

Význam imunogenní buněčné smrti v protinádorové imunitě

The Concept of Immunogenic Cell Death in Antitumor Immunity

Fučíková J., Bartůňková J., Špišek R.

Ústav imunologie, 2. LF UK a FN v Motole, Praha
Sotio a. s., Praha

Souhrn

Z imunologického hlediska lze buněčnou smrt nádorových buněk rozlišit na imunogenní a neimunogenní v závislosti na podnětu, který ji vyvolává. Imunogenní buněčná smrt na rozdíl od fyziologické apoptózy vede ke stimulaci imunitního systému pomocí molekul, které jsou označovány jako DAMPs (danger associated molecular pattern). V prvních hodinách imunogenní buněčné apoptózy dochází k rychlé translokaci chaperonového proteinu kalretikulinu a proteinů teplotního stresu 70 a 90 (heat-shock – HSP70 a HSP90) z endoplazmatického retikula na buněčný povrch. Následně dochází k aktivní sekreci molekuly adenosintrifosfátu a pasivnímu uvolnění nukleárního proteinu HMGB1 do extracelulárního prostoru. Společnou vlastností těchto molekul je aktivace buněk imunitního systému, zejména pak dendritických buněk, které se řadí mezi profesionální antigen prezentující buňky, které následně aktivují protinádorovou imunitní odpověď. Cílem tohoto souhrnného článku je popsat dosud známé induktory imunogenní buněčné smrti a jejich vliv na protinádorovou imunitní odpověď.

Klíčová slova

kalretikulin – dendritická buňka – imunogenní buněčná smrt – protinádorová imunitní odpověď

Summary

Cancer cell death can be immunogenic or nonimmunogenic depending on the initiating stimulus. The immunogenic characteristics of immunogenic cell death are mainly mediated by damage-associated molecular patterns represented by preapoptotic exposure of calreticulin and heat shock proteins (HSP70 and HSP90) from endoplasmic reticulum at the cell surface and active secretion of adenosintriphosphate. Other damage-associated molecular patterns are produced in late stage apoptosis as high mobility group box 1 protein (HMGB1) into the extracellular milieu. Such signals operate on various receptors expressed by antigen presenting cells, mainly by population of dendritic cells, to stimulate the activation of antigen specific T-cell response. In this review, we describe the current known immunogenic cell death inducers and their potential to activate antitumor immune response.

Key words

calreticulin – dendritic cell – immunogenic cell death – antitumor immune response

Práce byla podpořena granty IGA MZ ČR – NT 12402-5 a MZ ČR – RVO, FN v Motole 00064203.

This work was supported by grant IGA MH CZ – NT 12402-5 and MH CZ – DRO, University Hospital Motol, Prague, Czech Republic 00064203.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zaslané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



PharmDr. Jitka Fučíková, Ph.D.
Ústav imunologie
2. LF UK a FN v Motole
a Sotio a. s.
V Úvalu 84
150 06 Praha 5
e-mail: fucikova@sotio.com

Obdrženo/Submitted: 29. 7. 2015
Přijato/Accepted: 1. 10. 2015

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20154S48>

Úvod

Nové poznatky v oblasti nádorové biologie ukazují, že imunitní systém je schopen rozpoznat neoplastické nádorové buňky a zničit je dříve, než se projeví jako klinicky závažné onemocnění. Složky imunity hrají důležitou roli i při léčbě klinicky detekovatelných nádorů a podporují účinek některých protinádorových léčiv [1]. Základním předpokladem pro rozpoznání nádorových buněk imunitním systémem je existence

nádorově specifických, resp. asociovaných antigenů. Ty mohou být v menší či větší míře exprimovány nádorovou buňkou a napomáhat její identifikaci buňkami imunitního systému [2]. Z experimentů je však známo, že nádory rostoucí v imunodeficitním jedinci jsou mnohem více imunogenní než nádory rostoucí u imunokompetentního jedince. Imunitní systém totiž vyvíjí na nádorové buňky neustálý selekční tlak, který vede k výběru variant transformovaných

buněk, které dokážou uniknout efektorovým mechanismům imunitního systému. Tato hypotéza se nazývá „cancer immune editing“, tj. editace nádoru imunitním systémem a popisuje tři odlišné úrovně boje imunitního systému proti nádorovým buňkám – eliminaci transformované buňky (elimination), ustanovení rovnováhy mezi transformovanou buňkou a organizmem (equilibrium) a únik transformované buňky před kontrolou imunitním systémem (escape) [3].

Tab. 1. Induktory ICD I. a II. třídy v léčbě nádorových onemocnění, jejich hlavní imunogenní vlastnosti a vliv na imunitní systém.

Induktor ICD	Klinická aplikace	Produkce DAMP	Vztah k imunitnímu systému	Reference
induktor I. třídy				
mitoxanton antracykliny	leukemie, lymfomy, dětské nádory, karcinom vaječníků a prsu	pre-apoptotická exprese CRT , produkce ATP buňkami ve fázi časné apoptózy, pasivní uvolnění HMGB1	↑ infiltrace nádorového mikroprostředí CD8 T lymfocyty a $\gamma\delta$ Th17 lymfocyty, ↑ produkce IFN- γ CD8 T lymfocyty	[9,14,16,18]
oxaliplatin	karcinom tlustého střeva a GITU	pre-apoptotická exprese CRT , aktivní sekce ATP a post-apoptotické uvolnění molekuly HMGB1	↑ exprese PD-L1 na povrchu plazmacytoidních DC	[6,21]
cyklofosfamid	leukemie, mnohočetný myelom, karcinom plic, prsu a varlat	pre-apoptotická exprese CRT , pasivní uvolnění HMGB1 ve fázi pozdní apoptózy	↓ infiltrace nádorového mikroprostředí Tregs, ↑ infiltrace DC a CD8 T lymfocyty	[23,24,27]
bortezomib	mnohočetný myelom	exprese chaperonových proteinů CRT , HSP70 a HSP90 v procesu časné fáze apoptózy	↑ procento IFN- γ produkujících buněk, ↑ NK a CD8 buněčnou cytotoxicitu	[10,29,30]
UVC záření	příprava imunoterapeutických vakcín	pre-apoptotická exprese CRT a HSP70 a produkce HMGB1	↑ procento IFN- γ produkujících CD8 T lymfocytů, ↑ cytotoxicity mediované NK buňkami	[31–33,36]
radioterapie	většina karcinomů	pre-apoptotická exprese CRT a HSP70 a uvolnění molekuly HMGB1 v pozdní fázi apoptózy	↑ infiltrace nádorového mikroprostředí aktivovanými DC, ↑ produkce IFN- γ T lymfocyty, ↑ infiltrace CD4 a CD8 T lymfocyty, ↓ infiltrace Tregs	[12,34,35,37]
vysoký hydrostatický tlak (HHP)	příprava imunoterapeutických vakcín	pre-apoptotická exprese CRT , HSP70 a HSP90 , uvolnění ATP v časné fázi apoptózy, a uvolnění HMGB1 v pozdní fázi apoptózy	↑ aktivace DC, ↑ IFN- γ produkujících T lymfocytů (<i>in vitro</i>), ↓ procenta Tregs <i>in vitro</i>	[15,40]
induktor II. třídy				
fotodynamická terapie hypericinem	velké množství karcinomů	pre-apoptotická exprese CRT a HSP70 a uvolnění ATP v časné fázi apoptózy	↑ aktivace DC, ↑ produkce IL-1 β ↑ NO a ↓ IL-10 populací DC, ↑ expanze CD4 a CD8 T lymfocytů	[11,17,41,42]
coxsackie virus B3	ve fázi výzkumu	exprese CRT a sekrece ATP v časné fázi apoptózy	vliv na populaci NK buněk klíčových pro úspěch terapie	[43]

ICD – imunogenní buněčná smrt, DAMP – danger associated molecular pattern, CRT – kalretikulín, ATP – adenosintrifosfát, HMGB1 – high mobility group box 1, DC – dendritické buňky, Tregs – regulační T lymfocyty

V klinické praxi se nádory diagnostikují nejčastěji až ve fázi úniku. Imunitní systém přestane v této fázi detekovat nádorovou buňku jako cizího vetřelce, nebojuje s ní a dochází k progresi nádorového onemocnění. Ukazuje se, že řada klinicky používaných léčebných strategií působí částečně mechanismem zvyšování imunogenicity nádorových buněk. Nádorové buňky, které v důsledku účinku léčebných metod zahynou tzv. imunogenní buněčnou smrtí (immunogenic cell death – ICD), aktivují imunitní mechanismy, které tak přispívají k eliminaci nebo alespoň kontrole růstu nádoru i v jeho pokročilých stádiích.

Imunogenní buněčná smrt nádorových buněk

Z imunologického hlediska lze buněčnou smrt nádorových buněk rozlišit na imunogenní, kdy je buňka schopna indukovat specifickou imunitní odpověď, a tolerogenní, při které je naopak výsledkem tolerance k zabití buňce [4]. Apoptóza byla velice dlouho považována za imunologicky tichý typ buněčné smrti. Nekróza byla označována za imunogenní, neboť při ní dochází k porušení plazmatické membrány a uvolnění buněčných komponent a prozánětlivých cytokinů. Toto dogma bylo v uplynulých 10 letech popřeno řadou prací popisujících význam imunogenní apoptózy navozené různými modalitami a upozorňujících na její význam v konceptu ICD (tab. 1) [5]. Z těchto prací vyplývá, že typ buněčné smrti neurčuje, zda jde o imunogenní smrt, rozhodující je typ podnětu, který buněčnou smrt zahájí [6]. ICD na rozdíl od fyziologické apoptózy vede ke stimulaci imunitního systému pomocí molekul, které jsou označovány jako DAMPs (danger associated molecular pattern). DAMPs mají za fyziologických podmínek řadu funkcí ovlivňujících metabolismus, proliferaci a komunikaci buněk [7]. Pokud se nádorová buňka dostane do stresového prostředí, jsou tyto molekuly exprimovány na buněčném povrchu nebo uvolňovány do mezibuněčného prostoru v nádorovém ložisku, kde aktivují různým způsobem rozličné složky imunity a obvykle indukují protinádorovou imunitní reakci [7,8]. V prv-

ních hodinách imunogenní buněčné apoptózy dochází k: **1.** rychlé translokaci chaperonového proteinu kalretikulinu (calreticulin – CRT) [9] a proteinů teplotního stresu 70 a 90 (heat-shock – HSP70 a HSP90) z endoplazmatického retikula (ER) na buněčný povrch [10]. Následně dochází k **2.** aktivní sekreci molekuly ATP (adenosintrifosfát) [11] a **3.** pasivnímu uvolnění nukleárního proteinu HMGB1 (high mobility group box 1) [12] do extracelulárního prostoru. Společnou vlastností těchto molekul je aktivace buněk imunitního systému, zejména pak dendritických buněk (dendritic cells – DC), které se řadí mezi profesionální antigen prezentující buňky (antigen presenting cell – APC) [13]. Význam těchto molekul pro aktivaci imunitního systému byl prokázán na mnoha *in vitro* modelech nádorových buněk [11,14–16] a v *in vivo* myších imunizačních experimentech [17–19]. Řada preklinických a retrospektivních prací dokumentuje klinický význam DAMP molekul pro predikci prognózy pacientů s nádorovými chorobami [5]. Vyšší exprese DAMP molekul na nádorových buňkách nebo jejich vyšší koncentrace v nádorovém mikroprostředí jsou spojovány s lepší prognózou onemocnění.

Induktory imunogenní buněčné smrti

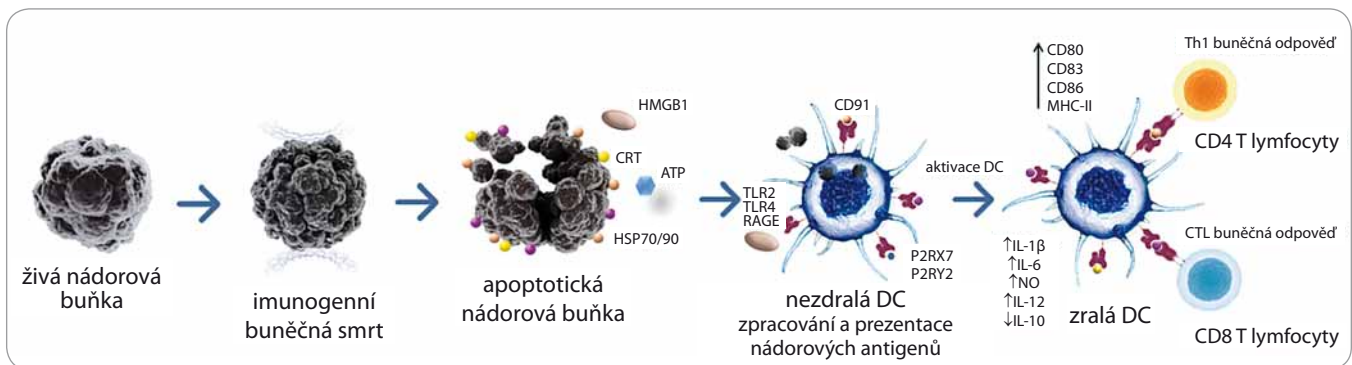
Jako první induktory ICD byly popsány v letech 2002–2006 chemoterapeutika mitoxantron, antracykliny (doxorubicin a idarubicin) [14,16] a radioterapie [12]. V současné době je identifikována skupina chemoterapeutik a fyzikálních modalit, jejichž společnou vlastností je indukovat imunogenní smrt nádorových buněk (tab. 1) [6]. Díky mnoha biologickým a chemickým odlišnostem těchto modalit vznikl nový systém klasifikace na induktory I. a II. třídy [17]. Induktory imunogenní smrti, které způsobují stres ER nepřímo přes cytozolické proteiny, proteiny plazmatické membrány a DNA replikaci jsou označovány jako induktory I. třídy [17]. Do této skupiny řadíme některá chemoterapeutika (mitoxantron, antracykliny, oxaliplatin a bortezomib) a fyzikální modalit (UVC záření, radioterapie a vysoký hydrostatický tlak). Naopak modalit, které

primárně indukují stres ER, jsou označovány jako induktory II. třídy a řadíme mezi ně zejména fotodynamickou terapii a některé onkolytické viry [17]. Společným rysem obou skupin induktorů je přímá (II. třída) či nepřímá (I. třída) aktivace stresu ER, díky které dochází k fosforylaci eukaryotického translačního iniciačního faktoru eIF2 α pomocí serin-threonin kinázy PERK. Následuje proteolýza proteinu BAP31 mediovaná kaspázou-8 a aktivace proapoptotických proteinů BAX a BAK. Následně je CRT transportován z ER do Golgiho aparátu a pomocí exocytózy přenesen na buněčný povrch [9]. Blokáce jakéhokoliv proteinu v této dráze znemožní expresi CRT, zastaví ICD a redukuje imunitní odpověď navozenou imunogenní modalitou [9].

Induktory I. třídy

Antracykliny a mitoxantron

Antracykliny jsou více než 40 let používány v terapii nádorů dětského věku, leukemií, lymfomů a také v léčbě nádorů prsu a vaječníků. Do této skupiny látek řadíme zejména doxorubicin, idarubicin a mitoxantron [18]. Antracykliny se vyznačují mnoha cytostatickými a cytotoxickými vlastnostmi zprostředkovanými zejména interkalací DNA a inhibicí DNA topoizomerázy II vedoucí k apoptóze nádorových buněk. V uplynulých 10 letech se ukázalo, že právě tento typ buněčné smrti nese klíčové znaky imunogenní apoptózy zahrnující pre-apoptotickou expresi CRT [16], uvolnění molekuly ATP a HMGB1 ve fázi pozdní apoptózy [12]. Význam exprese a uvolnění těchto molekul byl ověřen v *in vivo* profylaktických imunizačních experimentech na myších modelech [12,16,19]. Exprese CRT na povrchu nádorových buněk po ošetření antracykliny předchází jakýmkoliv morfologickým znakům apoptózy a objevuje se před vystavením samotného fosfatidylserinu [16]. Po rozpoznání CRT na povrchu nádorové buňky populací APC dojde k pohlčení nádorové buňky a aktivaci APC (zejména DC). Populace DC následně aktivuje T lymfocytární protinádorovou odpověď (obr. 1) [16]. Molekula ATP produkovaná v časně fázi apoptózy zesiluje migraci monocytů a makrofágů do nádorového ložiska [20]. Molekula



Obr. 1. Indukce protinádorové odpovědi imunogenní nádorovou buňkou.

Nádorová buňka ošetřená imunogenním induktorem I. či II. třídy exprimuje a uvolňuje molekuly souhrnně označované DAMPs v různých fázích apoptózy. Mezi zmíněné DAMPs se řadí CRT, HSP70 a HSP90, HMGB1 a ATP. Tyto molekuly se váží na klíčové receptory na povrchu DC jako je TLR4 (pro HMGB1 a HSP70), P2RX7/P2RY2 (pro ATP) a CD91 (pro CRT a HSPs). Pomocí těchto interakcí dochází k intenzivní fagocytóze nádorových buněk a fenotypické (zvýšení exprese kostimulačních a povrchových molekul např. CD80, CD83, CD86 a HLA-DR) a funkční aktivaci populace DC (produkce cytokinů IL-12, IL-6 a IL-1β). Maturované DC exprimují nádorově specifické antigeny na povrchu MHC molekul I. a II. třídy a indukují vznik protinádorově specifických CD4 a CD8 T lymfocytů. Upraveno a převzato: Sotio.com.

DC – dendritické buňky, CTL – cytotoxický T lymfocyt

ATP dále vazbou na purinergní receptor P2RX7 na povrchu DC způsobí jejich maturaci díky aktivaci NALP3 inflamazomu. Aktivovaná DC následně produkuje cytokin IL-1β nezbytný pro aktivaci antigen specifických T lymfocytů (obr. 1). V pozdních fázích apoptózy dochází k uvolňování molekuly HMGB1, která vazbou na TLR-4 receptor indukuje tzv. cross prezentaci nádorových antigenů DC [12].

Oxaliplatin

Oxaliplatin se řadí mezi platinová cytostatika. Chemicky reaktivní látky patří do této skupiny reagují s DNA, která se jejich působením štěpí, či dochází k pevnému spojení dvou řetězců DNA. Všechny tyto změny vedou k nesprávné funkci buňky, zástavě buněčného dělení a buněčné smrti. Vedle silného cytotoxického působení se oxaliplatin (na rozdíl od cisplatin) vyznačuje schopností navozovat ICD, což bylo demonstrováno profylaktickou vakcinací na myších modelech [21]. ICD navozená tímto platinovým derivátem je charakterizována pre-apoptotickou expresí CRT, aktivní sekrecí ATP a post-apoptotickým uvolněním molekuly HMGB1 (tab. 1) [21]. Léčba oxaliplatinou vede ke zvýšení exprese HLA molekul I. třídy na povrchu nádorových buněk, což napomáhá imunitnímu systému tyto buňky identifikovat a odstraňovat [22]. Z nedávno

publikované studie vyplývá, že *in vitro* aplikace oxaliplatin zvyšuje expresi molekuly PD-L1 na povrchu plazmacytoidních DC, které následně napomáhají T lymfocytární proliferaci a indukci protinádorové odpovědi.

Cyklofosfamid

Cyklofosfamid (CTX) je používán v terapii nádorových onemocnění od roku 1959, kdy byl schválen americkým úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA). V porovnání s ostatními chemoterapeutiky, které patří do skupiny DNA-alkylujících látek, CTX aktivuje imunitní systém a vykazuje antiangiogenní vlastnosti. Imunogenní vlastnosti CTX byly prokázány na imunokompetentních a nude myších s mezoteliomem [23]. Pouze ve skupině imunokompetentních myší docházelo k regresi nádoru a ochraně proti živým nádorovým buňkám při preventivní vakcinaci. Imunogenní vlastnosti CTX jsou charakterizovány rychlou pre-apoptotickou expresí CRT a pasivním uvolněním molekuly HMGB1 (tab. 1) [17]. Fagocytóza nádorových buněk ošetřených CTX vede k fenotypické a funkční (produkce cytokinů IL-1β, IL-6 a IL-12) aktivaci DC (obr. 1). Aplikace *in vivo* selektivně snižuje procento CD8α⁺ DC v sekundárních lymfoidních orgánech u myší, způsobuje expanzi DC v periferní krvi a zvyšuje infiltraci DC v nádorovém ložisku a ve spá-

dové lymfatické uzlině. Ve stejné studii bylo demonstrováno, že *in vitro* kultivace DC získaných z CTX léčených myší s populací regulačních T lymfocytů inhibuje jejich imunopresivní vlastnosti a dochází k aktivaci protinádorové imunitní odpovědi [24]. Další klinicky významnou vlastností CTX je schopnost navodit lymfodepleci některých subpopulací lymfocytů. Metronomické dávky CTX (v dávce cca 50 mg/kg na myš; 100 mg/den na pacienta) navozují selektivní depleci regulačních T lymfocytů v periferní krvi, lymfoidní tkáni a nádorovém ložisku [25]. U pacientů léčených CTX je však situace komplexnější a publikovaná data nejsou jednotná: při léčbě CTX dochází pouze k nesignifikantnímu snížení procenta regulačních T lymfocytů v periferní krvi. V nádorovém mikroprostředí těchto pacientů bylo identifikováno zvýšené procento CD11c⁺, CD68⁺ a CD8⁺ buněk a snížené procento CD25⁺ buněk [26]. Zároveň dochází během terapie CTX k produkci cytokinů stimulujících Th1 buněčnou odpověď v periferní krvi [27]. Tento fakt vysvětluje, proč u pacientů léčených CTX dochází k infiltraci CD8 T lymfocytů do nádorového ložiska. U léčených pacientů dochází naopak ke snížení hladiny cytokinů IL-10, TGF-β a NO v periferní krvi.

CTX patří mezi významné ICD induktory, který se vyznačuje mnoha imunomodu-

lačními vlastnostmi. Jeho efekt je však více než u jiných cytostatik závislý na dávce.

Bortezomib

Bortezomib, inhibitor proteazomu, byl schválen americkou FDA v roce 2003 pro léčbu pacientů s mnohočetným myelomem (Velcade). Proteazomální degradace hraje zásadní roli v proteinovém metabolismu buňky a podílí se na řízení buněčného cyklu, reparaci genomové DNA či mezibuněčné komunikaci. Pomocí tohoto děje jsou v buňce eliminovány chybně přepsané či nesprávně sestavené proteiny. Vazbou bortezomibu na podjednotku 26S proteazomu dochází k zástavě buněčného cyklu ve fázi G2/M vedoucí k apoptóze nádorových buněk. Imunogenní vlastnosti bortezomibu byly demonstrovány na myších léčených pomocí DC vakcíny pulzované nádorovými buňkami prsní žlázy ošetřenými bortezomibem. Takto léčené myši byly následně chráněny před formací transplantabilního nádoru [28]. Na základě těchto výsledků bylo později popsáno, že rozhodující roli v protinádorové imunitě aktivované bortezomibem má populace NK buněk a CD8 T lymfocytů [29]. Nádorové buňky ošetřené bortezomibem indukují aktivaci DC závislou na buněčném kontaktu a buněčné fagocytóze [10]. Tato stimulace je zprostředkována zejména díky expresi proteinů teplotního šoku (HSP70 a HSP90) a CRT na povrchu nádorových buněk po ošetření bortezomibem (tab. 1). Blokáce proteinů teplotního stresu a CRT pomocí specifických protilátek snižuje fenotypickou aktivaci DC pouze částečně. Naopak maturace DC je silně ovlivněna při použití protilátek proti CD91 receptoru či jeho down-regulací [30]. Aktivované DC následně indukují produkci IFN- γ protinádorově specifickými T lymfocyty [10].

Přes zmíněné pozitivní vlastnosti bortezomibu *in vitro* a *in vivo* je třeba zmínit, že přímá aplikace bortezomibu snižuje expresi MHC (major histocompatibility complex) molekul na povrchu DC [29] a snižuje životnost některých buněk imunitního systému (populací plazmacytoidních a myeloidních DC, aktivovaných T lymfocytů a DC derivovaných z monocytů), bez významného vlivu na populaci CD3 T lymfocytů.

UVC záření

Prozánětlivé působení UVC záření v kůži bylo poprvé zmíněno před 30 lety. Později byla popsána schopnost záření aktivovat ICD pomocí profylaktických imunizačních experimentů na imunokompetentních myších modelech [31]. V závislosti na použitém modelu UVC způsobuje jak apoptotickou, tak nekrotickou smrt nádorových buněk. Z popsaných DAMP molekul klíčových pro koncept ICD UVC indukuje pre-apoptotickou expresi CRT a HSP70 a produkci HMGB1 (tab. 1). *In vitro* inkubace nádorových buněk ošetřených UVC s nezralými DC vede k intenzivní fagocytóze i v porovnání s nádorovými buňkami ošetřenými γ -iradiací. Tento proces vede k aktivaci DC, které indukují protinádorovou CD8T lymfocytární odpověď (obr. 1) [32]. Významnou roli v protinádorové imunitě aktivované UVC ošetřenými nádorovými buňkami hrají i NK buňky. Případná deplece NK buněk signifikantně snižuje cytotoxické vlastnosti splenocytů [31]. UVC přímo ovlivňuje produkci klíčových cytokinů pomocí aktivace NF- κ B a AP-1 signálních drah, což bylo demonstrováno v několika experimentálních studiích [33].

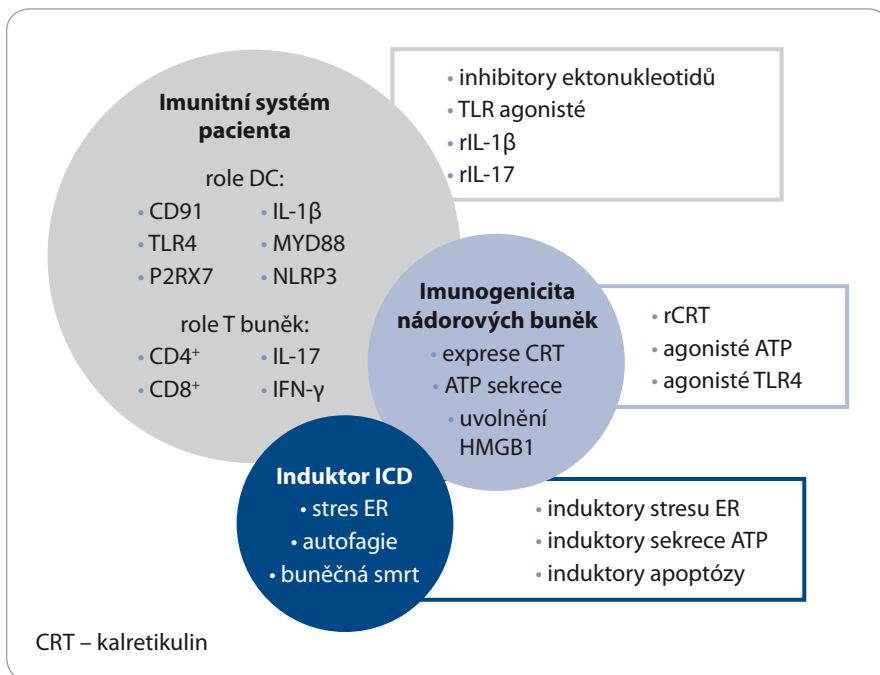
Radioterapie

Protinádorový účinek radioterapie je založený na porušení chemických vazeb mezi lipidovými membránami, proteiny a nukleovými bázemi DNA nádorových buněk. Vysoké dávky záření způsobují poškození DNA v rozsahu, které reparační mechanismy již nedokážou napravit, a dochází k aktivaci buněčné apoptózy. Vedle přímého vlivu radioterapie na nádorové buňky je třeba se zmínit o tzv. abскопálních (vzdálených) účincích. Mezi možné abскопální účinky radioterapie patří zpomalení růstu nádoru mediované T lymfocyty daleko od vlastního místa působení záření. Tento fenomén byl popsán u pacientů s rozličnými malignitami. Tento efekt může být vysvětlen imunogenními vlastnostmi záření, které byly prokázány *in vitro* u nádorových buněk, zároveň *in vivo* v myších modelech a v léčbě onkologických pacientů [34,35]. ICD indukovaná radioterapií je charakterizována pre-apoptotickou expresí CRT a HSP70 a uvolněním

molekuly HMGB1 v pozdní fázi apoptózy (tab. 1) [36]. Lokální vysokodávková radioterapie vede k infiltraci nádorového ložiska aktivovanými DC [37]. Zároveň bylo popsáno, že DC pulzované buňkami melanomu ošetřenými zářením analogickým radioterapii jsou schopné indukovat T lymfocytární odpověď [38]. Toto tvrzení bylo doloženo *in vivo* v myších modelech, kde ozářené B16 (nádorová linie melanomu) nádorové buňky aplikované v imunizačních experimentech vedly k aktivaci IFN- γ produkujících splenocytů a imunitě proti živým nádorovým buňkám při profylaktické imunizaci. Z publikovaných výsledků vyplývá, že protinádorový efekt radioterapie je z části založen na T lymfocytární odpovědi. V souladu s tímto pozorováním jsou i výsledky studie, které ukazují, že ozářené nádorové buňky jsou ve větší míře rozpoznávány T lymfocyty *in vitro* a zvyšují účinnost adoptivní imunoterapie *in vivo* [39]. Radioterapie také snižuje procento regulačních T lymfocytů v periferní krvi, což je do velké míry závislé na dávce záření.

Vysoký hydrostatický tlak

Vysoký hydrostatický tlak (high hydrostatic pressure – HHP) v rozsahu 1–100 MPa je považován za fyziologický a působí reverzibilní morfologické změny buňky. Naopak hodnoty tlaku v rozmezí 150–250 MPa indukují buněčnou apoptózu jak u lidských, tak myších nádorových buněk. Nekrotická buněčná smrt je navozená HHP o hodnotách vyšších než 250 MPa [40]. Vlivem HHP dochází v nádorových buňkách k inhibici syntézy buněčných proteinů a zpomalení enzymatických funkcí. ICD navozená HHP byla nejprve popsána Gaijplem a spolupracovníky jako možná metoda ošetření nádorových buněk při výrobě protinádorové vakcíny [40]. Naše skupina v nedávno publikované studii identifikovala HHP jako induktor ICD u lidských nádorových buněk prostaty, ovarií a akutní myeloidní leukemie. Ošetření nádorových buněk HHP vede k rychlé translokaci chaperonových proteinů CRT, HSP70 a HSP90 na buněčný povrch a uvolnění molekuly ATP v prvních hodinách apoptózy. V pozdních fázích buněčné smrti dochází k uvol-



Obr. 2. Využití imunogenní buněčné smrti v konceptu protinádorové terapie a možné strategie navození imunogenní buněčné smrti *in vivo*.

ICD je závislá na kombinaci tří faktorů: 1. typu induktoru buněčné smrti, 2. imunitním systému pacienta a 3. imunogenicitě nádorových buněk. Pouze adekvátní kombinace těchto tří parametrů navozuje optimální imunogenicitu nádorových buněk. Modalita, které nejsou schopné indukovat expresi CRT jako důsledek stresu ER, uvolnění ATP na základě aktivace autofágie a HMGB1 molekuly v průběhu sekundární nekrózy, nejsou schopné indukovat ICD. Z podobného důvodu nádorové buňky deficientní na mechanismus exprese CRT, sekrece ATP a HMGB1 nemohou podlehnout ICD. V takových případech je možné kompenzovat tyto nedostatky pomocí rozličných přístupů, jak ukazuje obrázek, např. aplikací induktorů stresu ER přímo do nádorového ložiska, rekombinantním (r)CRT, inhibitory ektonukleotidů, agonistů P2RX7, rIL-17 a rIL-1 β . Na základě těchto výsledků může vzniknout protinádorová terapie šitá na míru konkrétnímu pacientovi, respektující typ daného nádorového mikroprostředí, benefit aplikované chemoterapie a imunitního systému léčného pacienta. Upraveno a převzato: Kroemer et al [5].

nění jaderného proteinu HMGB1 do okolí nádorové buňky. Expres a uvolnění zmíněných DAMP molekul má vliv na fenotypickou i funkční maturaci DC a indukci protinádorové imunitní odpovědi, bez indukce imunosupresivní populace regulačních T lymfocytů (obr. 1) [15]. Imunogenicitá nádorových buněk ošetřených HHP *in vivo* je předmětem profylaktických a terapeutických experimentů na myších modelech. HHP není sice technicky možné použít přímo jako léčebnou modalitu, ale je možné tento postup využít pro standardizovanou přípravu imunogenních nádorových buněk. Z tohoto důvodu byl HHP implementován do výrobního protokolu imunoterapeutické vakcíny na bázi DC. HHP je používán k ošetření nádoro-

vých buněk, které slouží jako zdroj nádorových antigenů pro aktivaci DC [25]. V současné chvíli probíhá několik klinických studií fáze II a III u karcinomu prostaty, ovarií a plic, které využívají tento výrobní postup pro zhotovení individuálního léčivého přípravku DCVAC.

Induktory II. třídy **Fotodynamická terapie**

Fotodynamická terapie (PDT) představuje léčebnou metodu založenou na akumulaci fotosenzitivní látky v nádorových buňkách a její aktivaci světlem určitého spektra vedoucí k produkci reaktivních kyslíkových radikálů (reactive oxygen species – ROS). Právě produkce ROS způsobí aktivaci buněčné apoptózy v místě nádorové buňky, kde došlo k na-

hromadění fotosenzitivní látky. Fotodynamická terapie aktivovaná hypericinem patří mezi induktory ICD II. třídy. Hypericin je primárně akumulován v oblasti ER nádorových buněk a po aplikaci záření dochází k indukci stresu ER. Nádorové buňky ošetřené hyp-PDT jsou ve zvýšené míře fagocytovány DC a způsobují jejich aktivaci [41]. Populace zralých DC následně indukuje protinádorovou T lymfocytární odpověď [41]. Takto ošetřené nádorové buňky exprimují CRT, HSP70 a aktivně sekretují ATP. Zároveň dochází k pasivnímu uvolnění HSPs do extracelulárního prostředí nádorových buněk [42]. V porovnání s ostatními popsány ICD induktory Hyp-PDT indukuje vysoce účinnou ICD, která je charakterizována zejména 1. zvýšenou expresí pre-apoptotických DAMP molekul nádorovými buňkami v porovnání s radioterapií a chemoterapií; 2. translokací CRT nezávislou na dalších DAMP molekulách (např. ERp57), se kterými vytváří komplexy; 3. jednoduchým způsobem přenosu DAMPs z intracelulárních kompartmentů na buněčný povrch bez zapojení většího množství mediátorů buněčných drah [17]. Mezi další významné imunostimulační vlastnosti Hyp-PDT se řadí inhibice produkce cytokinů, které podporují proliferaci nádorových buněk, jako je TNF, IL-6 a GM-CSF. Hyp-PDT zároveň snižuje produkci metaloproteinázy-9 nádorovými buňkami, enzymu, který je zodpovědný za invazivitu nádorových buněk do okolních tkání. Na druhou stranu však léčba Hyp-PDT způsobuje nejen poškození nádorových buněk, ale také nevratné změny stromatu a buněk imunitního systému v celém nádorovém mikroprostředí.

Coxackie viry B3

Coxackie viry CVB3 patří do skupiny RNA onkolytických virů, které se replikují v cytosolu hostitelských buněk, kde způsobují nezvratné změny metabolismu, homeostázy a způsobují buněčnou smrt. Produkce proteinů virových obalů hostitelskou buňkou vyvolává stres ER, díky čemuž dochází k indukci imunogenní apoptózy. Vlivem CVB3 virů dochází ke zvýšení imunogenicity nádorového mikroprostředí, zejména díky zvýšení angiogeneze a infiltrací

CD8 T lymfocytů. CVB3 viry indukují expresi CRT a sekreci ATP v časně fázi apoptózy, v pozdních fázích apoptózy sice dochází k uvolnění HMGB1 z jádra do cytosolu, nedojde však k jeho uvolnění do extracelulárního prostoru (tab. 1). Analýza nádorů izolovaných z nude myši po inkubaci s CVB3 viry prokázala akumulaci makrofágů, DC buněk, granulocytů a NK buněk. Přítomnost granulocytů a NK buněk je klíčová pro úspěšnou léčbu pomocí CVB3 virů. Schopnost způsobit imunogenní smrt nádorové buňky a aktivovat imunitní systém je připisována i jiným onkolytickým virům [43].

Shrnutí

ICD nádorových buněk nepochybně hraje úlohu v aktivaci mechanismů protinádorové imunity. V současné chvíli však stále chybí detailní identifikace vlivu induktorů buněčné smrti na imunitní systém *in vivo*. Používané léčebné strategie ovlivňují současně jak nádorovou buňku, tak i buňky imunitního systému. Tyto složité interakce a jejich konečný efekt jsou závislé na druhu nádoru, jeho stadiu, použité léčebné strategii i individuální reaktivitě konkrétního pacienta. Klinicky zajímavou otázkou otevřenou pro další vědeckou práci představuje role konceptu ICD v identifikaci nových biomarkerů predikujících odpověď pacientů na protinádorovou léčbu. Z tohoto důvodu je třeba data získaná převážně v *in vitro* pokusech a *in vivo* zvířecích modelech ověřit v klinických studiích, charakterizovat roli jednotlivých DAMPs u rozličných malignit a snažit se najít korelaci s klinickým průběhem onemocnění markerů ICD. Na základě těchto výsledků pak může vzniknout protinádorová terapie šitá na míru konkrétnímu pacientovi, respektující typ daného nádorového mikroprostředí, benefit aplikované terapie a individuální reaktivitu imunitního systému léčeného pacienta (obr. 2).

Literatura

1. Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C et al. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2012; 12(4): 298–306. doi: 10.1038/nrc3245.
2. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* 2006; 6(10): 715–727.

3. Mittal D, Coutin MM, Schreiber RD et al. New insights into cancer immunoediting and its three component phases – elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol* 2014; 27: 16–25. doi: 10.1016/j.coi.2014.01.004.
4. Green DR, Ferguson T, Zitvogel L et al. Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nat Rev Immunol* 2009; 9(5): 353–363. doi: 10.1038/nri2545.
5. Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O et al. Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu Rev Immunol* 2013; 31: 51–72. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-100008.
6. Dudek AM, Garg AD, Krysko DV et al. Inducers of immunogenic cancer cell death. *Cytokine Growth Factor Rev* 2013; 24(4): 319–333. doi: 10.1016/j.cytogfr.2013.01.005.
7. Garg AD, Nowis D, Golab J et al. Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: an emerging amalgamation. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1805(1): 53–71. doi: 10.1016/j.bbcan.2009.08.003.
8. Garg AD, Dudek AM, Agostinis P. Cancer immunogenicity, danger signals, and DAMPs: what, when, and how? *Biofactors* 2013; 39(4): 355–367. doi: 10.1002/biof.1125.
9. Panaretakis T, Kepp O, Brockmeier U et al. Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *EMBO J* 2009; 28(5): 578–590. doi: 10.1038/emboj.2009.1.
10. Spisek R, Charalambous A, Mazumder A et al. 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; 109(11): 4839–4845.
11. Garg AD, Krysko DV, Verfaillie T et al. A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death. *EMBO J* 2012; 31(5): 1062–1079. doi: 10.1038/emboj.2011.497.
12. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A et al. The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Immunol Rev* 2007; 220: 47–59.
13. Krysko DV, Vandenabeele P. From regulation of dying cell engulfment to development of anti-cancer therapy. *Cell Death Differ* 2008; 15(1): 29–38.
14. Fucikova J, Kralikova P, Fialova A et al. Human tumor cells killed by anthracyclines induce a tumor-specific immune response. *Cancer Res* 2011; 71(14): 4821–4833. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0950.
15. Fucikova J, Moserova I, Truxova I et al. High hydrostatic pressure induces immunogenic cell death in human tumor cells. *Int J Cancer* 2014; 135(5): 1165–1177. doi: 10.1002/ijc.28766.
16. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* 2007; 13(1): 54–61.
17. Krysko DV, Garg AD, Kaczmarek A et al. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2012; 12(12): 860–875. doi: 10.1038/nrc3380.
18. Apetoh L, Mignot G, Panaretakis T et al. Immunogenicity of anthracyclines: moving towards more personalized medicine. *Trends Mol Med* 2008; 14(4): 141–151. doi: 10.1016/j.molmed.2008.02.002.
19. Michaud M, Martins I, Sukkurwala AQ et al. Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science* 2011; 334(6062): 1573–1577. doi: 10.1126/science.1208347.
20. Elliott MR, Chekeni FB, Trampont PC et al. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* 2009; 461(7261): 282–286. doi: 10.1038/nature08296.
21. Tesniere A, Schlemmer F, Boige V et al. Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin. *Oncogene* 2010; 29(4): 482–491. doi: 10.1038/onc.2009.356.
22. Liu WM, Fowler DW, Smith P et al. Pre-treatment with chemotherapy can enhance the antigenicity and immunogenicity of tumours by promoting adaptive im-

3. mune responses. *Br J Cancer* 2010; 102(1): 115–123. doi: 10.1038/sj.bjc.6605465.
23. Schiavoni G, Sisti A, Valentini M et al. Cyclophosphamide synergizes with type I interferons through systemic dendritic cell reactivation and induction of immunogenic tumor apoptosis. *Cancer Res* 2011; 71(3): 768–778. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2788.
24. Nakahara T, Uchi H, Lesokhin AM et al. Cyclophosphamide enhances immunity by modulating the balance of dendritic cell subsets in lymphoid organs. *Blood* 2010; 115(22): 4384–4392. doi: 10.1182/blood-2009-11-251231.
25. Podrazil M, Horvath R, Becht E et al. Phase I/II clinical trial of dendritic-cell based immunotherapy (DCVAC/PCa) combined with chemotherapy in patients with metastatic, castration-resistant prostate cancer. *Oncotarget* 2015; 6(20): 18192–18205.
26. Audia S, Nicolas A, Cathelin D et al. Increase of CD4+ CD25+ regulatory T cells in the peripheral blood of patients with metastatic carcinoma: a phase I clinical trial using cyclophosphamide and immunotherapy to eliminate CD4+CD25+ T lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 2007; 150(3): 523–530.
27. Matar P, Rozados VR, Gervasoni SI et al. Th2/Th1 switch induced by a single low dose of cyclophosphamide in a rat metastatic lymphoma model. *Cancer Immunol Immunother* 2002; 50(11): 588–596.
28. Demaria S, Santori FR, Ng B et al. Select forms of tumor cell apoptosis induce dendritic cell maturation. *J Leukoc Biol* 2005; 77(3): 361–368.
29. Schumacher LY, Vo DD, Garban HJ et al. Immunosenescence of tumor cells to dendritic cell-activated immune responses with the proteasome inhibitor bortezomib (PS-341, Velcade). *J Immunol* 2006; 176(8): 4757–4765.
30. Cirone M, Di Renzo L, Lotti LV et al. Primary effusion lymphoma cell death induced by bortezomib and AG 490 activates dendritic cells through CD91. *PLoS One* 2012; 7(3): e31732. doi: 10.1371/journal.pone.0031732.
31. Begovic M, Herberman R, Gorelik E. Increase in immunogenicity and sensitivity to natural cell-mediated cytotoxicity following *in vitro* exposure of MCA105 tumor cells to ultraviolet radiation. *Cancer Res* 1991; 51(19): 5153–5159.
32. Brusa D, Garetto S, Chiorino G et al. Post-apoptotic tumors are more palatable to dendritic cells and enhance their antigen cross-presentation activity. *Vaccine* 2008; 26(50): 6422–6432. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.08.063.
33. Wu S, Tan M, Hu Y et al. Ultraviolet light activates NFκappaB through translational inhibition of IκappaBα synthesis. *J Biol Chem* 2004; 279(33): 34898–34902.
34. Ma Y, Conforti R, Aymeric L et al. How to improve the immunogenicity of chemotherapy and radiotherapy. *Cancer Metastasis Rev* 2011; 30(1): 71–82. doi: 10.1007/s10555-011-9283-2.
35. Hodge JW, Ardiani A, Farsaci B et al. The tipping point for combination therapy: cancer vaccines with radiation, chemotherapy, or targeted small molecule inhibitors. *Semin Oncol* 2012; 39(3): 323–339. doi: 10.1053/j.seminoncol.2012.02.006.
36. Obeid M, Panaretakis T, Joza N et al. Calreticulin exposure is required for the immunogenicity of gamma-irradiation and UVC light-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 2007; 14(10): 1848–1850.
37. Huang J, Wang Y, Guo J et al. Radiation-induced apoptosis along with local and systemic cytokine elaboration is associated with DC plus radiotherapy-mediated renal cell tumor regression. *Clin Immunol* 2007; 123(3): 298–310.
38. Strome SE, Voss S, Wilcox R et al. Strategies for antigen loading of dendritic cells to enhance the antitumor immune response. *Cancer Res* 2002; 62(6): 1884–1889.

39. Garnett CT, Palena C, Chakraborty M et al. Sublethal irradiation of human tumor cells modulates phenotype resulting in enhanced killing by cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res* 2004; 64(21): 7985–7994.
40. Weiss EM, Meister S, Janko C et al. High hydrostatic pressure treatment generates inactivated mammalian tumor cells with immunogenic features. *J Immunotoxicol* 2010; 7(3): 194–204. doi: 10.3109/15476911003657414.
41. Garg AD, Krysko DV, Vandenabeele P et al. Hypericin-based photodynamic therapy induces surface exposure of damage-associated molecular patterns like HSP70 and calreticulin. *Cancer Immunol Immunother* 2012; 61(2): 215–221. doi: 10.1007/s00262-011-1184-2.
42. Garg AD, Krysko DV, Vandenabeele P et al. DAMPs and PDT-mediated photo-oxidative stress: exploring the unknown. *Photochem Photobiol Sci* 2011; 10(5): 670–680. doi: 10.1039/c0pp00294a.
43. Coffin RS. From virotherapy to oncolytic immunotherapy: where are we now? *Curr Opin Virol* 2015; 13: 93–100. doi: 10.1016/j.coviro.2015.06.005.