrušení plasmatické membrány a uvolnění buněčných komponent, včetně zánětlivých markerů jako IL-8 a TNF.

V uplynulých deseti letech byla publikována řada vědeckých prací, které mění dosavadní pohled na apoptózu, jako na typ imunogenní smrti (Zitvogel *et al.*, 2004; Apetoh *et al.*, 2008; Spisek *et al.*, 2006) a upozorují na její význam v konceptu imunogenní buněčné smrti. Z toho vyplývá, že typ buněčné smrti přímo neurčuje, zda jde o imunogenní smrt. Rozhodující je typ podnětu, který buněčnou smrt zahájí. Některé podněty jsou schopné zvyšovat expresi imunogenních molekul na povrchu nádorové buňky nebo jejich uvolnění do extracelulárního prostoru (Kepp *et al.*, 2009).

Pro dokonalé pochopení konceptu imunogenní smrti je třeba definovat typy buněčné smrti u eukaryotických buněk, které dále dělíme dle morfologických změn (Krysko *et al.*, 2006; Galluzzi *et al.*, 2007), kterými buňka prochází na:

- **Apoptóza**

Během apoptotické smrti dochází k mnoha morfologickým změnám buňky (Kerr *et al.*, 1972):

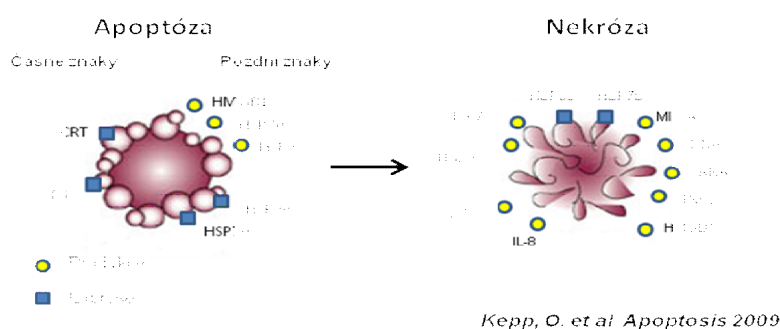
- kondenzaci chromatinu (pyknosis)
- fragmentaci jádra (karyorhexis)
- zahuštění cytoplazmy
- formaci apoptotických tělísek

V buňce dochází k aktivaci kaspáz a permeabilizaci mitochondriální membrány (Kroemer *et al.*, 2005; Ferri *et al.*, 2001; Marzo *et al.*, 1998). Apoptóza nádorových buněk může být spuštěna celou řadou faktorů, jako je hypoxie, radioterapie či chemoterapie. Následně jsou apoptotické buňky rozpoznány fagocyty (makrofágy, dendritickými buňkami, endoteliálními buňkami a fibroblasty) a odstraněny. Během tohoto procesu fagocytující buňky secernují

potencionální proti-zánětlivé cytokiny jako TGF- β (Chen *et al.*, 2001), PGE2 nebo aktivní faktor destiček (Savill *et al.*, 2000). Z tohoto důvodu byla apoptóza jednoduše považována za imunologicky tichý typ buněčné smrti (Voll *et al.*, 1997; Steinman *et al.*, 2000). Toto tvrzení však nelze aplikovat na všechny experimentální situace. Současné studie ukazují, že ošetření nádorových buněk antracycliny (Obeid *et al.*, 2007), oxaliplatinou (Tesniere *et al.*, 2010) a ionizujícím zářením (Obeid *et al.*, 2007) indukuje imunogenní smrt *in vitro* a *in vivo*, pokud jsou nádorové buňky aplikovány do imunokompetentní myši (obr.2). Naopak některé induktory apoptotické buněčné smrti (mitomycin C, etoposide a staurosporin) nejsou schopné indukovat imunogenní buněčnou smrt (Banchereau *et al.*, 1998).

- **Nekróza**

Nekrotickou smrt buňky provází výrazné morfologické změny. Dochází zejména k nabobtnání cytoplazmy, celkovému zvětšení objemu buňky vedoucí k ruptu e cytoplazmatické membrány a následně uvolnění poškozených organel (Galluzzi *et al.*, 2007). Tento proces bývá nejčastěji důsledkem fyziologického stresu buňky nebo jejího intenzivního poškození. Během tohoto procesu dojde k uvolnění celé řady zánětlivých cytokinů jako je IL-8, IL-10 a TNF- α , hlavně z tohoto důvodu byla nekróza považována dlouhou dobu za typ imunogenní buněčné smrti.



Obr. 2 Imunogenní determinanty buněčné smrti. V průběhu časných fází apoptózy dochází k expresi calreticulinu (CRT). Jeho exprese je následována expresí fosfatidylserinu (PS). High mobility group box I (HMGB1) je uvolněn v pozdních fázích apoptózy. Během nekrózy dojde k uvolnění proteinu teplotního šoku (HSP) do extracelulárního prostoru. Porušení plazmatické membrány vede k uvolnění cytokinů IL-8 a IL-10.

- **Autofágie**

Autofágie je odpověď eukaryotické buňky na stresové prostředí, jako je hypoxie, infekce a nedostatek výživy (Kepp *et al.*, 2009). Tento pomalý typ buněčné smrti vede k degradaci intracelulárních organel po jejich sekvestraci do vakuol ohraničených dvojitou membránou (Maiuri *et al.*, 2007). Autofágie slouží jako hlavní mechanismus pro eliminaci nadbytečných a poškozených organel a intracelulárních patogenů.

- **Mitotická katastrofa**

Jde o další druh buněčné smrti, který souvisí s poruchami v průběhu mitózy, resp. dalšími chybami v buněčném cyklu. Tento typ buněčné smrti doprovází zmenšení jádérka a buňka obsahuje vedle hlavních jader několik mikrojader. Existují dva odlišné typy mitotické katastrofy. První bez účasti p53, druhý je závislý na p53 s mechanismem podobajícím se apoptóze. Oběma typům je společná porucha aktivace cyklinu B a Cdk1 (Castedo *et al.*, 2004).

4.2. Molekulární parametry imunogenní buněčné smrti

Během procesu imunogenní buněčné smrti dochází k expresi a uvolnění různých a pozdních markerů. Tyto molekuly hrají zásadní úlohu v rozpoznání apoptotických nádorových buněk imunitním systémem, zejména buňkami prezentujícími antigeny. Základní výčet těchto molekul a jejich vliv na populaci APC uvádí tabulka 1 a obrázek 3.

Nádorová buňka	Dendritická buňka
Komponenty plazmatické membrány	
HSP70 a HSP90	Crosprezentace nádorových antigenů
Calreticulin	Indukce fagocytózy
Fosfatidylserin a Integriny	Indukce rozpoznání nádorových buněk
Mediátory zánětu	
HSP70 a HSP90	Maturace DC
HMGB1	Zpracování antigenu a jeho prezentace
Močová kyselina přes TLR2	Maturace DC
Degradační produkty pozdní fáze	
DNA přes TLR9	Maturace DC
RNA přes TLR3	Aktivace DC
PTX3	Regulace maturace DC

Tab.1 Hlavní determinanty imunogenní buněčné smrti a jejich vliv na DC

4.2.1. Heat shock proteiny

Heat shock proteiny (HSP), neboli proteiny teplotního stresu, jsou chaperonové proteiny, které zajišťují správné sbalení a znovuzbalení proteinů během stresových situací v buňce. Ačkoli jsou tyto proteiny v těsně lokalizovány v intracelulárních kompartmentech, dva zástupci této rozsáhlé rodiny, HSP70 a HSP90, mohou být exprimovány na buněčném povrchu a účastnit se aktivace imunitního systému.

HSP70 patří do rodiny ATP-dependenčních chaperonových proteinů, který reguluje skládání nově syntetizovaných polypeptidů a jejich transport do jednotlivých buněčných kompartmentů. Pokud se nachází HSP70 uvnitř buňky, pak apoptózu v těsně blokuje na několika úrovních. Jednak interaguje s významnou molekulou Apaf-1, čímž inhibuje tvorbu apoptosomu, který je nezbytný pro aktivaci kaspázových drah (Beere *et al.*, 2000). Dále HSP70 blokuje proapoptotický transkripční faktor p53 (Wadhwa *et al.*, 2002) a stresové kinázy, jako je c-Jun N-terminální kináza 1 i ERK. Intracelulárně lokalizovaný HSP90 má také protektivní funkce. Váže se na signální proteiny, jako jsou steroidní receptory, MyoD (Nathan *et al.*, 1995), v-Src (Hartson *et al.*, 1994) nebo Raf-1 (Wartmann *et al.*, 1994).

B hem imunogenní buňné smrti dochází k translokaci HSP70 a HSP90 na buňný povrch, kde mají tyto molekuly imunostimulační vlastnosti. Hrají významnou roli v procesu crosprezentace nádorových antigenů na molekulách MHC I a napomáhají tak indukci protinádorově specifických CD8+ T lymfocytů (Doody *et al.*, 2004; Schild *et al.*, 1999). Dendritická buňka rozpoznává takový komplex HSP-peptid pomocí TLR-4 a CD14 (Asea *et al.*, 2002). Aktivací TLR-4 dojde k uvolnění prozántlivých cytokinů (TNF- α , IL-1, IL-12, IL-6), jež stimulují zahájení imunitní odpovědi (Lehner *et al.*, 2004). Další imunostimulační vlastností molekuly HSP70 je vliv na maturaci DC zvýšením exprese CD86 a CD40 (Singh-Jasuja *et al.*, 2000). Heat shock proteiny exprimované na povrchu nádorové buňky reagují s celou sadou receptorů přítomných na APC. Mezi nejvýznamnější molekuly patří CD40 a scanvengerový receptor LOX-1 a SR-A (Becker *et al.*, 2002).

V současné době se bada v deckých skupinách zaměřila na sledování exprese HSP po aplikaci cytotoxických látek. Příkladem může být studie provedená na buňkách lidského myelomu. Při ošetření buňek bortezomibem, proteazovým inhibitorem, dochází ke zvýšení exprese molekuly HSP90 ve srovnání s ošetřením buňek -zářením i dexamethasonem. Pokud byla buňná smrt indukována bortezomibem, docházelo ke zvýšené fenotypické maturaci dendritických buňek a schopnosti aktivovat T lymfocyty *in vitro* (Spisek *et al.*, 2007).

4.2.2. Calreticulin

Calreticulin (CRT) je protein vázající vápník, který se podílí zejména na regulaci homeostázi Ca²⁺. Nachází se zejména v lumen endoplazmatického retikula (Groenendyk *et al.*, 2004; Coppolino *et al.*, 1997; Kwon *et al.*, 2000). Stejně jako heat shock proteiny patří mezi chaperonové proteiny a interaguje s celou sadou proteinů, zejména s disulfid izomerázou Erp57 (Oliver *et al.*, 1999). Calreticulin, se podobně jako HSP, nachází na povrchu apoptotických buňek ošetřených některým z induktorů imunogenní smrti. Apoptotické nádorové buňky exprimující na svém povrchu calreticulin se stávají více atraktivní pro makrofágy a dendritické buňky (Obeid *et al.*, 2007; Gardai *et al.*, 2006). V současné době je exprese calreticulínu na apoptotických nádorových buňkách spojována zejména s antracykliny a -zářením (Obeid *et al.*, 2007). Jak primární nádorové buňky tak nádorové linie translokují CRT na buňný povrch po ošetření antracykliny nebo inhibitory komplexu PP1/GADD34 (Obeid *et al.*, 2007; Obeid *et al.*, 2007; Chaput

et al., 2007). Calreticulin se objevuje na povrchu apoptotické buňky velice záhy po ošetření antracykliny nebo -zářením, dokonce dříve než buňka začne odhalovat fosfatidylserinové zbytky na vnější straně plazmatické membrány. Proto je calreticulin označován jako první apoptotický znak. Exprese calreticulinu je spojena s fosforylací eIF2, která není jediným předpokladem pro expresi calreticulinu. To dokazuje expozice nádorových buněk například brefeldinu a tunicamynu jako primárním induktorem ER (endoplazmatické retikulum) stresu, po kterých nedochází k expresi calreticulinu (Obeid *et al.*, 2007). Další důležitou podmínkou pro expresi calreticulinu po ošetření antracykliny je aktivace kaspáz. Pokud blojujeme aktivaci kaspáz například aplikací antracyklin pomocí inhibitoru kaspáz Z-VAD-fmk, nedochází k expresi CRT. Exprese CRT na povrchu apoptotických buněk je zodpovědná za indukci protinádorové imunitní odpovědi jak v *in vitro* tak *in vivo* podmínkách. Aktivace protinádorové imunitní odpovědi je spojena s rychlým rozpoznáním a intenzivní fagocytózou nádorových buněk dendritickými buňkami, jež vede k indukci antigenně specifické cytotoxické CD8 T lymfocytární odpovědi. Tento fakt dokazuje aplikace protilátek blokujících aktivitu CRT nebo CRT knockdown pomocí specifických siRNAs (Obeid *et al.*, 2007). Imunogenicita nádorových buněk, které neexprimují calreticulin, může být výrazně zvýšena pomocí adsorpce rekombinantního CRT proteinu na buněčný povrch. Tato skutečnost podtrhuje klíčovou roli tohoto proteinu v procesu imunogenní smrti nádorových buněk.

4.2.3. Zánětlivé cytokiny uvolňované nádorovými buňkami

Produkce prozánětlivých cytokinů indukujících imunitní odpověď, je typická zejména pro nekrotickou smrt. Právě během nekrózy dochází k porušení plazmatické membrány a uvolnění obsahu cytoplazmatických cytokinů do okolního prostředí. Naopak během apoptózy buňka vytváří malou apoptotickou tělísko, která jsou snadno rozpoznatelná APC a nedochází k porušení plazmatické membrány (Matzinger, 2002). Nekrotické buňky, produkcí prozánětlivých cytokinů TNF- α , IL-8, IL-10 a IL-6 (Krysko *et al.*, 2006), ovlivňují zejména fibroblasty, makrofágy a dendritické buňky (Basu *et al.*, 2000). Do podobné skupiny faktorů uvolňovaných do extracelulární matrix během nekrózy, můžeme zařadit také HSP a kyseliny močové (Shi *et al.*, 2003).

4.2.4. High mobility group box 1

High mobility group box 1 (HMGB1) je chromatin-vázající protein, který ovlivňuje transkripci a další jaderné funkce (Bianchi *et al.*, 1989). Molekula HMGB1 patří mezi pozdní apoptotické markery. Aktivně je secernována ze zánětlivých buněk (Wang *et al.*, 2009) a pasivně z nekrotických buněk (Scaffidi *et al.*, 2002). V extracelulárním prostoru HMGB1 signalizuje poškození tkáně a zahajuje prozánětlivou odpověď vazbou na celou řadu specifických receptorů, jako je RAGE (receptor for advanced glycosylation products), TLR2 a TLR4 (Rovere-Querini *et al.*, 2004).

Zajímavé jsou výsledky experimentů, které ukazují, že produkce HMGB1 během nekrózy neaktivuje imunitní odpověď proti nádorovým buňkám (Ronchetti *et al.*, 1999; Gamrekelashvili *et al.*, 2007). Naopak buňky během apoptotické smrti navozené antracykliny *in vitro* podmiňkách vyvolávají protinádorovou odpověď, pokud jsou aplikovány subkutánně do syngenních imunogenních myší. Tento protinádorový vakcinní efekt nevyžaduje přítomnost dalších imunostimulačních látek a zajišťuje dlouhodobou ochranu proti živým nádorovým buňkám (Casares *et al.*, 2005). Tento proces protinádorové vakcinace zahrnuje nezbytné rozpoznání a fagocytózu nádorových buněk dendritickými buňkami (DC), protože deplece DC *in vivo* vyruší tuto protinádorovou imunitní odpověď (Apetoh *et al.*, 2007; Casares *et al.*, 2005).

Po uvolnění HMGB1 z nádorových buněk dojde k navázání molekuly na TLR4 na povrchu DC. Zde molekula napomáhá prezentaci nádorových antigenů (Apetoh *et al.*, 2007). TLR4 se podílí na kontrole prezentace antigenů tak, že inhibuje spojení fagosomu s lysozomem (Blander *et al.*, 2004; Shiratsuchi *et al.*, 2004). Důkazem je blokáda molekuly HMGB1 pomocí specifických protilátek, kdy dojde k naprostému vyrušení imunitní reakce *in vivo* a *in vitro* podmínkách.

4.2.5. Kyselina močová

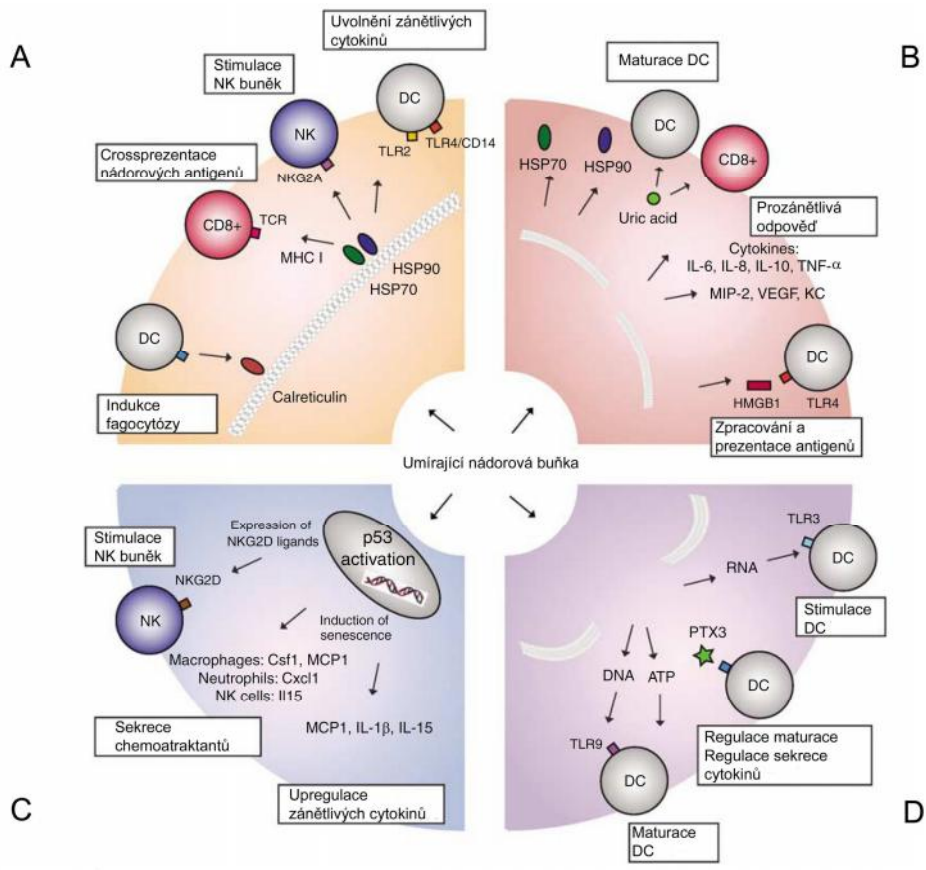
V případě buněného stresu dochází v buňce ke zvýšení koncentrace kyseliny močové v důsledku rychlé degradace RNA a DNA a následné přeměny vzniklých purinů (Shi *et al.*, 2002). Zvýšená koncentrace močové kyseliny byla detekována zejména po ošetření buněk teplem, cykloheximidem a UV radiací. Pokud blokuje uvolnění kyseliny močové například allopurinolem, nedochází ani k rozvoji antigenně specifické odpovědi. Kyselina močová je specificky rozpoznávána pomocí inflamasomu cryopyrin/NALP3 u APC (Martinon *et al.*, 2006).

4.2.6. Degradace produktů pozdní fáze buněné smrti s prozánčlivými vlastnostmi

Závěrečná fáze buněné smrti je doprovázena u nekrózy rozrušením plazmatické membrány. Během tohoto procesu dojde k uvolnění RNA molekul, které se vážou na TLR3 na povrchu DC (Kariko *et al.*, 2004). Dále dochází k uvolnění dsDNA (Ishii *et al.*, 2001), která stimuluje jak makrofágy tak DC. V neposlední řadě uvolní volné nukleotidy, které vedou k maturaci DC (Krysko *et al.*, 2005) a aktivaci NF- κ B signální dráhy (Ferrari *et al.*, 1997). Všechny tyto molekuly produkované během pozdních fází buněné smrti usnadňují rozpoznávání nádorových buněk imunitním systémem také pomocí pentraxinových receptorů (Bottazzi *et al.*, 2006). Krátké pentraxiny jako je C-reaktivní protein nebo sérový amyloid hrají významnou roli v procesu odstranění zbytků buněk (Rovere *et al.*, 2000).

4.2.7. Aktivace p53 v nádorových buňkách

V případě poškození buněčné DNA ionizujícím zářením i chemoterapií, dochází k aktivaci proteinu p53, jehož hlavní funkcí je zastavení buněčného cyklu a navození apoptózy. Buňky, u kterých dochází k aktivaci této apoptotické dráhy, exprimují NKGD2 ligandy, jako je například nasýtlý transkript retinové kyseliny. Nádorové buňky exprimující NKGD2 ligandy jsou snadno rozpoznávány NKT buňkami a cytotoxickými T lymfocyty.



Upravno dle Tesniere A et al, Cell death and Differentiation, 2003

Obr. 3 Pohled hlavních imunogenních molekul exprimovaných a uvolňovaných nádorovou buňkou

5. Imunoterapie

Imunoterapie v léčbě nádorových onemocnění byla poprvé zmíněna Paulem Ehrlichem v 80. letech minulého století. V současnosti imunoterapie zaujímá v léčbě konkrétních nádorových onemocnění velmi pevné postavení (Finn, 2003). Přesto je stále třeba připravit imunoterapeutických protokolů odpovídajících na otázky: jaký antigen použít, jaký typ imunitní reakce vyvolat, jak vakcínu správně aplikovat?

Protinádorové vakcíny jsou navrhovány tak, aby upravily imunitní systém na setkání s nádorovou buňkou. Nádorové onemocnění s sebou nese celou řadu přirozených překážek, které musí vakcína překonat. Jde zejména o imunosupresivní působení nádoru a dopady předchozí terapie na imunitní systém pacienta. Pokud jsou vakcíny používány v prevenci nádorových onemocnění, pak musí indukovat dlouhodobou imunitní paměť bez rizika vedlejších účinků, kterými mohou být například autoimunity.

Má-li být imunoterapie nádorového onemocnění úspěšná i v pokročilém stádiu onemocnění, musí dojít k rychlé indukci velkého množství efektorových buněk, což je velmi obtížný úkol. Efektorové buňky musí poté migrovat do nádorové tkáně, což je znesnadněno přítomností imunosupresivních látek, které produkuje nádorová tkáň a nádorové stroma. V pokročilém stádiu onemocnění je navíc populace nádorových buněk heterogenní a některé buňky nemusí exprimovat nádorové antigeny (Finn, 2003), proto nejsou rozpoznávány antigen specifickými T lymfocyty a protinádorovými protilátkami. Proto populace rezistentních nádorových buněk roste nezávisle na přítomnosti imunitní reakce a dává vzniknout nádoru, který je zcela rezistentní k protinádorové imunoterapii.

5.1. Základní typy imunoterapeutických protokolů

Aktivní i pasivní imunoterapie využívají specifické i nespecifické imunity k boji proti nádorovým buňkám. Pasivní imunoterapie se zakládá na aplikaci v těle množství protilátek, buněk imunitního systému i dalších faktorů příjemci, čímž se liší od aktivní imunoterapie, kde se do léčebného procesu aktivně zapojuje i imunitní systém příjemce (Houghton *et al.*, 1985; Miller *et al.*, 1981; Miller *et al.*, 1982). Výčet jednotlivých typů imunoterapeutických protokolů přesahuje rámec této práce. Detailněji se zaměřím na imunoterapii pomocí dendritických buněk.

5.2. Racionální přístup k imunoprevenci

Nemožnost ověřit některé základní imunoterapeutické problémy u lidí podporuje výzkum na vhodných zvířecích modelech. Technický pokrok za poslední dvě desetiletí umožnil vědcům pracovat s myším genomem na takové úrovni, že lze modifikovat expresi genů vedoucích k vývoji specifických nádorů. Vývoj zvířecích modelů je stále dokonalejší a pro studium nádorů jsou již k dispozici modely, u nichž dochází k rozvoji nádorového onemocnění v podobných stádiích jako u člověka (Finn *et al.*, 2002). Modely pro postupný rozvoj onemocnění přes neoplastické léze až po plně vyvinutý nádor existují například pro kolorektální karcinom, karcinom pankreatu a karcinom prsu (Guy *et al.*, 1992; Harada *et al.*, 1999; Hingorani *et al.*, 2003).

Nejvíce experimentálních dat o roli imunitní reakce v růstu nádorů bylo získáno na myším modelu karcinomu prsu způsobeném expresí protoonkogenu Her2/neu. V zásadě vakcinace proti Her2/neu proteinu celou bílkovinou, jednotlivými peptidy i pomocí DNA vede k prevenci rozvoje nádorového onemocnění. Pokud již dojde k rozvoji nádorového onemocnění, je protinádorová vakcinace mnohem méně efektivní. Hlavními mechanismy účinné protinádorové odpovědi jsou na tomto modelu protilátky proti Her2/neu a IFN- γ (Nanni *et al.*, 2001; Quaglino *et al.*, 2004). Dalším důležitým cytokinem je IL-12, což dále dokládá důležitost Th1 typu imunitní reakce v eliminaci nádorových buněk. Vakcína založená na podávání dendritických buněk, které prezentují nádorové antigeny, zabránila rozvoji polypu v tlustém střevě na myším modelu familiární polypózy tlustého střeva. Roli v eliminaci nádorových buněk hrají i další efektorové mechanismy, jako například cytotoxické T lymfocyty. Znovu je ovšem potřeba zdůraznit, že pro eliminaci preneoplastických a neoplastických buněk je nejdůležitější součástí

a koordinovaná aktivace širokého spektra efektorových mechanismů specifické a nespecifické imunity.

5.3. Imunoprevence nádorových onemocnění a její klinická aplikace

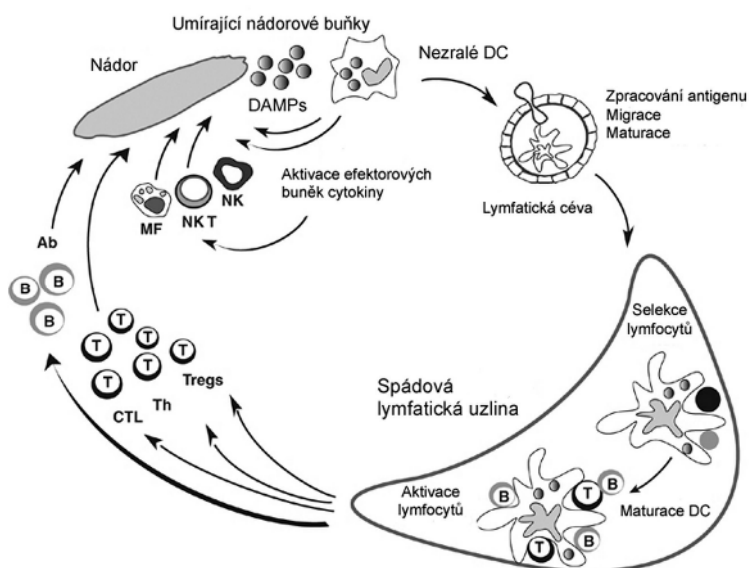
Klinická aplikace protinádorové imunoterapie může být využita u mnoha skupin pacientů v rozličných klinických situacích. Pokud hovoříme o primární prevenci nádorového onemocnění, je třeba charakterizovat pacienty s vysokým rizikem rozvoje nádorového onemocnění. Takové pacienty nacházíme v rodinách s vysokým genetickým zatížením, které zvyšuje zásadním způsobem riziko rozvoje nádorového onemocnění. O genetickém zatížení můžeme hovořit u pacientů s Li-Fraumeni syndromem, mutacemi v BRCA, mutacemi v K-ras, u kterých mohou být detekovány specifické mutace, a také zvýšené riziko nádorového onemocnění (Finn *et al.*, 2002). Další skupinu pacientů vhodnou pro aplikaci imunoprevenní terapie jsou ti, u nichž bylo detekováno preneoplastické onemocnění (Spisek *et al.*, 2006). V tomto případě jde zejména o pacienty s kolorektálními polypy a cervikální intraepiteliální neoplazií. Samozřejmě nejvyšší skupinu pacientů, u kterých bude zvažována protinádorová terapie, budou vždy tvořit pacienti, u kterých již byl diagnostikován tumor. V dosud probíhajících studiích byla imunoterapie testována jako poslední přístup u pacientů, kteří byli ve velmi pokročilém stadiu diseminovaného onemocnění a kteří podstoupili chemoterapii. Díky tomuto faktu je naděje na trvalý efekt imunoterapie malá. Naopak je povzbudivé, že v tšinou došlo k indukci detekovatelné imunitní odpovědi. Imunoterapie by měla mít v dnešní době výhradní postavení v souasných léčebných schématech, nejlépe u pacientů ve stádiu minimální reziduální nemoci, například po radikálním chirurgickém výkonu.

6. Imunoterapie dendritickými buňkami

Pochopení výjimečného postavení dendritických buněk v procesu T buněčné aktivity v kombinaci s vývojem metod pro diferenciaci DC *in vitro* vedly k rozvoji nové oblasti imunoterapie – imunoterapie založené na dendritických buňkách (Banchereau J & Steinman RM, 1998).

6.1. Základní charakteristiky a životní cyklus dendritických buněk

Dendritické buňky mají mezi antigen prezentujícími buňkami jedinečné postavení. Jako jediné mohou aktivovat naivní T lymfocyty a tím zahájit primární specifickou imunitní odpověď, tj. aktivaci naivních nediferencovaných T lymfocytů (obr.4) (Steinman *et al.*, 1983). Populace dendritických buněk byla objevena v roce 1973 Ralphem Steinmanem a Cohnem a pojmenována podle charakteristické morfologie s množstvím výběžků, dendritů. V populaci dendritických buněk je však výrazná heterogenita daná anatomickou lokalizací těchto buněk, která určuje jejich funkci. V této heterogenitě však existuje několik základních parametrů, které jsou pro všechny subtypy shodné, schopnost migrace a indukce primární odpovědi T lymfocytů.



Obr. 4 Životní cyklus dendritických buněk

6.2. Diferenciace dendritických bun k *in vitro*

Rozvoj imunoterapeutických protokolů a potřeba velkého množství dendritických bun k pro vakcinační postupy vedla k přípravě dendritických bun k z prekursorů různých úrovní procesu hematopoézy.

Nejrozšířenější cestou přípravy *in vitro* DC jsou dendritické buňky připravené z monocytů. V tomto případě jsou periferní monocyty diferencovány na DC pomocí cytokinů IL-4 a GM-CSF (Romani *et al.*, 1994; Sallusto & Lanzavecchia, 1994). Monocyty lze jednoduše izolovat z lidské periferní krve, a proto se je tato metoda ideální pro imunoterapeutické protokoly, jelikož umožňuje přípravu velkého množství DC během několika dní. Pro přípravu DC v *in vitro* podmínkách se používá rovněž kostní dřeň a pupeníková krev, v které jsou přítomny CD34+ prekuzory DC. Tyto prekuzory jsou rovněž pomocí cytokinů – GM-CSF a TNF- α diferencovány v DC.

6.3. Historie imunoterapie založené na dendritických buňkách

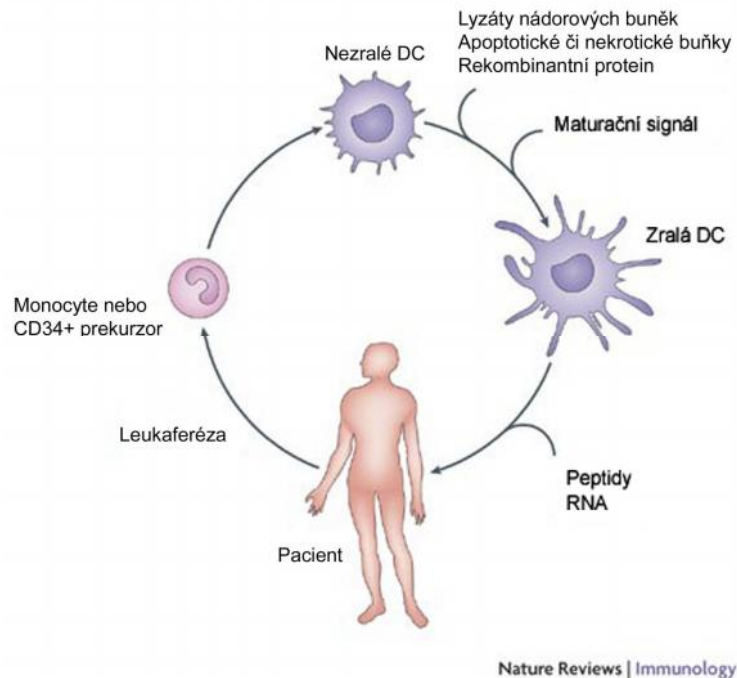
V pilotních studiích byly dendritické buňky používány k přípravě vakcín pro imunizaci proti rakovinným buňkám resp. nádorovým antigenům. Poprvé na myších modelech bylo dokázáno, že dendritické buňky prezentující nádorové antigeny jsou schopné vyvolat účinnou protinádorovou imunitní odpověď a dosáhnout vyléčení vzniklého nádoru a prevenci vzniku dalších metastáz. Tyto studie byly záhy aplikovány na pacientech s nádorovým onemocněním (Davis *et al.*, 2003) nebo u pacientů s chronickou HIV infekcí. Od té doby byly publikovány desítky prací zabývajících se různými aspekty tohoto postupu.

6.4. Protokol vakcinace dendritickými buňkami

Obecné schéma imunoterapie dendritickými buňkami je na obrázku 5. Po výběru pacientů, kteří jsou zařazeni do studie, je připraveno velké množství nezralých dendritických bun k z monocytů v periferní krvi v přítomnosti GM-CSF a IL-4. Po pár dnech dojde k diferenciaci monocytů v nezralé DC. Další postup závisí na typu používaného nádorového antigenu. Při použití mrtvých nádorových bun k, jako zdroje celého spektra nádorových antigenů, je prvním krokem inkubace dendritických bun k s nádorovými buňkami (Spisek *et al.*, 2002; Tobiasova *et al.*, 2007). Po pohlcení nádorových bun k jsou následně dendritické buňky aktivovány a zralé DC, které prezentují nádorové antigeny, jsou poté jako protinádorová vakcína podány zpět pacientovi.

V optimálním případě předpokládáme, že dendritické buňky prezentují nádorové antigeny v lymfatických uzlinách. Následně dochází k aktivaci antigen specifických T lymfocytů a k aktivaci B lymfocytů. Výsledkem je klonální expanze nádor specifických T lymfocytů a produkce specifických protilátek.

V případě protinádorové vakcinace ve stadiu preneoplazie následuje v další fázi tvorba paměťových buněk. Jestliže poté začne nádor růst, existuje předpoklad, že vyvolá aktivaci sekundární imunitní reakce s rychlou expanzí velkého množství efektorových buněk a tvorbou vysokých titerů protilátek.



Obr. 5 Schéma imunoterapeutického protokolu na bázi dendritických buněk

6.5. Aspekty při výrobě vakcín z dendritických buněk

Rozhodující pro účinnost vakcinace je zejména postup výroby vakcíny, způsob a frekvence aplikace v různých fázích onemocnění. Proces diferenciací DC *in vitro* byl intenzivně zkoumán celou řadou vdeckých skupin. Použití rozličných cytokinových koktejlů vede k přípravě zcela odlišných populací DC s různou schopností aktivovat T lymfocyty. Klasickým postupem ve výrobě dendritických buněk je diferenciací periferních monocytů v přítomnosti IL-4 a GM-CSF (Romani *et al.*, 1994; Sallusto & Lanzavecchia, 1994).

Úspěšné byly i alternativní postupy ve výrobě dendritických buněk s použitím IFN (Santini *et al.*, 2000) a IL-15 (Mohamadzadeh *et al.*, 2001). Rovněž bylo testováno použití DC izolovaných přímo z periferní krve a pulzovaných *ex vivo* nádorovým antigenem (Timmerman *et al.*, 2002) nebo použití odlišných populací výchozích progenitorů (CD34+ hematopoetické progenitory) (Banchereau *et al.*, 2001).

Další klíovou otázkou je zdroj použitých nádorových antigenů. Běžnou metodou v imunoterapeutických protokolech je používání přesně definovaných epitopů nádorových antigenů ve formě krátkých peptidů. V tomto případě jsou dendritické buňky nejprve maturovány a teprve zralé DC, které exprimují velké množství HLA molekul, jsou inkubovány s nádorovým antigenem. Dalšími možnostmi je transfekce dendritických buněk RNA izolovanou z nádorových buněk, plasmidy kódujícími nádorový antigen a v neposlední řadě použití apoptotických tělísek pocházejících z umírajících nádorových buněk (Berard *et al.*, 2000).

Dalšími klíovými parametry imunoterapie jsou způsob aplikace a počet DC ve vakcíně. Nejčastějšími způsoby aplikace je subkutánní a intravenózní podání. Problémem podání zmíněnou cestou je fakt, že se do lymfatických uzlin často dostává jen velmi malé procento injikovaných DC, což může vést k selhání vakcíny. Klíovým parametrem je exprese chemokinového receptoru CCR7 na povrchu DC, díky kterému jsou buňky schopné odpovídat na chemokinové signály CCL19 a CCL21, jež jsou exprimované v sekundárních lymfatických orgánech.

6.6. Vliv maturationálního stavu dendritických buněk na účinnost vakcín

Nezralé dendritické buňky s nízkou expresí kostimulačních molekul nejsou schopné dodávat T buňkám dostatečně silné aktivující signály. Tento stav může vést k anergii T lymfocytů, depleci antigen-specifických T buněk nebo vzniku regulačních T lymfocytů (Steinman *et al.*, 2003). Pokud podáváme vakcíny obsahující nezralé dendritické buňky, můžeme navodit nežádoucí toleranci vůči nádorovému antigenu.

K maturaci dendritických buněk se v klinických studiích využívá zejména směs prozántlivých cytokinů, například IL-1, TNF, IL-6, PGE-2 (Jonuleit *et al.*, 1997). Nedostatkem tohoto maturationálního koktejlu je indukce lymfocytů s regulačním fenotypem (Banerjee *et al.*, 2006).

Dalším maturationálním signálem používaným v klinických studiích jsou ligandy TLR. Některé z nich jsou silné aktivátory produkce Th1 polarizačního faktoru IL-12 a účinné

organismu. Práv tyto dva přístupy v kombinaci s imunoterapií by mohly docílit zvýšení efektivity protinádorové vakcíny.

6.8. Budoucnost DC vakcín v imunoterapii

V krátké době, po objasnění role dendritických buněk v indukci imunitní reakce a publikaci protokolů pro jejich přípravu z monocytů, bylo provedeno několik klinických studií u řady nádorových onemocnění například u maligního melanomu (Palucka *et al.*, 2003), u pacientů s renálním karcinomem (Holth *et al.*, 2005), non-Hodgkinským lymfomem (Cheson *et al.*, 2003), karcinomem prostaty (Frank *et al.*, 2010). V rámci těchto studií došlo k laboratorně detekovatelné indukci protinádorové imunitní odpovědi. Avšak přesně několik popsaných regresí nádorových lézí nebyl klinický efekt v těsnou delouhodobý. Důvodem může být skutečnost, že v mnoha případech byla vakcínou úspěšně iniciovaná nádorově specifická T buněčná odpověď potlačována působením supresivních mechanismů. Podstatné je nejen imunitní odpověď iniciovat, ale vytvořit dostatečnou populaci efektorových buněk a buněk paměťových.

Další problém provázející DC imunoterapeutické studie je silný imunopresivní účinek nádoru samotného (jak bylo zmíněno v druhé kapitole této práce), ve kterém je účinnost imunitních mechanismů oslabena. Významný imunopresivní působení mají také regulační T lymfocyty, jejichž populace je u onkologických pacientů v krvi a tkáni rovněž výrazně zvýšena (Viguier *et al.*, 2004). Proto je součástí mnoha imunoterapeutických protokolů aplikace látek, které mají za cíl potlačit funkci či eliminovat nádorově specifické T regulační buňky (Sutmoller *et al.*, 2001). V rámci klinických studií se pro eliminaci regulačních T lymfocytů používají cytostatické látky, například cyklofosfamid (North, 1984).

Zásadním problémem dosud probíhající klinických studií je fakt, že do nich byli zahrnuti především pacienti ve velmi pokročilé fázi onemocnění, u kterých byly vyčerpány všechny ostatní terapeutické modalities. U těchto pacientů je imunitní systém poškozen a vyčerpán probíhající chemoterapií a imunopresivními mechanismy nádorové tkáně. Proto je potřeba zdůraznit, že v souladu s teoretickými předpoklady i experimentálními daty má protinádorová imunoterapie největší šanci na úspěch v případě, že bude aplikována pacientům v raných fázích onemocnění, případně pacientům po radikálním chirurgickém výkonu ve fázi minimální reziduální nemoci.

V současnosti se jako nejvhodnější přístup jeví kombinace léčby DC vakcinací s dalšími formami terapie (Pardoll *et al.*, 2004), zejména pak u pacientů v pokročilejších stádiích onemocnění v kombinaci s chemoterapií.

Důkazem o účinnosti tohoto postupu přinesla vakcína z dendritických buněk Provenge americké firmy Dendreon. Fáze III klinické studie prokázaly, že aplikace této vakcíny u pacientů s hormon-refrakterním karcinomem prostaty v kombinaci s chemoterapií statisticky významně prodloužuje celkové přežití ve srovnání se skupinou bez vakcíny. Na základě výsledků těchto několikaletých studií schválila americká FDA tento preparát ke klinickému použití a zařadila jej do léčebných postupů u této kategorie nemocných. Jde o první protinádorovou individuální buněčnou vakcínu schválenou k rutinnímu klinickému použití. Imunoterapie obohacuje mozaiku komplexní terapie nádorových onemocnění, která zahrnuje různé léčebné modality zaměřené na jednotlivé složky ekosystému nádoru.

7. Cíle práce

Podcházející teoretická část této disertační práce shrnuje souhrnný pohled na problematiku imunoterapie, imunogenní buněčné smrti a její aplikaci v imunoterapeutických protokolech.

Poznání klíčové role dendritických buněk v procesu zahájení imunitní reakce vedlo k rozvoji nového směru imunoterapie. V současné době probíhá řada klinických studií založených na aplikaci dendritických buněk pacientům s nádorovým onemocněním. Nedílnou součástí vývoje imunoterapeutického protokolu je příprava dendritických buněk v podmínkách správné výrobní praxe. Jak již bylo řečeno v úvodu mé práce nejlepší úinnosti, dle teoretických předpokladů, má imunoterapie založená na dendritických buňkách v různých fázích onemocnění. V klinické praxi se naopak setkáváme s opakem. Vakcína je aplikována pacientům v pokročilém stádiu onemocnění, jejichž imunitní systém je zatížen chemoterapií. Z tohoto důvodu se řada vdeckých skupin zabývá možností kombinace chemoterapie s imunoterapií. Překvapivé jsou výsledky těchto prací, které potvrzují, že tyto dvě terapeutické metody mohou být navzájem potencující se modalitami v léčbě nádorového onemocnění. Koncept chemo-imunoterapie je zároveň podpořen výsledky mnoha vdeckých skupin, které hovoří o imunogenicitě nádorových buněk po ošetření některými chemoterapeutiky. Významnou skupinu léčiv indukujících imunogenní buněčnou smrt tvoří antracykliny.

Problematika této práce je členěna do tří tematických celků :

- **Optimalizace protokolu pro výrobu dendritických buněk za podmínek správné výrobní praxe**

Cílem práce byl vývoj protokolu pro přípravu DC v imunoterapeutickém protokole za podmínek Správné výrobní praxe. Klíčovým úkolem byla definice optimálního kultivačního média a maturního stimulu, jež zaručí přípravu DC se zralým fenotypem. Součástí této práce bylo testování aktivačního stavu dendritických buněk a schopnost indukovat antigen specifické T lymfocyty.

- **Testování schopnosti klinicky aplikovaných chemoterapeutik indukovat imunogenní bun nou smrt u lidských primárních nádorových bun k a nádorových linií**

Imunogenní bun ná smrt je charakterizována expresí molekul teplotního šoku, calreticulinu a HMGB1 molekuly. Po ošet ení nádorových bun k n kterými chemoterapeutiky (oxaliplatina, antracykliny, bortezomib), dochází k expresi zmín ných molekul na povrchu nádorových bun k. Imunogenní nádorové bu ky jsou schopné aktivovat dendritické bu ky a indukovat protinádorov specifickou odpov . Všechny dosavadní studie, sledující imunogenní bun nou smrt, byly provedeny na myš ích modelech. V naší práci si klademe za cíl ov ít tato experimentální data v lidském systému a sledovat schopnost r zných chemoterapeutik indu kovat imugenní bun nou smrt na lidských primárních nádorových bu kách a nádorových liniích. Sou ástí tohoto projektu je také sledování vlivu potencionáln imunogenních bun k na populaci DC a jejich schopnost indukovat antigen specifickou odpov .

- **Shrnutí principu chemo-imunoterapie na kazustice pacienta s hormon-refrakterním karcinomem prostaty**

Cílem imunoterapie u pacient s pokročilým nádorovým onemocněním není kompletní odstran ní nádorových bun k, nýbrž znovuoobnovení dynamické rovnováhy mezi nádorovými bu kami a imunitním systémem, jak jsem zmínila v úvodu své práce. Vhodná kombinace redukce nádorové hmotnosti a imunoterapie vytvá í vhodné podmínky pro indukci protinádorov specifické odpov di. Cílem této práce je shrnutí experimentálních základ aplikované chemo-imunoterapie na kazuistice pacienta s hormon-refrakterním metastatickým nádorem prostaty se špatnou prognózou.

8. Výsledky a diskuze

Výsledky této práce byly shrnuty do tří publikací. V následujícím oddílu jsou tyto publikace uvedené ve formě, ve které byly otištěny v zahraničním tisku (mimo publikaci .1, která je recentně přijatá). Komentářem předcházející každé publikaci shrnuje a diskutuje zásadní výsledky práce a hodnotí jejich význam.

8.1. Imunoterapeutický protokol založený na dendritických buňkách generovaných v CellGro a aktivovaných pomocí PolyI:C

Dendritické buňky jsou jediné antigen prezentující buňky schopné aktivovat naivní T lymfocyty. Nezbytnou podmínkou aktivace protinádorově specifické odpovědi dendritickými buňkami je jejich aktivní stav. Možnost pěstování DC ve velkém množství *in vitro* z monocytů otevřela nový prostor pro protinádorovou imunoterapii založenou na dendritických buňkách. Principem je podání velkého množství DC, které prezentují nádorové antigeny. Následně dochází k aktivaci specifické imunitní odpovědi proti nádorovým buňkám. Pro zahájení klinických studií je nezbytný vývoj protokolů, které zaručí pěstování vakcíny za podmínek Správné výrobní praxe, který bude zároveň podléhat legislativním opatřením.

Cílem práce byl vývoj protokolu pro pěstování DC v imunoterapii za podmínek Správné výrobní praxe. Klíčovým úkolem byla definice optimálního maturationálního stimulu a kultivačního média, které zaručí pěstování velkého množství aktivovaných dendritických buněk. Součástí práce bylo ověřit schopnost takto připravených DC indukovat protinádorově specifickou odpověď. Na dendritických buňkách připravených z monocytů jsme testovali dvě kultivační média, přičemž v úvahu pro klinické použití CellGro a RPMI s 5 % lidského AB séra. V dalším kroce byly DC aktivovány těmi různými maturationálními stimuly - směsí cytokinů (IL-1, IL-6, TNF, PGE-2), PolyI:C (polyinosine-polycytidylic acid) a lipopolysacharidem (LPS). Po 24h byl vyhodnocen aktivní stav DC z hlediska fenotypu a produkce cytokinů. V poslední fázi jsme testovali schopnost zralých DC aktivovat antigen specifické T lymfocyty a regulaci T lymfocytů.

Nejvyšší počet nezralých DC byl získán při kultivaci monocytů v médiu CellGro. Kultivace monocytů v RPMI + 5% AB séra vedla k získání nezralých DC v menším množství. Stimulace směsí cytokinů, PolyI:C i LPS indukovala u všech typů DC fenotypické změny spojené s maturací. Pouze DC aktivované PolyI:C a LPS ovšem produkovaly velké množství prozántlivých cytokinů. DC buňky připravené v CellGro a aktivované PolyI:C byly nejúčinnější v aktivaci specifických T lymfocytů. Zajímavým zjištěním je, že DC aktivované směsí cytokinů indukovaly více regulovaných T lymfocytů, které suprimují imunitní reakci.

Pro použití v klinických imunoterapeutických studiích se jako optimální protokol jeví pěstování DC v bezsérovém médiu CellGro a aktivace DC pomocí PolyI:C. Směsí cytokinů, používaná v dosavadních studiích vede k neúplné aktivaci DC a vyšší indukci nežádoucích

regulací T lymfocytů. Námí vypracovaný protokol byl schválen Státním ústavem pro kontrolu léčiv pro použití v klinické studii.

8.2. Lidské nádorové buňky ošetřené antracykliny indukují proti nádorově specifickou imunitní odpověď

Buněčná smrt indukovaná antracykliny je v současné době považována za imunogenní typ buněčné smrti. Imunogenní buněčná smrt je charakterizována expresí molekul tepelného šoku (HSP) a calreticulinu. Tyto molekuly exprimované na povrchu nádorových buněk jsou následně schopné indukovat maturaci dendritických buněk a usnadňují tak prezentaci nádorových antigenů dendritickými buňkami dalším buňkám imunitního systému. Pozdní imunogenní marker buněčné smrti High mobility group box 1 (HMGB1), váže se na toll-like receptor 4 (TLR4) na povrchu dendritických buněk, usnadňuje prezentaci antigenů nádorových buněk dendritickým buňkám.

Všechny dosavadní studie sledující imunogenní buněčnou smrt byly provedeny na myších modelech. V naší práci sledujeme schopnost různých chemoterapeutik, včetně antracyklin, indukovat imunogenní buněčnou smrt na ovariální (OV90), prostatické (DU145) a leukemické nádorové lince a primárních buňkách karcinomu ovaria a leukemických blastech pacientů s ALL. Dalším cílem práce bylo charakterizovat, zda jsou imunogenní buňky schopné indukovat ve zvýšené míře fagocytózu dendritickými buňkami a jejich aktivaci. Pouze dokonale aktivovaná dendritická buňka je schopná indukovat protinádorově specifickou imunitní odpověď.

Z našich výsledků vyplývá, že pouze antracykliny indukují translokaci calreticulinu, HSP70 a 90 na buněčný povrch a uvolní molekuly HMGB1 po 12 hodinové expozici chemoterapeutikem, jak jsme dokázali pomocí průtokové cytometrie a konfokálního mikroskopu. Dále jsme dokázali, že dendritické buňky fagocytují ve zvýšené míře nádorové buňky ošetřené antracykliny, což přímo souvisí s expresí calreticulinu na jejich buněčném povrchu. U dendritických buněk pulzovaných nádorovými buňkami ošetřeny antracykliny vidíme fenotypickou maturaci. Pro studium mechanismu interakce dendritických buněk pulzovaných nádorovými buňkami s autologními lymfocyty byla vybrána nádorová linie REH (ALL). Dendritické buňky pulzované nádorovými buňkami ošetřeny antracykliny aktivují nejvíce specifických T lymfocytů produkujících IFN γ a zároveň inhibují populaci imunosupresivních regulačních T lymfocytů.

Tato data definují molekulární charakteristiku imunogenní buněčné smrti jako klíčového parametru protinádorové imunitní odpovědi a ukazují možnou strategii imunogenní chemoterapie u onkologických pacientů.

8.3. Kombinovaná chemo-imunoterapie v léčbě hormon-refrakterního metastazujícího karcinomu prostaty

V současné době se imunoterapie řadí mezi možné léčebné postupy nádorového onemocnění vedle chirurgické léčby, chemoterapie a radioterapie. Cílem imunoterapie u pacientů s pokročilým nádorovým onemocněním není kompletní odstranění nádorových buněk, ale znovuoobnovení dynamické rovnováhy mezi nádorovými buňkami a imunitním systémem. Vhodná kombinace redukce nádorové hmotnosti (pomocí chirurgie či chemoterapie) a inhibice nádorově indukované imunosuprese, vytváří ideální podmínky pro indukci protinádorové imunitní odpovědi pomocí aktivní imunoterapie. V této práci shrnujeme experimentální základy a klíčové myšlenky kombinované chemo-imunoterapie a prezentujeme ji na kazuistice pacienta s hormon-refrakterním metastatickým nádorem prostaty se špatnou prognózou.

Prokázali jsme, že aktivní buněčná imunoterapie pomocí dendritických buněk indukovala specifickou protinádorovou odpověď. Kombinovaná chemo-imunoterapie skládající se z chemoterapie a vakcín na bázi DC pulzovaných prostatickými nádorovými buňkami (LNCap) vede k významnému zlepšení klinických a laboratorních hodnot pacienta a ke snížení hodnot PSA o více než 90 %.

9. Závěr

Poznání klíčové role dendritických buněk v procesu zahájení imunitní reakce a možnost jejich přípravy v *in vitro* podmínkách vedly k úvahám o jejich využití v imunoterapii nádorových onemocnění. Výrobní postup vakcíny se u různých výzkumných skupin a biotechnologických firem liší a obvykle celý protokol chráněn patentem. Příprava vakcíny musí probíhat v podmínkách správné výrobní praxe, proto je třeba optimalizovat podmínky výroby na základě těchto požadavků. Další klíčovou otázkou v imunoterapeutickém protokolu je správné načasování aplikace. Nejlepší účinnosti dosahuje imunoterapie v raných stádiích onemocnění. V klinické praxi se aplikace imunoterapie naopak omezuje pouze na pokročilá stadia onemocnění. V tomto případě je nutné kombinovat imunoterapii s chemoterapií, jež je standardem léčebné péče. Z tohoto důvodu je třeba charakterizovat možnou imunogenicitu klinicky aplikovaných chemoterapeutik, jejichž použití by mohlo významně podpořit koncept chemo - imunoterapie.

Optimalizace výrobního procesu dendritických buněk v GMP kvalitě a charakterizace možné imunogenicity nádorových buněk po ošetření cytostatiky byly hlavním předmětem této práce.

Byla provedena optimalizace protokolu na přípravu dendritických buněk z monocytů. Charakterizovali jsme vliv kultivačních médií a maturních signálů dostupných v GMP kvalitě na charakter připravených dendritických buněk. Zjistili jsme, že všechny zmíněné maturní signály vyvolávají u DC fenotypické změny spojené s maturací, avšak pouze DC připravené v kultivačním médiu CellGro a aktivované pomocí TLR ligandu PolyI:C jsou nejúčinnější v aktivaci specifických T lymfocytů. DC aktivované směsí cytokinů indukují největší populaci regulačních T lymfocytů. Z této práce vyplývá, že v klinických imunoterapeutických studiích se jako optimální protokol jeví příprava DC v bezsérovém médiu CellGro a aktivace DC pomocí PolyI:C. Tento protokol byl schválen Státním ústavem pro kontrolu léčiv pro použití v klinické studii.

Byla provedena komplexní studie zabývající se schopností klinicky aplikovaných chemoterapeutik indukovat imunogenní buněčnou smrt na ovariální (OV90), prostatické (DU145) a leukemické nádorové lince a primárních buňkách karcinomu ovaria a leukemických blastech pacientů s ALL. Zjistili jsme, že pouze antracykliny indukují translokaci CRT, HSP70 a 90 na buněčný povrch a uvolní molekuly HMGB1

po 12 hodinové expozici chemoterapeutiku. Pulzované dendritické buňky nádorovými buňkami ošetřenými antracykliny vykazují fenotypickou maturaci. Zároveň dendritické buňky pulzované nádorovými buňkami po ošetření antracykliny indukují největší populaci protinádorově specifických T lymfocytů. Tato data definují molekulární charakteristiku imunogenní buněčné smrti jako klíčového parametru protinádorové imunitní odpovědi a ukazují možnou strategii imunogenní chemoterapie u onkologických pacientů.

Byly popsány experimentální základy a klíčové myšlenky kombinované chemo-imunoterapie, kterou prezentujeme na kazuistice pacienta s hormon-refrakterním metastatickým nádorem prostaty se špatnou prognózou. Aktivní buněčná imunoterapie pomocí dendritických buněk u pacienta indukovala specifickou protinádorovou odpověď. Kombinovaná chemo-imunoterapie skládající se z chemoterapie a vakcín na bázi DC pulzovaných prostatickými nádorovými buňkami (LNCap) vedla k významnému zlepšení klinických a laboratorních hodnot pacienta. Tato data definují molekulární charakteristiku imunogenní buněčné smrti jako klíčového parametru protinádorové imunitní odpovědi a ukazují možnou strategii imunogenní chemoterapie u onkologických pacientů.

10. Seznam citované literatury

- Ada G. Vaccines and vaccination. *N Engl J Med.* 2001; 345: 1042-53.
- Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Criollo A, Ortiz C, Lidereau R, Mariette C, Chaput N, Mira JP, Delaloge S, André F, Tursz T, Kroemer G, Zitvogel L. The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Immunol Rev.* 2007 Dec; 220:47-59.
- Apetoh L, Tesniere A, Ghiringhelli F, Kroemer G, Zitvogel L. Molecular interactions between dying tumor cells and the innate immune system determine the efficacy of conventional anticancer therapies. *Cancer Res.* 2008 Jun; 68(11):4026-30.
- Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, Stevenson MA, Calderwood SK. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR)2 and TLR4. *J Biol Chem.* 2002 Apr 26; 277(17):15028-34.
- Bach EA, Aguet M, Schreiber RD. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol* 1997; 15:563-91
- Banerjee DK, Dhodapkar MV, Matayeva E, Steinman RM, Dhodapkar KM. Expansion of FOXP3high regulatory T cells by human dendritic cells (DCs) *in vitro* and after injection of cytokine-matured DCs in myeloma patients. *Blood.* 2006 Oct 15; 108(8):2655-61.
- Banchereau J, Palucka AK, Dhodapkar M, Burkeholder S, Taquet N, Rolland A, Taquet S, Coquery S, Wittkowski KM, Bhardwaj N, Pineiro L, Steinman R, Fay J. Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res.* 2001 Sep 1; 61(17):6451-8.
- Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998 Mar 19; 392(6673):245-52.
- Basu S, Binder RJ, Suto R, Anderson KM, Srivastava PK. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol.* 2000 Nov; 12(11):1539-46.
- Baurain JF, Colau D, van Baren N, Landry C, Martelange V, Vikkula M, Boon T, Coule PG. High frequency of autologous anti-melanoma CTL directed against an

- antigen generated by a point mutation in a new helicase gene. *J Immunol* . 2000 Jun 1; 164:6057-6066.
- Becker T, Hartl FU, Wieland F. CD40, an extracellular receptor for binding and uptake of HSP70-peptide complexes. *J Cell Biol*. 2002 Sep 30; 158(7):1277-85.
 - Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, Taylor P, Morimoto RI, Cohen GM, Green DR. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol*. 2000 Aug; 2(8):469-75.
 - Belli F, Testori A, Rivoltini L, Maio M, Andreola G, Sertoli MR, Galino G, Piris A, Cattelan A, Lazzari I, Carrabba M, Scita G, Santantonio C, Pilla L, Tragni G, Lombardo C, Arienti F, Marchiano A, Queirolo P, Bertolini F, Cova A, Lamaj E, Ascani L, Camerini R, Cosi M, Cascinelli N, Lewis JJ, Srivastava P, Parmmiani G. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous tumor -derived heat shock protein gp96-peptide complexes: clinical and immunologic findings. *J Clin Oncol* 2002; 20:4169-4180.
 - Berard F, Blanco P, Davoust J, Neidhart-Berard EM, Nouri-Shirazi M, Taquet N, Rimoldi D, Cerottini JC, Banchereau J, Palucka AK. Cross-priming of naive CD8 T cells against melanoma antigens using dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells. *J Exp Med*. 2000 Dec 4; 192(11):1535-44.
 - Bianchi ME, Beltrame M, Paonessa G. Specific recognition of cruciform DNA by nuclear protein HMG1. *Science*. 1989 Feb 24; 243(4894 Pt 1):1056-9.
 - Binder RJ, Vatner R, Srivastava P. The heat-shock protein receptors: some answers and more questions. *Tissue Antigens*. 2004 Oct; 64(4):442-51.
 - Blander JM, Medzhitov R. Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. *Science*. 2004 May 14; 304(5673):1014-8.
 - Boles KS, Barchet W, Diacovo T, Cella M, Colonna M. The tumor suppressor TSLC1/NECL-2 triggers NK-cell and CD8+ T cell responses through the cell-surface receptor CRTAM. *Blood*. 2005 Aug 1; 106(3):779-86.
 - Bottazzi B, Bastone A, Doni A, Garlanda C, Valentino S, Deban L, Maina V, Cotena A, Moalli F, Vago L, Salustri A, Romani L, Mantovani A. The long pentraxin PTX3 as a link among innate immunity, inflammation, and female fertility. *J Leukoc Biol*. 2006 May; 79(5):909-12.

- Burdelya L, Kujawski M, Niu G, Zhong B, Wang T, Zhang S, Kortylewski M, Shain K, Kay H, Djeu J, Dalton W, Pardoll D, Wei S, Yu H. Stat3 activity in melanoma cells affects migration of immune effector cells and nitric oxide-mediated antitumor effects. *J Immunol.* 2005 Apr 1; 174(7):3925-31.
- Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Prog Rxp Tumor Res* 1970; 13:1-27.
- Casares N, Pequignot MO, Tesniere A, Ghiringhelli F, Roux S, Chaput N, Schmitt E, Hamai A, Hervas-Stubbs S, Obeid M, Coutant F, Métivier D, Pichard E, Aucouturier P, Pierron G, Garrido C, Zitvogel L, Kroemer G. Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *J Exp Med.* 2005 Dec 19; 202(12):1691-701.
- Castedo M, Kroemer G. Mitotic catastrophe: a special case of apoptosis. *J Soc Biol.* 2004; 198(2):97-103.
- Coppolino MG, Woodside MJ, Demaurex N, Grinstein S, St-Arnaud R, Dedhar S. Calreticulin is essential for integrin-mediated calcium signalling and cell adhesion. *Nature.* 1997 Apr 24; 386(6627):843-7.
- Davis NB, Taber DA, Ansari RH, Ryan CW, George C, Vokes EE, Vogelzang NJ, Stadler WM. Phase II trial of PS-341 in patients with renal cell cancer: a University of Chicago phase II consortium study. *J Clin Oncol.* 2004 Jan 1;22(1):115-9.
- De Smet C, Lurquin C, Lethe B, Martelange V, Boon T. DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter. *Mol Cell Biol.* 1999; 19: 7327-7335.
- De Smet C, Lurquin C, van der Bruggen P, De Plaen E, Brasseur F, Boon T. Sequence and expression pattern of the human MAGE2 gene. *Immunogenetics.* 1994; 39:121-129.
- Debatin KM, Krammer PH. Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene.* 2004 Apr 12; 23(16):2950-66.
- Dhodapkar MV, Dhodapkar KM, Palucka AK. Interactions of tumor cells with dendritic cells: balancing immunity and tolerance. *Cell Death Differ.* 2008 Jan; 15(1):39-50.
- Dighe AS, Richards E, Old LJ, et al. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Imunity.* 1994; 1:447-56.

- Doody AD, Kovalchin JT, Mihalyo MA, Hagymasi AT, Drake CG, Adler AJ. Glycoprotein 96 can chaperone both MHC class I- and class II-restricted epitopes for in vivo presentation, but selectively primes CD8+ T cell effector function. *J Immunol.* 2004 May 15; 172(10):6087-92.
- Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The tree Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol.* 2004; 22:329-60.
- Ferrari D, Wesselborg S, Bauer MK, Schulze-Osthoff K. Extracellular ATP activates transcription factor NF-kappaB through the P2Z purinoreceptor by selectively targeting NF-kappaB p65. *J Cell Biol.* 1997 Dec 29; 139(7):1635-43.
- Ferri KF, Kroemer G. Mitochondria--the suicide organelles. *Bioessays.* 2001 Feb; 23(2):111-5.
- Finn OJ, Forni G. Prophylactic cancer vaccines. *Curr Opin Immunol.* 2002 Apr; 14(2):172-7.
- Finn OJ. Cancer vaccines: between the idea and the reality. *Nat Rev Immunol.* 2003 Aug; 3(8):630-41.
- Frank MO, Kaufman J, Tian S, Suárez-Fariñas M, Parveen S, Blachère NE, Morris MJ, Slovin S, Scher HI, Albert ML, Darnell RB. Harnessing naturally occurring tumor immunity: a clinical vaccine trial in prostate cancer. *PLoS One.* 2010 Sep 1;5(9).
- Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, Kroemer G. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ.* 2007 Jul; 14(7):1237-43.
- Gamrekelashvili J, Krüger C, von Wasielewski R, Hoffmann M, Huster KM, Busch DH, Manns MP, Korangy F, Greten TF. Necrotic tumor cell death in vivo impairs tumor-specific immune responses. *J Immunol.* 2007 Feb 1; 178(3):1573-80.
- Gardai SJ, Bratton DL, Ogden CA, Henson PM. Recognition ligands on apoptotic cells: a perspective. *J Leukoc Biol.* 2006 May; 79(5):896-903.
- Ghiringhelli F, Puig PE, Roux S, Parcellier A, Schmitt E, Solary E, Kroemer G, Martin F, Chauffert B, Zitvogel L. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med.* 2005 Oct 3; 202(7):919-29.
- Gorelik L, Flavell RA. Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nat Rev Immunol.* 2002 Jan; 2(1):46-53.

- Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*. 2004 Jul 30; 305(5684):626-9.
- Groenendyk J, Lynch J, Michalak M. Calreticulin, Ca²⁺, and calcineurin - signaling from the endoplasmic reticulum. *Mol Cells*. 2004 Jun 30; 17(3):383-9.
- Guy CT, Webster MA, Schaller M, Parsons TJ, Cardiff RD, Muller WJ. Expression of the neu protooncogene in the mammary epithelium of transgenic mice induces metastatic disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Nov 15; 89(22):10578-82.
- Harada N. Aromatase and intracrinology of estrogen in hormone -dependent tumors. *Oncology*. 1999 Oct; 57 Suppl 2:7-16.
- Hartson SD, Matts RL. Association of Hsp90 with cellular Src -family kinases in a cell-free system correlates with altered kinase structure and function. *Biochemistry*. 1994 Aug 2; 33(30):8912-20.
- Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H, et al. IFN -gamma-mediated inhibition of tumor angiogenesis by natural killer T-cell ligand, alpha-galactosylceramide. *Blood* 2002; 100:1728-33.
- Hingorani SR, Petricoin EF, Maitra A, Rajapakse V, King C, Jacobetz MA, Ross S, Conrads TP, Veenstra TD, Hitt BA, Kawaguchi Y, Johann D, Liotta LA, Crawford HC, Putt ME, Jacks T, Wright CV, Hruban RH, Lowy AM, Tuveson DA. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell*. 2003 Dec; 4(6):437-50.
- Höltl L, Ramoner R, Zelle-Rieser C, Gander H, Putz T, Papesh C, Nussbaumer W, Falkensammer C, Bartsch G, Thurnher M. Allogeneic dendritic cell vaccination against metastatic renal cell carcinoma with or without cyclophosphamide. *Cancer Immunol Immunother*. 2005 Jul; 54(7):663-70.
- Houghton AN, Mintzer D, Cordon-Cardo C, Welt S, Fliegel B, Vadhan S, Carswell E, Melamed MR, Oettgen HF, Old LJ. Mouse monoclonal IgG3 antibody detecting GD3 ganglioside: a phase I trial in patients with malignant melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985 Feb; 82(4):1242-6.
- Hussain SP, Hofseth LJ, Hartus CC. Radical cause of cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:276-85.
- Chaput N, De Botton S, Obeid M, Apetoh L, Ghiringhelli F, Panaretakis T, Flament C, Zitvogel L, Kroemer G. Molecular determinants of immunogenic cell death:

- surface exposure of calreticulin makes the difference. *J Mol Med (Berl)*. 2007 Oct; 85(10):1069-76.
- Chen W, Jin W, Tian H, Sicurello P, Frank M, Orenstein JM, Wahl SM. Requirement for transforming growth factor beta1 in controlling T cell apoptosis. *J Exp Med*. 2001 Aug 20; 194(4):439-53.
 - Cheson BD. Radioimmunotherapy of non-Hodgkin lymphomas. *Blood*. 2003 Jan 15; 101(2):391-8.
 - Ichiki Y, Takenoyama M, Mizukami M, So T, Sugaya M, Yasuda M, So T, Hanagiri T, Sugio K, Yasumoto K. Simultaneous cellular and humoral immune response against mutated p53 in a patient with lung cancer. *J Immunol*. 2004 Apr 15; 172(8):4844-50.
 - Ishii KJ, Suzuki K, Coban C, Takeshita F, Itoh Y, Matoba H, Kohn LD, Klinman DM. Genomic DNA released by dying cells induces the maturation of APCs. *J Immunol*. 2001 Sep 1; 167(5):2602-7.
 - Jonuleit H, Kühn U, Müller G, Steinbrink K, Paragnik L, Schmitt E, Knop J, Enk AH. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol*. 1997 Dec; 27(12):3135-42.
 - Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, et al. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:7556-61.
 - Karanikas V, Colau D, Baurain JF, Chiari R, Thonnard J, Gutierrez -Roelens I, Goffinet C, Van Schaftingen EV, Weynants P, Boon T, Coule PG High frequency of cytolytic T lymphocytes directed against a tumor-specific mutated antigen detectable with HLA tetramers in the blood of a lung carcinoma patient with long survival. *Cancer Res* 2001; 61:3718-3724.
 - Karikó K, Bhuyan P, Capodici J, Weissman D. Small interfering RNAs mediate sequence-independent gene suppression and induce immune activation by signaling through toll-like receptor 3. *J Immunol*. 2004 Jun 1; 172(11):6545-9.
 - Kepp O, Tesniere A, Schlemmer F, Michaud M, Senovilla L, Zitvogel L, Kroemer G. Immunogenic cell death modalities and their impact on cancer treatment. *Apoptosis*. 2009 Apr; 14(4):364-75.

- Kepp O, Tesniere A, Zitvogel L, Kroemer G. The immunogenicity of tumor cell death. *Curr Opin Oncol.* 2009 Jan; 21(1):71-6.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972 Aug; 26(4):239-57.
- Kripke, M.L. Antigenicity of murine skin tumors induced by ultraviolet light. *J Natl Cancer Inst.* 1974; 53:1333-1336.
- Kroemer G, Martin SJ. Caspase-independent cell death. *Nat Med.* 2005 Jul; 11(7):725-30.
- Kryczek I, Wei S, Zou L, Zhu G, Mottram P, Xu H, Chen L, Zou W. Cutting edge: induction of B7-H4 on APCs through IL-10: novel suppressive mode for regulatory T cells. *J Immunol.* 2006 Jul; 177(1):40-4.
- Krysko DV, D'Herde K, Vandenabeele P. Clearance of apoptotic and necrotic cells and its immunological consequences. *Apoptosis.* 2006 Oct; 11(10):1709-26.
- Krysko DV, Leybaert L, Vandenabeele P, D'Herde K. Gap junctions and the propagation of cell survival and cell death signals. *Apoptosis.* 2005 May; 10(3):459-69.
- Krysko DV, Vandenabeele P. From regulation of dying cell engulfment to development of anti-cancer therapy. *Cell Death Differ.* 2008 Jan; 15(1):29-38.
- Kwon MS, Park CS, Choi K, Ahn J, Kim JI, Eom SH, Kaufman SJ, Song WK. Calreticulin couples calcium release and calcium influx in integrin-mediated calcium signaling. *Mol Biol Cell.* 2000 Apr; 11(4):1433-43.
- Lehner T, Wang Y, Whittall T, McGowan E, Kelly CG, Singh M. Functional domains of HSP70 stimulate generation of cytokines and chemokines, maturation of dendritic cells and adjuvanticity. *Biochem Soc Trans.* 2004 Aug; 32(Pt 4):629-32.
- Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Sep; 8(9):741-52.
- Marincola FM, Jaffee EM, Hicklin DJ, Ferrone S. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol.* 2000; 74:181-273.

- Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*. 2006 Mar 9; 440(7081):237-41.
- Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Jürgensmeier JM, Susin SA, Vieira HL, Prevost MC, Xie Z, Matsuyama S, Reed JC, Kroemer G. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science*. 1998 Sep 25; 281(5385):2027-31.
- Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science*. 2002 Apr 12; 296(5566):301-5.
- Miller RA, Maloney DG, McKillop J, Levy R. In vivo effects of murine hybridoma monoclonal antibody in a patient with T-cell leukemia. *Blood*. 1981 Jul; 58(1):78-86.
- Miller RA, Maloney DG, Warnke R, Levy R. Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotypic antibody. *N Engl J Med*. 1982 Mar 4; 306(9):517-22.
- Mohamadzadeh M, Berard F, Essert G, Chalouni C, Pulendran B, Davoust J, Bridges G, Palucka AK, Banchereau J. Interleukin 15 skews monocyte differentiation into dendritic cells with features of Langerhans cells. *J Exp Med*. 2001 Oct 1; 194(7):1013-20.
- Nabarro S, Himoudi N, Papanastasiou A, Gilmour K, Gibson S, Sebire N, Thrasher A, Blundell MP, Hubank M, Canderan G, Anderson J. Coordinated oncogenic transformation and inhibition of host immune responses by the PAX-3-FKHR fusion oncoprotein. *J Exp Med*. 2005 Nov 21; 202(10):1399-410.
- Nanni P, Nicoletti G, De Giovanni C, Landuzzi L, Di Carlo E, Cavallo F, Pupa SM, Rossi I, Colombo MP, Ricci C, Astolfi A, Musiani P, Forni G, Lollini PL. Combined allogeneic tumor cell vaccination and systemic interleukin 12 prevents mammary carcinogenesis in HER-2/neu transgenic mice. *J Exp Med*. 2001 Nov 5; 194(9):1195-205.
- Nathan DF, Lindquist S. Mutational analysis of Hsp90 function: interactions with a steroid receptor and a protein kinase. *Mol Cell Biol*. 1995 Jul; 15(7):3917-25.
- North RJ. Gamma-irradiation facilitates the expression of adoptive immunity against established tumors by eliminating suppressor T cells. *Cancer Immunol Immunother*. 1984; 16(3):175-81.

- Novellino L, Renkvist N, Rini F, Mazzocchi A, Rivoltini L, Greco A, Deho P, Squarcina P, Robbins PF, Parmini G, Castelli C. Identification of a mutated receptor-like protein tyrosine phosphatase kappa as a novel, class II HLA -restricted melanoma antigen. *J Immunol.* 2003 Jun 15; 170(12):6363-70.
- Obeid M, Panaretakis T, Tesniere A, Joza N, Tufi R, Apetoh L, Ghiringhelli F, Zitvogel L, Kroemer G. Leveraging the immune system during chemotherapy: moving calreticulin to the cell surface converts apoptotic death from "silent" to immunogenic. *Cancer Res.* 2007 Sep; 67(17):7941-4.
- Obeid M, Panaretakis T, Joza N, Tufi R, Tesniere A, van Endert P, Zitvogel L, Kroemer G. Calreticulin exposure is required for the immunogenicity of gamma - irradiation and UVC light-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 2007 Oct; 14(10):1848-50.
- Oliver JD, Roderick HL, Llewellyn DH, High S. ERp57 functions as a subunit of specific complexes formed with the ER lectins c alreticulin and calnexin. *Mol Biol Cell.* 1999 Aug; 10(8):2573-82.
- Palucka AK, Dhodapkar MV, Paczesny S, Burkeholder S, Wittkowski KM, Steinman RM, Fay J, Banchereau J. Single injection of CD34+ progenitor -derived dendritic cell vaccine can lead to induction of T-cell immunity in patients with stage IV melanoma. *J Immunother.* 2003 Sep-Oct; 26(5):432-9.
- Pardoll D, Allison J. Cancer immunotherapy: breaking the barriers to harvest the crop. *Nat Med.* 2004 Sep; 10(9):887-92.
- Quaglino E, Iezzi M, Mastini C, Amici A, Pericle F, Di Carlo E, Pupa SM, De Giovanni C, Spadaro M, Curcio C, Lollini PL, Musiani P, Forni G, Cavallo F. Electroporated DNA vaccine clears away multifocal mammary carcinomas in her-2/neu transgenic mice. *Cancer Res.* 2004 Apr 15; 64(8):2858-64.
- Querec T, Bennouna S, Alkan S, Laouar Y, Gorden K, Flavell R, Akira S, Ahmed R, Pulendran B. Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8, and 9 to stimulate polyvalent immunity. *J Exp Med.* 2006 Feb 20; 203(2):413-24.
- Romani N, Gruner S, Brang D, Kämpgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med.* 1994 Jul 1; 180(1):83-93.

- Ronchetti A, Rovere P, Iezzi G, Galati G, Heltai S, Protti MP, Garancini MP, Manfredi AA, Rugarli C, Bellone M. Immunogenicity of apoptotic cells in vivo: role of antigen load, antigen-presenting cells, and cytokines. *J Immunol.* 1999 Jul 1; 163(1):130-6.
- Rovere P, Peri G, Fazzini F, Bottazzi B, Doni A, Bondanza A, Zimmermann VS, Garlanda C, Fascio U, Sabbadini MG, Rugarli C, Mantovani A, Manfredi AA. The long pentraxin PTX3 binds to apoptotic cells and regulates their clearance by antigen-presenting dendritic cells. *Blood.* 2000 Dec 15; 96(13):4300-6.
- Rovere-Querini P, Capobianco A, Scaffidi P, Valentini B, Catalanotti F, Giazzone M, Dumitriu IE, Müller S, Iannaccone M, Traversari C, Bianchi ME, Manfredi AA. HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells. *EMBO Rep.* 2004 Aug; 5(8):825-30.
- Rozková D, Tiserová H, Fucíková J, Last'ovicka J, Podrazil M, Ulcová H, Budínský V, Prausová J, Linke Z, Minárik I, Sedivá A, Spísek R, Bartnková J. FOCUS on FOCIS: combined chemo-immunotherapy for the treatment of hormone-refractory metastatic prostate cancer. *Clin Immunol.* 2009 Apr; 131(1):1-10.
- Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med.* 1994 Apr 1; 179(4):1109-18.
- Santini SM, Lapenta C, Logozzi M, Parlato S, Spada M, Di Pucchio T, Belardelli F. Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice. *J Exp Med.* 2000 May 15; 191(10):1777-88.
- Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2002 Dec; 2(12):965-75.
- Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature.* 2000 Oct 12; 407(6805):784-8.
- Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature.* 2002 Jul 11; 418(6894):191-5.

- Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Chreiber RD. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*. 2001 Apr 26; 410(6832):1107-11.
- Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature*. 2003 Oct 2; 425(6957):516-21.
- Shiratsuchi A, Watanabe I, Takeuchi O, Akira S, Nakanishi Y. Inhibitory effect of Toll-like receptor 4 on fusion between phagosomes and endosomes/lysosomes in macrophages. *J Immunol*. 2004 Feb 15; 172(4):2039-47.
- Schild H, Arnold-Schild D, Lammert E, Rammensee HG. Stress proteins and immunity mediated by cytotoxic T lymphocytes. *Curr Opin Immunol*. 1999 Feb; 11(1):109-13.
- Schultze JL, Vonderheide RH. From cancer genomics to cancer immunotherapy: toward second-generation tumor antigens. *Trends Immunol*. 2001 Sep; 22(9):516 - 23
- Singh-Jasuja H, Toes RE, Spee P, Münz C, Hilf N, Schoenberger SP, Ricciardi-Castagnoli P, Neefjes J, Rammensee HG, Arnold-Schild D, Schild H. Cross-presentation of glycoprotein 96-associated antigens on major histocompatibility complex class I molecules requires receptor-mediated endocytosis. *J Exp Med*. 2000 Jun 5; 191(11):1965-74.
- Smyth MJ, Crowe NY, Godfrey DI. NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. *Int Immunol*. 2001; 13:459-63.
- Smyth MJ, Thia KY, Street SE, et al. Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J Exp Med*. 2000; 191:661-8.
- Spisek R, Bretaudeau L, Barbieux I, Meflah K, Gregoire M. Standardized generation of fully mature p70 IL-12 secreting monocyte-derived dendritic cells for clinical use. *Cancer Immunol Immunother*. 2001 Oct; 50(8):417-27.
- Spisek R, Dhodapkar MV. Immunoprevention of cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2006 Jun; 20(3):735-50.
- Spisek R, Charalambous A, Mazumder A, Vesole DH, Jagannath S, Dhodapkar MV. Bortezomib enhances dendritic cell (DC)-mediated induction of immunity to human myeloma via exposure of cell surface heat shock protein 90 on dying tumor cells: therapeutic implications. *Blood*. 2007 Jun 1; 109(11):4839-45.

- Srivastava P.K, Old L Individually distinct transplantation antigen sof chemically induced mouse tumors. *Immunol Today*. 1988 Mar; 9(3):78-83.
- Stassi G, Todaro M, Zerilli M, Ricci-Vitiani L, Di Liberto D, Patti M, Florena A, Di Gaudio F, Di Gesù G, De Maria R. Thyroid cancer resistance to chemotherapeutic drugs via autocrine production of interleukin -4 and interleukin-10. *Cancer Res*. 2003 Oct 15; 63(20):6784-90.
- Steinman RM, Gutchinov B, Witmer MD, Nussenzweig MC. Dendritic cells are the principal stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *J Exp Med*. 1983 Feb 1; 157(2):613-27.
- Steinman RM, Hawiger D, Liu K, Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, Iyoda T, Ravetch J, Dodapkar M, Inaba K, Nussenzweig M. Dendritic cell fiction in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance. *Ann N Y Acad Sci*. 2003 Apr; 987:15-25.
- Steinman RM, Turley S, Mellman I, Inaba K. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med*. 2000 Feb; 191(3):411-6.
- Street SE, Cretney E, Smyth MJ. Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasi s. *Blood*. 2001; 97(1):192-7.
- Sutmuller RP, van Duivenvoorde LM, van Elsas A, Schumacher TN, Wildenberg ME, Allison JP, Toes RE, Offringa R, Melief CJ. Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med*. 2001 Sep 17; 194(6):823-32.
- Tesniere A, Schlemmer F, Boige V, Kepp O, Martins I, Ghiringhelli F, Aymeric L, Michaud M, Apetoh L, Barault L, Mendiboure J, Pignon JP, Jooste V, van Endert P, Ducreux M, Zitvogel L, Piard F, Kroemer G. Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin. *Oncogene*. 2010 Jan 28; 29(4):482-91.
- Timmerman JM, Singh G, Hermanson G, Hobart P, Czerwinski DK, Taidi B, Rajapaksa R, Caspar CB, Van Beckhoven A, Levy R. Immunogenicity of a plasmid DNA vaccine encoding chimeric idiootype in patients with B -cell lymphoma. *Cancer Res*. 2002 Oct 15; 62(20):5845-52.

- Tobiášová Z, Pospíšilová D, Miller AM, Minárik I, Sochorová K, Spísek R, Rob L, Bartnková J. In vitro assessment of dendritic cells pulsed with apoptotic tumor cells as a vaccine for ovarian cancer patients. *Clin Immunol.* 2007 Jan; 122(1):18-27.
- Uyttenhove C, Pilotte L, Théate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, Boon T, Van den Eynde BJ. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med.* 2003 Oct; 9(10):1269-74.
- van den Broek ME, Kagi D, Ossendorp F, et al. Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J Exp Med.* 1996; 184:1781-90.
- Van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science.* 1991; 254:1643-1647.
- Viguier M, Lemaître F, Verola O, Cho MS, Gorochov G, Dubertret L, Bachelez H, Kourilsky P, Ferradini L. Foxp3 expressing CD4⁺CD25^(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J Immunol.* 2004 Jul 15; 173(2):1444-53.
- Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature.* 1997 Nov; 390(6658):350-1.
- Wadhwa R, Yaguchi T, Hasan MK, Mitsui Y, Reddel RR, Kaul SC. Hsp70 family member, mot-2/mthsp70/GRP75, binds to the cytoplasmic sequestration domain of the p53 protein. *Exp Cell Res.* 2002 Apr 1; 274(2):246-53.
- Wang T, Niu G, Kortylewski M, Burdelya L, Shain K, Zhang S, Bhattacharya R, Gabrilovich D, Heller R, Coppola D, Dalton W, Jove R, Pardoll D, Yu H. Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat Med.* 2004 Jan; 10(1):48-54.
- Wartmann M, Davis RJ. The native structure of the activated Raf protein kinase is a membrane-bound multi-subunit complex. *J Biol Chem.* 1994 Mar 4; 269(9):6695-701.
- Weinschenk T, Gouttefangeas C, Schirle M, Obermayr F, Walter S, Schoor O, Kurek R, Loeser W, Eichler KH, Wernet D, Stefanovic S, Rammensee HG. Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines. *Cancer Res* 2002; 15:5818-5827.

- Wong LH, Krauer KG, Hatzinisiiriou I, et al. Interferon-resistant human melanoma cells are deficient in ISGF3 components. STAT 1, STAT2, and p48-ISGF3gamma. *J Biol Chem* 1997; 272:28779-85.
- Zitvogel L, Casares N, Péquignot MO, Chaput N, Albert ML, Kroemer G. Immune response against dying tumor cells. *Adv Immunol.* 2004; 84:131-79.
- Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol.* 2006 Oct; 6(10):715-27.

11. Seznam vlastních publikací

Zahrani ní publikace:

Rozkova D, Tiserova H, **Fucikova J**, Lastovicka H, Podrazil M, Ulcova H, Budinsky V, Prausova J, Linke Z, Minarik I, Sediva A, Spisek R, Bartunkova J. Combined chemo-immunotherapy for the treatment of hormone-refractory metastatic prostate cancer. **Clin Immunol.** 2009 Apr; 131(1):1-10. **IF=3,932**

Fucikova J, Kralikova P, Fialova A, Brtnicky T, Rob L, Bartunkova J, Spisek R Human tumor cells killed by antracyclines induce a tumor-specific immune response. **Cancer Research.** 2011 Jul 15; 71(14):4821-33. **IF=8,234**

Fucikova J, Rozkova D, Ulcova H, Bartunkova J, Spisek R Generation of clinical-grade dendritic cell-based vaccine for immunotherapy of ovarian cancer . **Journal of Translation Medicine** 2011. Accepted for publication. **IF=3,51**

Stepanek I, Indrova M, Bieblova J, **Fucikova J**, Spisek R, Bubenik J and Reinis M. Effects of 5-azacytidine and Trichostatin A on Dendritic Cell Maturation. **JBRHA** . Accepted for publication. **IF=3,167**

Publikace v domácím tisku:

Fucikova J, Kucera A, Bartunkova J, Spisek R. Role imunitního systému v obraně proti nádorům a strategie protinádorové imunoterapie. **Alergie.** 2008 Feb; 10:119-125