

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Survivin a nádorová imunoterapie

Bakalářská práce

Anna Venhauerová

Školitel: RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice 2018

Venhauerová, A., 2018: Survivin a nádorová imunoterapie. [Survivin and cancer immunotherapy. Bc. Thesis, in Czech] - 92 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The main goal of this thesis was to study combination of our contemporary immunotherapy based on specific and nonspecific immunity with survivin inhibition. I studied molecular structure of survivin, his cellular localization, functions but in particular his targeting and blocking and possible positive and negative consequences on immune system and immunotherapy. Finally, I suggested possibilities of including survivin in our immunotherapy.

Prohlášení:

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 11. 4. 2018

.....
Anna Venhauerová

Poděkování:

V první řadě bych chtěla poděkovat svému školiteli RNDr. Janu Ženkovi, CSc. za odborné vedení, přátelský přístup a ochotu s čímkoli a kdykoli pomoci a za jeho otevřenost k novým nápadům směřování této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a partnerovi za trpělivost, kterou se mnou měli nejen při psaní této práce, ale i během celého studia.

Obsah

1 Úvod	1
2 Cíle práce	3
3 Rakovina.....	4
3.1 Klasifikace nádorů	4
3.1.1 Sarkom	5
3.1.2 Melanom.....	5
3.1.3 Pankreatický adenokarcinom	6
4 Nádorová terapie.....	7
4.1 Operativní zákrok	7
4.2 RT(radioterapie).....	7
4.3 Chemoterapie	8
4.4 Imunoterapie	8
5 Imunitní systém	9
5.1 Vrozená (nespecifická) imunita	10
5.1.1 Buněčné složky vrozené imunity	11
5.1.2 Humorální složky vrozené imunity	16
5.1.3 Zánět.....	19
5.2 Získaná (specifická) imunita.....	22
5.3 Dendritické buňky.....	24
6 Způsoby úniku rakovinných buněk před imunitním systémem	24
7 Rakovinné antigeny	27
8 Nádorová imunoterapie	28
8.1 Protinádorové zbraně imunitního systému	28
8.2 Imunoterapie založená na principech vrozené imunity	28
8.3 Imunoterapie založená na principech získané imunity	30
8.4 Naše imunoterapie	32

9 Inhibitory apoptózy (IAPs).....	37
9.1 Struktura a rozdělení IAPs	37
9.2 IAPs a inhibice kaspáz.....	38
9.2.1 Cesty aktivace kaspáz.....	38
10 Survivin	39
10.1 Molekulární struktura survivinu	41
10.2 Buněčná lokalizace survivinu	42
10.3 Survivin a rakovinné kmenové buňky	43
10.4 Výskyt survivinu u různých typů malignit	44
10.5 Survivin-prognostický marker	45
10.6 Funkce survivinu.....	45
10.6.1 CPC komplex	45
10.6.2 Survivin- inhibitor apoptózy	46
10.6.3 Survivin a drug resistance	48
10.6.4 Survivin-podpora angiogeneze, metastáz a chemoresistence	49
10.7 Targeting a blokace survivinu.....	51
11 Diskuze	56
12 Závěr.....	63
13 Seznam zkratk.....	64
14 Použitá literatura.....	68

1 Úvod

Rakovina, slovo jež ve většině lidí vzbuzuje strach, bezmoc a paniku zda právě je a nebo jejich blízké tato zákeřná a mnohdy nemilosrdná nemoc nedožene. Smrt je dalším slovem, na které si často nedovolují myslet. Bolest, chemoterapie, radioterapie, další bolest, ztráta vlasů a nevolnost spojená s chemoterapeutiky, to vše se honí v hlavách nemocných a jejich blízkých. Naděje to je slovo, které se vybaví mně, hned za zády se snahou. Snahou něco změnit, vybudovat a pomoci. Snahou změnit pohled na klasickou léčbu rakoviny, kdy nejčastější metodou je stále chemoterapie a radioterapie. Způsoby léčby, které mají tolik vedlejších účinků na organismus, nahradit léčbou využívající zbraně, které má každý z nás. Efektory imunitního systému-imunoterapii, nebo alespoň tyto klasické metody o tento způsob léčby rozšířit a posílit tak, aby byl co neúčinnější, když nám již nic jiného nezbyde.

Způsob léčby, kterým se zabýváme, je právě zmíněná imunoterapie, která je založena na aktivaci imunitního systému proti nádorovým buňkám, využívající principy jak vrozené tak i získané imunity. V minulosti se kolektiv Dr. Ženky věnoval myším modelům melanomu, sarkomu a pankreatického adenokarcinomu. Maligní melanom je nádor neuroektodermového původu patřící mezi nádory s nejrychlejším růstem incidence. V České republice bylo v roce 2014 diagnostikováno 22 nových pacientů na 100 000 obyvatel za rok, kdy 4 lidé na 100 000 obyvatel na tuto chorobu zemřeli. Oproti pankreatickému adenokarcinomu je mortalita zhruba střední (Lakomý, 2017).

V současnosti je naše pozornost nejvíce věnována pankreatickému adenokarcinomu. Pankreatický adenokarcinom, neboli rakovina slinivky břišní je celosvětově 4. nejčastější příčinou úmrtí způsobenou rakovinou. Česká republika je druhou zemí s nejvyšší incidencí, incidence tohoto onemocnění v posledních 20-30 letech kontinuálně narůstá. Incidence je téměř shodná s její mortalitou. 2191, to je číslo odpovídající množství pacientů, které touto nemocí onemocnělo v roce 2014, toto číslo je shodné s lidmi, kteří na stejnou chorobu v roce 1995 zemřeli (Karásek, 2017). Z výše zmíněných faktů je zřejmé, jakým je rakovina slinivky břišní vážným onemocněním, patří mezi nejagresivnější druhy rakoviny, kdy jsou naděje na vyléčení mizivé.

Avšak panu doktorovi Ženkovi a jeho kolektivu se v posledních letech podařilo vytvořit směsici látek, která je vysoce efektivní, dochází nejen k vyléčení nádoru, dlouhodobému přežití, ale díky imunologické paměti i k účinné obraně při retransplantaci. Účinnější formou aplikace se jeví intratumorální podání na rozdíl od systémového, kde

výsledky nejsou tak uspokojivé. V současné době Dr. Ženka rozšířil svůj zájem o problematiku metastáz, jak je úspěšně cílit, oslabit, zneškodnit a o jakou látku naší terapii rozšířit tak, aby došlo k naplnění našich cílů. U metastáz naše léčba není natolik úspěšné jako u primárních nádorů, lze je hůře cílit, neboť nelze v každém případě použít intratumorální vakcinaci a systémová vakcinace nebývá tak přesná a účinná, navíc metastázy jsou rovněž jako primární nádory vybaveny řadou únikových mechanismů.

V této souvislosti mě napadlo naši imunoterapii rozšířit o problematiku survivinu. Survivin je protein, který má řadu funkcí, které pomáhají nádorovým buňkám být nesmrtelnými. Tento protein bojuje za nádorové buňky a znemožňuje jim naslouchat signálům vedoucím k programované buněčné smrti, tedy k apoptóze. Navíc u nádorů vyvolává chemoresistenci vůči chemoterapeutikům, podporuje angiogenezi, reguluje buněčný cyklus a proliferaci (Chen a kol.,2016). Proto by teoreticky jeho blokací mělo dojít k oslabení nádorů i metastáz a k podpoře naší terapie, nicméně bude třeba zjistit, zda je jeho blokace možná a pro naši imunoterapii výhodná.

2 Cíle práce

*Survivin, jeho výskyt, význam a mechanismus působení.

*Survivin u nádorových onemocnění, možnosti terapeutických zásahů a kombinace s nádorovou imunoterapií.

3 Rakovina

Rakovina je skupinou heterogenních onemocnění, kde abnormální buněčný růst s potenciálem napadat ostatní části lidského těla, přebírá kontrolu nad normální homeostázou. Může být bez včasné a správné léčby pro organismus fatální (Garg a kol., 2016). Rakovina vzniká původně z jedné jediné buňky, v níž došlo k mutaci. Tato buňka přestává odpovídat na signály vedoucí k programované buněčné smrti a začne se nekontrolovatelně dělit, při čemž přenáší svůj genom do dceřiných buněk. Jedná se o autonomní proliferaci často nedostatečně diferenciovaných buněk (Chabner a Chabner Thompson, 2013).

Charakteristickým znakem rakovinných buněk jsou biologické schopnosti získané během vícestupňového procesu vzniku nádorů. Mezi tyto schopnosti patří: stálost signalizace pro proliferaci, snaha vyhnout se růstovým supresorům, odolnost vůči signálům vedoucím k programované buněčné smrti, replikační nesmrtelnost, indukce angiogeneze a aktivace invaze metastáz a hlavně způsoby, kterými rakovinné buňky unikají imunitnímu dohledu, přeprogramování energetického metabolismu, vyhýbání se ničení imitním systémem a mikroprostředí nádoru vytvářené zdánlivě normálními buňkami. Tyto schopnosti rakoviny tvoří jakýsi logický rámec pro pochopení pozoruhodné rozmanitosti neoplastických onemocnění (Hanahan a Weinberg, 2011).

Imunitní systém pravděpodobně hraje významnou roli při eliminaci brzkých stádií rakoviny a premaligních buněk, neboť právě imunodeficientní stavy se vyskytují u řady druhů rakovin, především těch, které jsou spojeny s virovou infekcí, nebo u nádorů lymfatického systému a kůže (Chabner a Chabner Thompson, 2013).

3.1 Klasifikace nádorů

V současné době existují studie potvrzující existenci 100 a více druhů rakoviny (Hanahan a Weinberg, 2011; Hong a Cho, 2006). Na základě jejich chování, můžeme nádory rozdělit na: nádory pravé a pseudotumory. Nádory pravé pak na *benigni* a *maligní*.

Benigní nádory jsou nádory nezhoubné, netvoří metastázy a stavba jejich buněk se neliší od stavby buněk tkáně z níž vznikly, často mají ovoidní tvar a jsou opouzdřené. Jejich nebezpečnost spočívá až v druhotném znaku, kdy se stávají neustále většími a tak utlačují ostatní tkáně a orgány. Mohou být bolestivé, uvolňovat hormony, či krvácet. Tyto vlivy jsou řízeny místem jejich výskytu.

Nás daleko více zajímají **maligní nádory**, které se svou buněčnou stavbou liší od tkání, kde rostou, zpravidla je tato tkáň tvořena nezralými buňkami a proto je někdy obtížné

rozlišit zda se jedná o nádor, nebo zdravou tkáň. Často je velmi obtížné rozpoznat, kde končí a proto vznikají obtíže při jejich odstranění. Pokud chirurg neodstraní veškerou maligní tkáň, dochází ke znovuobjevení nádoru a jeho metastazování. K ohraničení se často používá doplňující léčba např. chemoterapie, aby došlo k zapouzdření nádoru a jeho odstranění bylo tak přesnější. Svým růstem ničí okolní tkáň, neutlačuje, ale přímo jimi prorůstá. Nádory zhoubné často rostou rychleji a agresivněji než nádory nezhoubné a jejich charakteristickou vlastností je metastázování.

Naše terapie se v minulých letech zabývala léčbou sarkomu a melanomu, v současné době jsme svou pozornost přesunuli na léčbu pankreatického adenokarcinomu u myších modelů.

3.1.1 Sarkom

Sarkom je zhoubným nádorem podpůrné pojivové tkáň. Z anatomického hlediska může být sarkom všudypřítomný, není omezen jen na jedno místo výskytu. Existuje i velká řada různých histotypů např. liposarkomy a fibrosarkomy. Mimo pohybový aparát se sarkomy setkáváme prakticky kdekoli od břišní dutiny, nitrohruční oblasti až po sarkomy retroperitonea aj.

Každoročně je v České republice diagnostikováno 350 nových případů tohoto onemocnění. Sarkomy měkkých tkání (CD49) se každoročně v ČR vyskytují v počtu 250 pacientů z nichž 100-130 pacientů na toto onemocnění zemře. Sarkomy se v malém množství vyskytují v dětském a mladém věku, avšak jejich incidence s věkem pomalu narůstá. Nejvyšší počet nemocných se pohybuje mezi 50. až 70. rokem života. Sarkomy dutiny břišní a retroperitonea (CD48) se každoročně objeví u cca 100 pacientů z nichž 60 až 70 případů na toto onemocnění zemře (Žaloudík, 2010).

3.1.2 Melanom

Melanom je maligním onemocněním melanocytů, tedy buněk, které produkují pigment tzv. melanin. Maligní melanom (MM) se nejčastěji vyskytuje na pokožce, ale může se objevit i v uších, gastrointestinálním traktu, očích, ústech či genitální mukózní sliznici, nebo v leptomeninges (McCourt a kol., 2014). Mechanismus díky kterému se z normálního melanocytu stane buňka maligního melanomu není zcela objasněn. Předpokládá se, že dojde k vícestupňovitému procesu genetických mutací, který naruší buněčný cyklus a činí tak melanocyty více náchylné vůči karcinogenním účinkům UVR (UV-radiation) (Demierre a kol., 2003).

Nejvyšší množství pacientů na světě je v Austrálii v oblasti Queenslandu, kde v přepočtu na 100 000 obyvatel trpí touto nemocí 57 lidí. Na druhém místě je Izrael, kde je tento poměr 40 pacientů na 100 000 obyvatel. U mladšího obyvatelstva je tato incidence vcelku stabilní, avšak začíná narůstat přímoúměrně věku a u pacientů nad 50 let tato incidence narůstá každým rokem o 3% (Melichar a kol., 2015). V ČR je každým rokem podle databáze NOR 20-30 nových případů na 100 000 obyvatel, s nárůstem o 35,8 % za posledních 10 let (Melichar a kol., 2015). Patří nám 9. místo v Evropském žebříčku incidence a 23. místo v mortalitě (Ferlay a kol., 2015). V ČR je hodnota pětiletého přežití u pacientů, kteří procházejí léčbou tvořena až 85%, u stádia IV nemoci pak 27% (Pavlík a kol., 2014).

3.1.3 Pankreatický adenokarcinom

Pankreatický adenokarcinom je maligním karcinomem, který vzniká nejčastěji v exokrynní části pankreatu. Lze ho rozdělit na ductální adenokarcinom, který tvoří více jak 90% případů, dále pak cystické nádory, lymfomy, neuroendokrinní nádory aj. (Jemal a kol., 2003).

Pankreatický adenokarcinom je nejvíce smrtící karcinom ze všech druhů lidské rakoviny (Lowenfels a kol., 2000). Nejvyšší incidence a mortalita se vyskytuje ve vyspělých zemích. Pětileté přežití u rakoviny pankreatu činí kolem 5%. Příčiny jeho vzniku nejsou zcela objasněny, ale mezi rizikové faktory patří, podobně jako u ostatních typů rakovin, kouření, pozitivní rodinná anamnéza, genetika, obezita, diabetes mellitus, stravovací návyky, alkohol. Pankreatický adenokarcinom je dle údajů ÚZIS z roku 2005, 7. nejčastějším maligním onemocněním v ČR. Tato malignita se vyskytuje často s přibývajícím věkem nejčastěji v rozmezí 60.-80. roku života (Hlavsa a kol., 2008). Nejčastější příčinou vzniku je přetrvávající chronická pankreatitida a kouření (Talamini a kol., 1999). Většina pankreatického adenokarcinomu se vyskytuje v hlavě pankreatu, tento výskyt tvoří 50-70% celkového výskytu. Prognóza těchto pacientů není příliš valná, i po provedení kurativní R0 resekci se jejich prognóza příliš nemění. Celkové přežití do 5 let činí v ČR pouze 10% s mediánem přežití 18 měsíců. Pokud pacienti trpí inoperabilním karcinomem, většina z nich se nedožije 12 měsíců od data nálezu (Hlavsa a kol., 2008).

4 Nádorová terapie

Cílem léčby pacientů s rakovinou je: vyléčit tuto nemoc, prodloužit dobu přežití a zlepšit kvalitu jejich života (Meiliana a kol., 2016). Možnosti léčby rakoviny se v posledních desetiletích dramaticky změnily. Doby, kdy operativní zákrok a radioterapie byly jedinou efektivní cestou k vyléčení rakoviny jsou dávno pryč. V současné době se do popředí dostávají metody využívající molekulárních znaků nádorů, které veřejnou společností nejsou natolik známé jako běžné metody, kterými jsou např. radioterapie, operativní zákrok, chemoterapie, nebo endokrinní léčba (Urruticoechea a kol., 2010).

4.1 Operativní zákrok

Operativní zákrok je neúčinnější léčbou lokalizovaného primárního nádoru s odstraněním poblíž se vyskytujících lymfatických uzlin, u nichž mohlo dojít k infiltraci rakovinnými buňkami. Pokud je operace používána jako jediná forma léčby, léčí více pacientů než kterákoliv jiná forma léčby, protože operace působí kinetikou nultého řádu, dochází tedy k zabití hned 100% buněk, které byly vyoperovány. S objevem konzervativních léčebných postupů, kterými jsou radioterapie, která se objevila ve 20. letech 20. století a chemoterapie na počátku 40. let 20. století se tyto druhy léčby začaly kombinovat (Urruticoechea a kol., 2010).

4.2 RT(radioterapie)

RT je začleněna do více než 45% případů a toto číslo neustále roste (Delaney a kol., 2005). RT tvoří 40% celkové léčby rakoviny, což velmi příznivě ovlivňuje poměr nákladů a efektivity, neboť je RT zodpovědná pouze za 5% celkových nákladů vynaložených na léčbu rakoviny v průmyslových zemích. RT jako vnější paprsek a/nebo brachyterapie (léčba zářením na krátkou vzdálenost) se používají nejčastěji jako kurativní léčba různých typů nádorů např. raná stádia rakoviny krku a hlavy, prostaty, nebo časná fáze Hodgkinovy choroby. Nejčastěji se však RT používá ve spojitosti s operací a/nebo chemoterapií. Předoperační RT je v dnešní době omezeno místem výskytu nádoru, nejčastěji se používá u rektálního a ezofageálního karcinomu, zatímco pooperační RT se používá různě, např. u nádoru prsu a CNS. Existuje i tzv. intraoperační RT, kdy se příležitostně dodá jedna frakce elektronů, nebo nízkoenergetických fotonů během chirurgického zákroku (Urruticoechea a kol., 2010).

4.3 Chemoterapie

Chemoterapie je dalším z možných léčebných postupů, kdy jsou do těla vpravovány chemické látky (cytostatika), která narušují buněčný cyklus (především buněčné dělení) nejen nádorových buněk, ale všech buněk, které se rychle dělí. Tato terapie by se dala označit jako systémové trávení pacienta, jejíž koncentrace jedu však nevede ke smrti. Tato terapie, dle mého názoru, má ze všech nejvíce nepříznivých účinků, nedá se úspěšně cílit a postihuje všechny buňky lidského těla. Naším cílem je tyto invazivní metody nahradit něčím, co pro tělo nebude toxické, něčím co bude pro tělo přirozené, proto se zabýváme imunoterapií, nikoli systémovým trávením.

Dalšími metodami, které nejsou již tak veřejností známé jsou např. genové terapie, hormonální terapie, či námi používaná imunoterapie.

4.4 Imunoterapie

Několik dekad trvající experimenty objasnily, že nádorové buňky jsou schopné imunitní systém narušit, potlačit a přemoci. Proto je cílem imunoterapie nasměřovat imunitní systém pacienta proti rakovině. Většina mechanismů imunoterapie spočívá ve snaze rozpoznat a zničit rakovinné buňky imunitním systémem (Weintraub, 2013).

Imunitní systém poskytuje organismu obranu proti cizím antigenům. Toho je využito při cílení antigenů na povrchu rakovinných buněk pomocí monoklonálních protilátek. Dalším významným mechanismem je blokáda kontrolních bodů, které blokují inhibující endogenní odpověď na rakovinné bujení pomocí protilátek. Tato cesta je pak zablokována a nádory jsou lépe rozpoznatelné imunitním systémem (Meiliana a kol., 2016).

To jsou jen dva způsoby využití imunitního systému pro zacílení rakovinných buněk, existuje jich samozřejmě mnohem víc. O nich se budeme bavit níže a následně se zaměříme především na principy naší imunoterapie. Buňky imunitního systému v nádorovém mikroprostředí hrají významnou roli při regulaci a progresi nádoru. Proto je stimulace imunitních reakcí proti nádoru atraktivním terapeutickým cílem (Meiliana a kol., 2016).

Není překvapením, že i naše imunoterapie využívá principů a mechanismů imunitního systému, kdy z počátku nastupuje vrozená imunita a postupem času je přes dendritické buňky a makrofágy zapojena i imunita získaná. Proto je nutné připomenout si funkce a význam imunitního systému jako celku, tak i mechanismy vrozené a získané imunity.

5 Imunitní systém

Imunitní systém je soubor mechanismů, který organismu zajišťuje integritu (nedoknutelnost) a stálost vnitřního prostředí (homeostázu). Jeho hlavní funkcí je rozpoznání „cizího“ a „vlastního“, na základě tohoto principu je schopný vyhodnotit možné nebezpečí škodlivých struktur, patogenů, které jsou zevního i vnitřního původu (Hořejší a Bartůňková, 2009).

Mikroorganismy, patogeny, nádorové buňky na svém povrchu nesou tzv. antigeny, což jsou látky, které jsou pro organismus cizí a IS (imunitní systém) je schopný takové látky rozpoznat. IS nás chrání před převzetím kontroly nad tělem jinými genomy než, které byly kódovány v zárodečné linii (Nathan a kol., 2002). Klíčovou roli v této ochraně hraje schopnost imunitního systému zabít vše, co vyhodnotí jako cizí.

Mechanismus účinku spočívá:

1. obranyschopnost – organismus a jeho imunitní systém je schopný rozpoznat vnější škodliviny, patogeny, mikroorganismy, viry aj., vyhodnotit jejich nebezpečnost a ochránit organismus před nimi i jejich toxickými produkty.

2. autotolerance – IS je schopný rozpoznat látky, orgány, struktury sobě vlastní a udržuje toleranci IS. Pokud dojde k poruše autotolerance, dochází k tvorbě autoimunitní odpovědi. Mezi autoimunitní onemocnění patří např. celiakie, roztroušená skleróza a revmatoidní artritida.

3. imunitní dohled – imunitní dohled udržuje dozor nad vnitřním prostředím a možností vzniku endogenních patogenů, rozlišuje a je schopný likvidovat pozměněné buňky, které jsou staré, poškozené, zmutované atd. (Hořejší a Bartůňková, 2009).

Imunitní systém lze rozdělit na základě specifity a rychlosti odpovědi na dvě sekce a to na imunitu vrozenou (nespecifickou) a získanou (specifickou). Zde o nich mluvím jako o oddělených sekcích, nicméně mezi nimi existuje řada interakcí a obě jsou významně propojeny při tvorbě imunitní odpovědi.

Vrozená imunita tvoří fyzickou, chemickou a mikrobiální bariéru, ale daleko častěji se objevuje ve spojitosti s buňkami vrozené imunity, kterými jsou např. neutrofily, monocyty, makrofágy a nebuněčnými složkami jako je - komplement, cytokiny a proteiny akutní fáze. Tyto složky zprostředkovávají okamžitou obranu organismu (Parkin a kol., 2001).

Adaptivní imunita je znakem imunitního systému vyšších zvířat. Mechanismus adaptivní (specifické, získané) imunity spočívá v antigen specifických reakcích uskutečněných pomocí T a B lymfocytů.

I když je vrozená imunita nepřekonatelná v rychlosti imunitní odpovědi, někdy dojde díky její nedokonalé specifitě k poškození zdravé tkáně. Adaptivní imunita je kontrastem k imunitě vrozené, je vysoce specifická nicméně trvá několik dnů až týdnů než dojde k vytvoření její imunitní odpovědi. Navíc adaptivní imunita má schopnost tvořit paměť, takže následující střetnutí s již známým antigenem vede k silnější, efektivnější a rychlejší reakci, ale ta samozřejmě neprobíhá okamžitě (Mackay a kol., 2000).

5.1 Vrozená (nespecifická) imunita

Nespecifická imunita a její mechanismy jsou vývojově starší, méně specifické a rychlejší. Vrozená imunita je tvořena složkami, které jsou v organismu již vytvořeny a připraveny k okamžitému útoku.

Je tvořena fyzikální bariérou, která je tvořena **mechanickou složkou**; epitelovými buňkami, které tvoří husté buněčné vrstvy - sliznice. Zahrnují mukózní sliznice dýchacích cest, gastrointestinálního traktu, genitourinálního traktu a epiteliální řasu odvádějící množství slizu, který je kontaminovaný vdechnutými, či požitými částicemi. **Chemická složka** je tvořena enzymy ve slinách (lysozym), potu, slzách, mastné kyseliny na kůži, trávicí enzymy v žaludku (pepsin), defenzíny, kyselá pH v moči i žaludku (Hořejší a Bartůňková, 2009). Nespecifická imunitní odpověď je též tvořena řadou rozpustných proteinů a bioaktivních molekul, které jsou hojně zastoupeny v tělních tekutinách. Tyto látky mohou být po své aktivaci uvolněny z buněk. Mezi tyto látky patří např. proteiny komplementu, defensiny, ficoliny. Poslední součástí mechanismu vrozené imunity jsou membránové receptory a cytoplazmatické proteiny, které jsou na sebe schopny vázat molekulární vzorce, které se vyskytují na povrchu cizorodého tělesa, patogenu, mikrobu (Chaplin, 2010).

Tyto molekulární vzorce se nazývají PAMPs (pathogen-associated molecular patterns). PAMPs jsou různorodé molekuly, které zahrnují lipopolysacharidy (LPS), mannany, teikové kyseliny, denaturovanou DNA, a bakteriální DNA (Janeway a kol., 2002). Tyto molekulární vzorce jsou rozpoznávány receptory, které se nazývají PRRs (pathogen-recognition receptors).

PRRs jsou proteiny kódované v zárodečné linii, které jsou evolučně konzervovány (Janeway a kol., 2002). PRRs jsou definovány jako receptory PAMPs a jsou exprimovány především buňkami vrozené imunity, tato definice však byla rozšířena o sekreci a lokální produkci molekul, které zprostředkovávají mnoho kroků v zánětlivé reakci včetně řízení fagocytózy, aktivace signálních drah zánětu, indukce buněčné smrti, aktivace komplementu či koagulační kaskády (Janeway a kol., 2002). Jednotlivé druhy PRRs a jejich využití v nádorové imunoterapii budou probrány níže.

Vrozená imunita je tvořena **buněčnou a humorální složkou**. Buněčnou složku tvoří NK (natural killer) buňky a buňky schopné fagocytózy, tedy fagocyty (monocyty, makrofágy, neutrofilní granulocyty, dendritické buňky a žírné buňky). Humorální složka je zastoupena cytokiny, složkami komplementu, interferony, lektiny a sérovými proteiny (Hořejší a Bartůňková, 2009). Vrozená imunita je, jak už jsem zmínila rychlejší, méně specifická, není zatížena tzv. imunitní pamětí, tudíž reaguje vždy stejně rychle a stejnou silou.

5.1.1 Buněčné složky vrozené imunity

Myeloidní kmenové buňky dávají za vznik několika různým buněčným formám od granulocytů po megakaryocyty, krevní destičky tak i erytrocyty. Hlavní roli v imunitní odpovědi hrají tyto složky myeloidní řady; neutrofilny, monocyty, makrofágy, eosinofily, bazofily a žírné buňky. Z lymfoidní řady sem patří zejména NK buňky.

1. eosinofily – hlavním úkolem eosinofilů je ochrana organismu před parazitickou infekcí. Infekce způsobená parazitem vyvolá produkci antigen-specifických IgE protilátek, které zaplaví organismus. Eosinofily se na IgE přichycují svými receptory s nízkou afinitou (Fc_εR2). Eosinofily fagocytují a mimo ochranu organismu před parazity se podílejí i na alergických reakcích. Obsahují granula obsahující kationtové eosinofilní proteiny, peroxidázu, neurotoxin, který je po svém vypuštění na povrch patogenu vysoce toxický (Parkin a kol., 2001). Tvorba eosinofilů v kostní dřeni a jejich přežití v periferních tkáních je zvýšeno přítomností IL-5, činí z nich buňky důležité při tvorbě alergických reakcí (Minai-Fleminger a Levi-Schaffer, 2009).

2. bazofily a mastocyty – bazofily patří mezi granulocytární leukocyty. Jejich

zastoupení je poměrně nízké tvoří pouze 1%. Obsahují velká granula bohatá na histamin a serotonin. Podílejí se na alergické reakci a likvidaci patogenů, vyskytují se v krevním řečišti (Rédei, 2008). Mastocyty (též žírné buňky) mají podobnou funkci a stavbu jako bazofily, obsahují granula s histaminem a heparinem, avšak nikdy neopouštějí tkáň. Nejčastěji se vyskytují v kůži a trávicí soustavě. Heparin se podílí na procesu srážení krve a histamin na alergických reakcích.

Jejich množství v organismu je oproti ostatním bílým krvinkám poměrně malé, jejich význam v tvorbě imunitní odpovědi je však obrovský. Způsobují angioedém, nebo anafylaxi. T- mastocyty (mucosal mast cells) obsahují pouze trypsin, ostatní obsahují jak trypsin, tak chymotrypsin. Bazofily i mastocyty na svém povrchu nesou vysoce afinitní receptory pro IgE (Fc_εRI, CD23), které absorbují lokální IgE. Pokud dojde k navázání IgE k receptoru dochází k degranulaci a k uvolnění mediátorů jakým je např. histamin a serotonin, nebo vazoaktivní aminy. Membránové mediátory např. leukotrieny B₄, C₄, D₄ a E₄, prostaglandiny, faktory aktivující destičky zvyšují kontrakce hladkého svalstva, tvorbu edému, vaskulární permeabilitu, bronchokonstrikci přispívají k tvorbě zánětlivé odpovědi (Parkin a kol., 2001; Chaplin, 2010). Nynější studie ukazují hlavně na jejich účast při hypersenzitivních alergických reakcích, kdy uvolňují nezanedbatelné množství IL-4 (Schroeder a kol., 2009).

3. NK buňky – natural killer buňky jsou jako jediné původem z lymfoidní vývojové linie, morfologicky jsou podobné lymfocytům, ale nenesou antigen-specifické receptory. Rozpoznávají abnormální buňky dvěma mechanismy. První jejich mechanismus spočívá v přítomnosti imunoglobulinových (FcR) receptorů na jejich povrchu. Tyto receptory váží cílové struktury nesoucí protilátky, které jsou schopny vázat se na tyto FcRs a zahájit tak cytotoxickou odpověď NK buněk. Druhý mechanismus spočívá v tom, že na svém povrchu nesou receptory pro MHCI. Pokud při interakci s buňkou nedojde k vazbě na tomto receptoru, NK buňka je naprogramovaná tak, aby lyzovala cílovou buňku. Toho dosáhne sekrecí perforinů na povrch buňky, ke které NK buňka adherovala. Perforiny způsobí tvorbu pórů v membráně a granzymy těmito póry putují dovnitř buňky. Granzymy v cílové buňce indukují apoptózu.

Normální, neporušené lidské (hostitelské) buňky na svém povrchu nesou MHCI, vazbou této molekuli s jejím receptorem pro MHCI na NK buňkách dojde k inhibici přirozené smrtící dráhy a nedojde k apoptóze. Nádorové buňky a buňky napadené virem často způsobují útlum regulace MHC třídy I. To znesnadňuje cestu k rozpoznávání těchto

buněk pomocí cytotoxických T buněk a otvírá cestu k jejich likvidaci pomocí přirozených zabíječů (Parkin a kol., 2001). Nicméně častá exprimace MHC1b znesnadňuje i tento proces (Smyth a kol., 2013).

4. monocyty, makrofágy – monocyty a makrofágy jsou často mobilizovány krátce po rekrutaci neutrofilů. Stejně jako neutrofilů jsou schopny fagocytovat mikroby, nebo částice, které byly předem označeny protilátkou, nebo komplementem. Po jejich aktivaci setrvávají dlouhou dobu na místě infekce, nebo chronického zánětu. Nejen, že se podílejí na zánětu, ale v celém těle se účastní granulomatozních procesů. K zabití mikroorganismů produkují oxid dusnatý. Významnou částí se podílejí na regulaci specifické imunity prostřednictvím tvorby velkého množství cytokinů např. IL-12, interferon (IFN- γ) (Chaplin, 2010). Na základě aktivačních signálů obdržných při jejich diferenciaci z prekurzorových buněk, mohou makrofágy tvořit různé fenotypy (Benoit a kol., 2008).

Aktivované makrofágy vykazují vysokou zánětlivou a antibakteriální aktivitu, produkují velké množství IL-6, IL-12, IFN- γ a TNF (tumor necrosis factor). Alternativně aktivované makrofágy jsou spuštěny přítomností IL-4, IL-10, IL-13 především za přítomnosti glukokortikoidů. Dále také při vzniku protizánětlivé reakce prostřednictvím jejich vlastní produkce IL-10, antagonisty receptoru IL-1 a transformujícího růstového faktoru (TGF β) (Chaplin, 2010).

5. neutrofilů – neutrofilů jsou první obrannou linií při imunitní odpovědi organismu proti bakteriální, nebo plísňové infekci (Borregaard a kol., 2010). Tvoří 50-70% cirkulujících leukocytů a jsou schopny pomocí diapedézy proniknout do různých tkání. Hlavním rysem vrozené imunity je aktivace a rekrutace neutrofilů při vzniku infekce, což vede k vymýcení patogenů (Witko-Sarsat a kol., 2000). Pro vrozenou imunitu je typická nízká schopnost cílení, není tak specifická jako imunita získaná. To je z biochemického hlediska způsobeno nízkým počtem chemických mechanismů pro zabíjení, což snižuje schopnost cílit konkrétní buňku a vede k možnosti napadení i jiné formy života (Nathan, 2006). Proto není překvapením, že neutrofilů, částice schopné destrukce mikroorganismů, také ničí buňky a tkáně hostitele, tedy tkáně sobě vlastní. Destrukce způsobená pomocí neutrofilů je ve skutečnosti velmi častý jev, dochází k němu při infekci. Díky této destrukci může hostitelův imunitní systém vyhodnotit, zda je na čase vyvolat imunitní odpověď. Ve skutečnosti je tkáňová infekce hlavním zdrojem informací pro imunitní systém, který vyvolává zánět a zánět zase aktivuje imunitu (Nathan a kol., 2002).

Z toho vyplývá jak moc jsou neutrofilny při tvorbě imunitní odpovědi nepostradatelné. Nejenže se podílejí na tvorbě základní formy imunitní odpovědi tedy na zánětu, ale na tuto primární zánětlivou reakci navazuje atak na úrovni imunity získané. Během počátečního vývojového stupně tkáňového poškození či infekce jsou z makrofágů uvolňovány cytokiny.

Granulocytární a granulocyto-makrofágní kolonii stimulující faktory, které stimulují v kostní dřeni myeloidní prekurzory a uvolňují miliony neutrofilních buněk do krevní cirkulace a způsobují tzv. neutrofilní leukocytózu. Jako většina buněk imunitního systému nejsou neutrofilny statické, ukotvené na jednom místě. Jsou to pohyblivé buňky putující celým tělem. Pohybují se volně krví, nebo se valivým pohybem přesouvají po endotelu vaskulárního systému. Z místa jejich přirozeného výskytu se k místu infekce dostávají pomocí několikasupňovitého procesu zahrnujícího prozánětlivé mediátory, adhesinové molekuly, chemokiny a chemoatraktanty (Parkin a kol., 2001).

Neutrofilny vytváří obrovské množství reaktivních forem kyslíku, které jsou pro mikrobiální patogeny cytotoxické. Dále enzymy, které se podílejí na tkáňové obnově a opravách po zranění. Neutrofilny se akumulují ve velkém množství v místech bakteriální infekce a poškozené tkáně, mají prominentní fagocytární schopnosti, které jim umožňují pohltnout mikroby a částicové antigeny, následně je degradovat a zničit. Je tedy zřejmé, že hrají významnou roli při odstraňování patogenů a opravě poškozených tkání (Kennedy a kol., 2009).

Jak jsem již zmínila, neutrofilny jsou fagocyty, jsou tedy schopny fagocytózy. Fagocytóza je děj při kterém neutrofil obklopí patogen, pohltnout ho a zneškodnit. Obklopí ho pomocí tzv. pseudopodií, to jsou výběžky tvořené cytoplazmatickou membránou. Vytvoří vesikl, tzv. fagozom okolo pohlčené částice. Tento fagozom fúzuje s granulami obsaženými v neutrofilu a vzniká tzv. fagolyzozom. Následně je patogen štěpen pomocí toxických kyslíkových radikálů např. hydrogenperoxidem, hydroxylovými radikály aj. Dále jsou v granulech obsaženy na kyslíku nezávislé toxické látky, jako jsou vysoce toxické proteiny a enzymy např. myeloperoxidáza, lysozomy (Parkin a kol., 2001).

V současné době je zájem o neutrofilny zvýšen díky jejich schopnosti regulovat imunitní odpověď prostřednictvím produkce cytokinů, jako je TNF (tumour necrosis factor) a interleukin (IL-12), chemokiny, tvoří neutrofilní extracelulární pasti (NETs) (Papayannopoulos a Zychlinsky, 2009).

Ingesce a schopnost zabíjení je u neutrofilů až 100x účinnější pokud předem dojde k opsonizaci pomocí specifické protilátky, nebo komplementu (C'). Tyto molekuly se váží na neutrofilní Fc a C'receptory, zvyšují adhezi mezi fagocytem a patogenem a startují proces

fagocytózy. Některé patogeny jako je *pneumococcus* a *haemophilus* nejsou na neutrofilní fagocytózu dostatečně citlivý, pokud nedojde předem ke styku s protilátkou. Tento jev vysvětluje, proč jsou lidé s deficitem protilátek tolik náchylní a citliví vůči infekcím, ačkoli mají normální množství neutrofilů v krvi (Parkin a kol., 2001).

Neutrofilly a rakovina

Neutrofilly hrají obrovskou roli u rakoviny. Nejenže jejich výskyt v krvi a tkáních slouží jako důležitý prognostický marker, sami se aktivně podílí na síle progresu nádoru a jsou důležité pro sledování výsledků terapie (Treffers a kol., 2016). Jak již bylo výše zmíněno, neutrofilly jsou nejvíce zastoupené leukocyty v krvi tvoří 50-70% cirkulujících leukocytů. Neutrofilly však infiltrují i řadu tumorů, pak o nich mluvíme jako o tumor-associated neutrophils (TANs) (Uribe-Querol a kol., 2015).

Z počátku se nepředpokládalo, že by buňky s tak krátkou životností mohly mít větší význam, počítalo se s nimi spíše jako s diváky. Nicméně se ukázalo, že hrají významnou roli u rakovinných onemocnění (Mantovani a kol., 2008).

Efekty protinádorové

Neutrofilly mohou ve skutečnosti být efektorovými buňkami, které se podílejí na protinádorovém boji (Gregory a kol., 2011), neboť jejich granula obsahují látky, které jsou schopné zlikvidovat maligní buňky. Cytokiny a chemokiny, které sekretují by mohly rekrutovat ostatní buňky imunitního systému účastníci se protinádorové odpovědi (Tecchio a kol., 2013; Mantovani a kol., 2011).

Fascinující funkcí neutrofilů je schopnost brzdit progresi tumorů s nízkým stupněm růstu a zpomalit maligní progres onemocnění prostřednictvím odloučení nádorových buněk od bazální membrány u karcinogeneze epitelových buněk dělohy (Blaisdell a kol., 2015).

Efekty pronádorové

Nicméně současné studie naopak spojují TANs se špatnou prognózou. Nejspíš se ptáte jak je možné, aby buňky vrozené imunity mohly podporovat nádorové bujení. Odpověď je taková, že mikroprostředí nádorů kontroluje rekrutaci neutrofilů tak, aby TANs podporovaly progresi nádorů. Proto o TANs nemůžeme mluvit jen jako o obranné linii organismu, která je pro organismus benefiční, musíme počítat i s jejich možnou škodlivou funkcí (Uribe-Querol a kol., 2015).

TANs se od cirkulujících neutrofilů liší, u myších modelů mohou zobrazovat promutagení fenotyp, mechanismy tohoto fenotypu se začínají objasňovat, nicméně již teď víme, že zahrnují genotoxicitu, angiogenezi a imunosupresi (Gregory a kol., 2011). Tyto dva typy neutrofilů, tedy TANs a cirkulující neutrofilové byly pojmenovány N1 a N2 (Fridlender a kol., 2009), stejně jako pro a protinádorové makrofágy (TAMs) (Galdiero a kol., 2013). Solidní tumory obsahují zejména různé druhy buněk, včetně buněk stromálních, imunitních, endoteliálních. To není zcela zarážející, neboť zánět je známým aspektem, který je spojovaný s primární nádorovou progresí (Coussens a kol., 2000; Maeda a Akaike, 1998).

5.1.2 Humorální složky vrozené imunity

Buněčné složky nejsou potřebné pro všechny reakce vrozené imunitní odpovědi. Proteiny a jiné molekuly jsou soběstačné při usmrcení mikrobu, patogenu a cizorodých těles, která nebyla pohlcena buňkami imunitního systému. Humorální složka vrozené imunity může být rozdělena na aferentní a efektorovou větev. Neboť látky, které rozpoznávají cizorodost, ještě nemusí být těmi co patogen usmrtí.

Mezi humorální složky řadíme komplement, LPS vazebný protein (LBP), C-reactive protein, pentraxiny, antimikrobiální peptidy, včetně defensinů, proteiny akutní fáze, prozánětlivé cytokiny aj. (Turvey a Broide, 2010).

Nicméně je nutno si uvědomit, že ani členové humorální složky vrozené imunity nepracují samostatně. Skvělým příkladem interakce mezi vrozenou a získanou imunitou je případ, kdy je patogen označen pomocí protilátky, díky níž ho rozpoznají složky komplementu a zneškodní jej. Bez přítomnosti získané imunity by nebyla zajištěna tak vysoká efektivnost imunity vrozené (Beutler a kol., 2004).

Komplement

Komplement je systém skládající se z husté sítě proteinů, která je regulována a hraje významnou roli v imunitní obraně a zánětu. Aktivace komplementu vede k opsonizaci patogenu a jeho odstranění fagocyty.

Komplement se skládá z více než 30 proteinů, které se vyskytují buď rozpuštěné v krvi, nebo jako s membránou asociované proteiny. Aktivace komplementu vede ke kaskádě enzymatických reakcí, které vedou k formaci C3a a C5a, což vede k množství fyziologických imunitních odpovědí, od chemoatrakce až po apoptózu (Sarma a kol., 2011).

Původně byl komplement považován za prostředek pouze vrozené imunity, nicméně

poslední studie ukazují na jeho důležitou roli při adaptivní imunitě zahrnující T a B lymfocyty a imunitní odpověď, která chrání organismus před opětovnou invazí (Dunkelberger a kol., 2010; Molina a kol., 1996). Podílí se však i na regeneraci tkání, růstu nádorů (Qu a kol., 2009) a řadě onemocnění (Wagner a kol., 2010).

Hlavních složek komplementu je jen devět sérových proteinů (C1,C2,C3...) (Hořejší a Bartůňková, 2009). Komplement je aktivován alternativní, klasickou, nebo lektinovou drahou aktivace. Tyto způsoby aktivace zahrnují proteiny, které většinou existují v neaktivní formě, zymogenech. Ty mohou být postupně uvolňovány a aktivovány. Všechny tyto cesty se sbíhají v C3 proteinu, který je ústřední složkou celého systému. Z tohoto ústředního bodu dále dojde k formaci aktivačních proteinů, C3a, C3b, C5a a C5b-9 (membrane attack complex) (Sarma a kol., 2011).

Komplement zastává 3 funkce:

- 1.Opsonizace, která je zprostředkována pomocí C3b, který se kovalentní vazbou váže na membránu patogenu.
- 2.Chemotaxe, zprostředkována pomocí C3a, C5b.
- 3.Osmotická lýza buňky pomocí komplexu MAC (membrane attack complex), skládající se z C5b, C6, C7, C8 a C9 fragmentů (Hořejší a Bartůňková, 2009).

Cytokiny

Další neméně podstatnou součástí vrozené humorální imunity jsou tzv. cytokiny. Cytokiny jsou látky s nízkou molekulární hmotností pohybující se od 4000 - 40 000 d. (Dinarello a kol., 2000).

Zastávají funkci autokrynního, parakrynního nebo endokrynního messengeru (Zhang a An, 2007). Tyto látky mohou ovlivňovat buňku, jež je vyprodukovala, nebo buňky ostatní. Tyto látky přenášejí signály, které jsou buňce předány prostřednictvím specifického receptoru, který se vyskytuje na membráně příslušné buňky. Ačkoli je většina z nich rozpustná, některé mohou být vázané na membráně (Parkin a kol., 2001). Cytokiny mohou být produkovány prakticky všemi buňkami nejčastěji však makrofágy a Th buňkami (Zhang a An, 2007) a mají velmi různorodé funkce. Většina těchto cytokinů však způsobuje buněčný přesun, dělení, apoptózu a zánět (Parkin a kol., 2001). Existuje hned několik způsobů rozdělení cytokinů. Můžeme je rozdělit na základě funkce při tvorbě zánětu na prozánětlivé a protizánětlivé cytokiny (Zhang a An, 2007).

Cytokiny, které jsou produkovány leukocyty a mají efekt především na buňky bílé řady, se nazývají **interleukiny** (ILs). Cytokiny, které mají funkci chemoatraktantů, se nazývají **chemokiny**. Ty látky, které ovlivňují buněčnou proliferaci a diferenciaci kmenových buněk, jsou nazvány **kolonii stimulující faktory** (CSFs) a posledním typem jsou **interferony** (IFN), které jsou spojeny s virovou replikací (Parkin a kol., 2001). **Monokiny** produkované monocyty a **lymfokiny** jejichž zdrojem jsou lymfocyty (Zhang a An, 2007).

Chemokiny

Chemokiny jsou významným členem rodiny cytokinů. Hrají klíčovou roli při migraci leukocytů. Mají chemotaktickou funkci, jsou tedy zodpovědné ze cílení pohybu daných buněk. Jejich produkce je ovlivněna přítomností prozánětlivých cytokinů, nebo bakteriálními produkty. Receptory pro chemokiny se vyskytují na všech leukocytech. Chemokiny, které způsobují rekrutaci leukocytů, se nazývají zánětlivé chemokiny (Parkin a kol., 2001).

Lymfoidní chemokiny regulují umístění leukocytů v tkáních imunitního systému, jako je např. slezina aj. (Cyster a kol., 1999).

Mezi významné chemokiny patří:

1. *macrophage chemoattractant protein-1* – tento chemokin je produkován makrofágy, fibroblasty a keratinocyty a jeho funkcí je chemoatrakce monocytů a paměťových T buněk směrem k zánětu.

2. *macrophage inflammatory protein-1 α* – protein produkován makrofágy, jeho funkcí je chemoatrakce monocytů a paměťových buněk.

3. *MIP-1 β (macrophage inflammatory protein- 1 β)* – chemokin produkován makrofágy, monocyty, T a B lymfocyty a buňkami endotelu, jeho funkce je chemoatrakce monocytů a CD8+ T buněk.

4. *RANTES* – způsobují chemoatrakci monocytů, T buněk a eosinofilů, jsou produkovány krevními destičkami a T buňkami.

5. *IL-8* – tento interleukin atrakuje neutrofile a T buňky, produkují ho makrofágy (Parkin a kol., 2001).

Interferony

Interferony jsou proteiny, které mají mezi cytokiny hlavní roli v imunitě, jsou rozděleny do dvou typů. Typ1 zahrnující IFN α , IFN β a typ2, který zahrnuje IFN γ a jiné

imunitní interferony. Interferony typu 1 mají protivirovou funkci, jsou produkovány zejména fibroblasty a monocyty. Jejich produkce je řízena na základě vzniklé infekce. Jak IFN α , tak IFN β se váží ke stejnému receptoru. Chrání neinfikované buňky pomocí aktivace tvorby molekul, které jsou schopné narušit, nebo inhibovat produkci virové RNA, nebo DNA (Parkin a kol., 2001). Interferony typu 1 mají též protiproliferační funkci, které je využíváno např. při léčbě leukemie (Brunstein, 2001).

Interferon γ aktivuje makrofágy, intracelulární zabíjení pomocí neutrofilů a funkci NK buněk. Zvyšuje prezentaci antigenu, zvýšením exprese MHCII molekul na povrchu APCs (antigen presenting cells). Je produkován buňkami imunitního systému, kterými jsou T lymfocyty a NK buňky (Parkin a kol., 2001).

Tumour necrosis factors (TNFs)

Jsou skupinou cytokinových proteinů, které mají jednak funkci cytotoxickou, tak regulační. Jejich regulační funkce je podobná funkci IFN γ (Hořejší a Bartůňková, 2009).

Tumour necrosis factor α (TNF α), též známý jako kachektin je cytokin produkován makrofágy. Jeho funkce spočívá v aktivaci a stimulaci imunitní odpovědi, kterou je tumorová nekróza.

Tumour necrosis factor β (TNF β), též známý jako lymfotoxin, je protein produkován T buňkami. Stimuluje vaskulární efekt imunitní odpovědi (Parkin a kol., 2001).

V neposlední řadě lze do skupiny humorální imunity zařadit tzv. **PRRs**, což jsou rozpustné receptory rozpoznávající PAMPs molekulové vzory (Hořejší a Bartůňková, 2009).

5.1.3 Zánět

Zánět je všudypřítomná forma obrany, která vzniká na místě poraněné tkáně. Je to nespecifická reakce zprostředkovaná nespecifickými a specifickými mechanismy imunitní odpovědi pro boj s patogeny. Za aktivaci zánětu jsou zodpovědné receptory vrozené imunity, které ho po jejich styku s patogenem aktivují.

Zánět je kaskádou imunologických, fyziologických a behaviorálních událostí, které tvoří komplexní síť. Tato síť je koordinována výše zmíněnými signálními molekulami - cytokiny. Charakteristickým znakem této imunitní odpovědi oproti ostatním je fakt, že při tomto procesu dochází k poškození i zdravé tkáně. Zánět, ale nemá nic společného s imunopatologií, neboť ta zahrnuje imunitní útok vůči tkáním, které již nejsou považovány za

tkáň sobě vlastní. O tomto jevu pak mluvíme jako o autoimunitní patologii (Ashley a kol., 2012).

Dle Medzhitova, je zánět definován jako biologická reakce na narušení tkáňové homeostázy (Medzhitov a kol., 2008). Při tomto narušení dochází k rekrutaci krevních složek, kterými jsou plazmové proteiny, tekutina, leukocyty. Toho je docíleno díky změnám v krevním řečišti, které vedou k vazodilataci a zvýšené permeabilitě cév, díky tomu je ve výsledku zvýšen krevní průtok (Ashley a kol., 2012). Klinickými projevy zánětu jsou rubor (zčervenání), dolor (bolestivost), calor (teplota), tumor (otok) a function laesa (změna funkčnosti) (Hořejší a Bartůňková, 2009).

Primární funkcí zánětu je rychle zachytit a zničit zdroj narušení tkáňe, odstranit zničenou tkáň a znovu nastolit stav tkáňové homeostázy (Medzhitov a kol., 2008; Soehnlein a kol., 2010). Toho je dosaženo pomocí detekce tzv. PAMPs. PAMPs jsou pathogen-associated molecular patterns, tedy molekulové vzorce, které jsou exprimované na povrchu patogenů nikoli na buňkách hostitele, proto jsou pro buňky imunitního systému lehce rozpoznatelné. PAMPs mohou být pro patogeny životně důležité. Alarminy též DAMPs (damage-associated molecular patterns) jsou endogenní molekuly vyplavované z buněk, u nichž dochází např. k nekróze. Jsou též rozpoznávány vrozenou imunitou, ale tyto signály naopak omezují napadení hostitelské tkáňe vrozenou imunitou (Ashley a kol., 2012).

Rozlišujeme zánět akutní a chronický. Akutní zánět není dlouhodobý, dochází k úplnému zhojení tkáňe, která je bez následků. Chronický zánět je často patologický, trvá delší dobu a nedochází k úplnému zahojení tkáňe, část tkáňe je nahrazena vazivem (Hořejší a Bartůňková, 2009).

Hlavní prozánětlivé cytokiny

Zánět zahrnuje uvolňování prozánětlivých i protizánětlivých cytokinů. Protizánětlivé cytokiny jsou cíleny na místo zánětu, kde zabraňují jeho nadbytečnému vzniku (Jaffer a kol., 2010). Při jeho zvýšené tvorbě dochází ke ztrátě lokální kontroly, která může vést až k systémovému zánětu a potenciálním následkům jako je SIRS (sepsis), nebo MODS (multi-organ dysfunction syndrome), k šoku a dokonce až k smrti (Wajant a kol., 2003). Cytokiny jsou z buněk uvolňovány stupňovitě, prvotními prozánětlivými cytokiny jsou TNF α a IL-1 β . Tyto dvě látky stimulují produkci ostatních cytokinů. Hlavními prozánětlivými cytokiny jsou TNF α , IL-1, IL-6, IL-8 a MIP-1 α (macrophage inflammatory protein-1 α) (Jaffer a kol., 2010).

TNF α – protein o velikosti 17kDa je primárně produkován monocyty. Podání většího množství tohoto rekombinantního proteinu u lidí způsobuje sepsi s horečkou, hemodynamické abnormality, leukopenii, zvýšenou produkci enzymu jater a koagulopatii (Spriggs a kol., 1987).

Mnoho studií zahrnující infuzovaný endotoxin ukazuje, že nejvyšší hladiny TNF α je dosaženo po 60-90 minutách (Socha a kol., 2006). Objevuje se velmi rychle v plazmě a má výhradní roli při usnadnění aktivace ostatních mediátorů zánětu (Jaffer a kol., 2010).

IL-1 – interleukin-1 tvoří dvě formy, první formou je IL-1 α a druhou formou je IL-1 β . Obě dvě tyto formy sdílí jeden receptor pro IL-1. Je též jako TNF α uvolňován monocyty, navíc však ještě neutrofilů a jinými buňkami. U lidí způsobuje horečku, hemodynamické změny, anorexii, nevolnost, artralgie, bolest hlavy a neutrofilii (Jaffer a kol., 2010).

IL-6 – je 21 kDa velký glykoprotein syntetizovaný velkým množstvím buněčných typů. Je počátečním mediátorem při vzniku horečky, zvyšuje uvolňování proteinů akutní fáze a podporuje chemotaxi prostřednictvím toll-like receptorů (TLRs) (Jaffer a kol., 2010).

IL-8 – interleukin-8 (též znám jako CXCL8) je prozánětlivý chemokín. Je produkován monocyty a makrofágy. Jeho exprese je regulována aktivačním proteinem a/nebo faktorem- κ B (NF- κ B). Tento IL je regulován na základě stimulů, kterými jsou např. TNF α , IL-1 β , chemickými vlivy i vlivem prostředí a steroidními hormony (androgeny, estrogeny aj.). Je spojován s podporou chemotaxe neutrofilů a degranulací (Waugh a Wilson, 2008).

IL-17 – je protein zodpovědný za produkci G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) a chemokínů jako je CXCL1 a CXCL2. Je to cytokin, který je prozánětlivým mediátorem. Během infekce se podílí na zneškodnění patogenu (extracelulární bakterie a fungi) produkcí antimikrobiálních peptidů jako je např. defensin. Hraje též významnou roli při chronickém zánětu, který nastává během autoimunitní choroby, jako je např. RA (revmatoidní artritida), nebo při alergiích. Během této nemoci je IL-17 produkován Th buňkami, které jsou stimulovány IL-1 β a IL-6, které jsou produkovány makrofágy a buňkami tkání (Kuwabara a kol., 2017).

5.2 Získaná (specifická) imunita

Jak již bylo výše zmíněno, získaná imunita je evolučně mladší, její reakce je pomalejší, avšak přesnější a tvoří se během ní pomocí paměťových buněk imunitní paměť. Organismus pak po znovuobnovení známého nepřítele reaguje rychleji a s větší silou. Buněčnými složkami vrozené imunity jsou B a T lymfocyty. Flexibilita a paměť této imunitní odpovědi je zprostředkována pomocí toho jak T a B lymfocyty rozpoznávají povrchové antigeny.

Vrozená imunita využívá stále stejný repertoár receptorů, který zdělila, na rozdíl od T a B lymfocytů jejichž receptory neustále procházejí řadou rekombinací genů, které kódují receptory pro Ag (antigen). Tak se neustále tvoří nové a unikátní receptory, které jsou schopny rozpoznat v podstatě jakýkoli antigen (Clark a Kupper, 2005).

B lymfocyty na svém povrchu nesou receptory, v tomto případě protilátkové molekuly, které jsou kódovány těžkými a lehkými řetězci imunoglobulinu (Ig). Tyto receptory jsou vázány na povrchu B buněk, nebo mohou být sekretovány. Jsou klasifikovány na základě izoforem jejich těžkého řetězce na IgM, IgG, IgE a IgA. Ze všeho nejdříve B buňky produkují IgM, ale díky vlivům cytokinů a jiných faktorů mohou být následně geneticky rekombinovány, což má za následek vznik IgE subtypů, IgE a IgA.

Pokud dojde k vazbě mezi protilátkovou molekulou (receptorem) a antigenem (Ag), B buňky se začnou dělit a proliferovat, jejich potomci se diferencují na paměťové a plazmatické buňky. Plazmatické buňky již neobsahují receptory a produkují protilátky (Krejsek a Kopecký, 2004).

T lymfocyty na rozdíl od B buněk obsahují pouze vázané povrchové receptory. T buňky rozpoznávají proteolytické štěpy antigenů, což je přesný opak k rozpoznávání přirozených (native) proteinů B buňkami. T lymfocyty rozpoznávají antigenní peptidy pouze, když jsou prezentovány povrchovými MHCI a MHCII histokompatibilními molekulami (Clark a Kupper, 2005).

Efektorové T buňky

Po rozpoznání Ag se T buňky začnou diferencovat na buňky cytotoxické (Tc) a buňky pomocné (Th).

Pomocné Th (CD4+) buňky organizují imunitní odpověď, rozpoznávají antigen a aktivují buňkami zprostředkovanou imunitní odpověď vedoucí k vymýcení patogenu. Také hrají roli v aktivaci B lymfocytů (Parkin a kol., 2001). Jsou funkčně rozděleny na základě vzorů cytokinů, které produkují na Th0, Th1 a Th2 buňky (Swain a kol., 1991).

Th1 produkují IL-2, který indukuje T buněčnou proliferaci, stimuluje CD8+ T buněčné dělení a cytotoxicitu. Dále produkují IFN γ , který aktivuje makrofágy k likvidaci nitrobuněčných patogenů a aktivuje cytotoxicitu zprostředkovanou NK buňkami. Cytokiny produkované Th1 buňkami dále zprostředkovávají na buňkách závislou zánětlivou odpověď. Th2 buňky produkují IL-4, IL-5, IL-6 a IL-10 (Parkin a kol., 2001). Dále známe i Th9, Th17 a Th22 buňky (Araujo-Pires a kol., 2014).

Cytotoxické Tc (CD8+) buňky jsou začleněny v obraně a zneškodnění virů i nádorů. Tyto buňky jsou přímo toxické vůči buňkám nesoucí Ag specifický pro jejich receptor. Po navázání tohoto antigenu na specifický receptor dochází k uvolnění perforinů z Tc aktivovaných buněk. Tento princip je shodný s NK buňkami. Vzniklými póry jsou do perforovaných buněk uvolňovány granzymy, které aktivují kaspázové enzymy, což vede k fragmentaci DNA a apoptóze. Tc buňky se též vážou pomocí jejich Fas ligandu (FasL) k Fas molekulám na povrchu cílových buněk, čímž se též aktivuje programovaná buněčná smrt (Parkin a kol., 2001).

B lymfocyty – nesmíme zapomínat na B buňky, které produkují protilátky. Ty slouží k neutralizaci toxinů, k prevenci adhezace mikroorganismů k mukózní sliznici, aktivují komplement, opsonizují bakterie pro fagocytózu a hlavně zvyšují citlivost nádorových a infikovaných buněk vůči na protilátkách závislém cytotoxickém útoku, který je zprostředkovaný buněčnými zabíječi. Tyto protilátky hrají roli ve zvýšení množství elementů vrozené imunity. B lymfocyty také obsahují receptorovou molekulu, díky níž mohou prezentovat Ag T buňkám (Parkin a kol., 2001).

5.3 Dendritické buňky

Dendritické buňky by správně měly být řazeny mezi buněčné součásti vrozené imunity. Nakonec jsem se je rozhodla začlenit sem, neboť jejich funkce spočívá ve tvorbě pomyslného mostu (spojovacího článku) mezi imunitou vrozenou a získanou. Jejich funkce spočívá ve stimulaci T buněčné odpovědi proti antigenu (Banchereau a kol., 1998). Dendritické buňky jsou jediné buňky, které jsou schopné aktivovat naivní T lymfocyty a mohou prezentovat endocytované antigenní peptidy ve spojitosti s MHCI i MHCII molekulami cytotoxickým i pomocným T buňkám (Rescigno a kol., 1998; Guermonprez a kol., 2003).

Dendritické buňky se tvoří v kostní dřeni a jako nezralé migrují do tkání, nezralé buňky jsou i tak schopné zachycovat antigeny, neposkytují kostimulační signály, které by vedly k aktivaci T buněk. Aktivními se stávají až po vystavení určitému množství nebezpečných signálů včetně PAMPs motivů, řady cytokinů a tkáňových faktorů (Chain, 2003). Díky kostimulačním molekulám, které jsou uvolňovány během maturace naivních dendritických buněk se DCs stávají extrémně významnými aktivátory T buněčné odpovědi (Clark a Kupper, 2005).

6 Způsoby úniku rakovinných buněk před imunitním systémem

Nejenže jsou nádorové buňky pro imunitní systém špatně rozeznatelné od buněk normálních, díky nízké specifitě antigenů (viz níže), ale dokonce existuje celá řada mechanismů díky nimž nádorové buňky unikají imunitnímu systému a v těle hostitele přetrvávají. Nádory využívají postupy díky nimž, potlačují funkci imunitního systému. Např. se zaměřují na regulaci funkce T lymfocytů a na jejich sekreci, ovlivňují prezentaci antigenu, přispívají k produkci mediátorů, které potlačují imunitní odpověď aj. Dalšími faktory jsou metastáze, kdy změnou své lokace opět znesnadňují zacílení imunitním systémem, jejich různorodost také znesnadňuje cílení a podporuje růst nádoru (Vinay a kol, 2015).

Regulační buňky

Jedním z faktorů, který ovlivňuje vznik a průběh nádorů jsou tzv. regulační buňky, které poskytují nádorovým buňkám únikové strategie.

Mezi regulační buňky patří **Tregs** (regulační T buňky), např. CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ regulační T buňky (Tregs), které exprimují tedy CD4, CD25 a FoxP3. Tregs, které jsou

odvozeny od nádorů, mají vyšší potlačující účinek na imunitní odpověď než ostatní běžně se vyskytující Tregs (Yokokawa a kol., 2008; Gasparato a kol., 2010). Do nádorů jsou Tregs směřovány chemokiny produkovanými nádorovými buňkami (Curiel a kol., 2004). Tvoří 5-10% všech T buněk, které negativně ovlivňují funkce ostatních T buněk. Další jejich funkce spočívá v toleranci vůči antigenům, které jsou organismu vlastní (Kretschmer a kol., 2006). U myších nádorových modelů bylo prokázáno, že pokud omezíme množství Tregs, dojde ke zvýšení protinádorové odezvy. A na druhou stranu, pokud posílíme množství Tregs, dojde k jejímu omezení (Abbas a kol., 2012).

Mezi další buňky potlačující imunitní odpověď patří buňky myeloidní, především **MDSCs** (myeloid-derived suppressor cells), tolerogenní DCs (dendritic cells) a M2 makrofágy, kteří tvoří zánětlivé mikroprostředí nádoru a také hrají roli jako mediátory při zahájení tvorby nádoru, angiogenezi a při tvorbě metastáz (Murdoch a kol., 2008). MDSCs jsou, jak jsem již výše zmínila, myeloidního původu. Ve skutečnosti jsou to myeloidní prekurzory, které se mimo nádory vyskytují i v lymfoidních tkáních a krvi, vznikají v kostní dřeni a potlačují jak specifickou, tak i nespecifickou imunitu (Parker a kol., 2015). MDSc potlačují nespecifickou imunitu produkcí IL-10, který potlačuje zánětlivé reakce, na kterých se podílejí DCs a aktivované M1 makrofágy. Specifická imunita je mimo jiné jimi potlačována, především v oblasti T buněčné odpovědi např. produkcí volných radikálů. Poškozují i protinádorovou T buněčnou odpověď tím, že podporují produkci Tregs a ovlivňují proliferaci Th buněk k Th2 buňkám, které mají oproti Th1 buňkám omezenou protinádorovou funkci (Perez-Gracia a kol., 2014).

Mezi další regulační buňky patří **makrofágy M2**, což jsou makrofágy spojované s nádorovým onemocněním. Podobně jako Tregs a MDSCs podporují mikroprostředí nádoru směrem k jejich progresi a to tak, že negativně ovlivňují T buněčnou odpověď. T buněčnou odpověď ovlivňují M2 makrofágy jejich produkcí TGF- β , IL-10, VEGF (vascular endothelial growth factor) (Mantovani a kol., 2010; Sica a kol., 2008) a prostaglandin E2 (Italiani a kol., 2014).

Snížená exprese MHCI

Dalším známým mechanismem, kterým nádorové buňky unikají imunitnímu dohledu je snížená exprese MHCI molekul, které jsou pro rozpoznání Ag pomocí CTLs zásadní (Šťastný a kol., 2015), dále také latentních proteinových podjednotek membránových bílkovin (LMP) a to konkrétně LMP2 a LMP7, transporter spojený s proteinem pro zpracování antigenu (TAP) a tapasin (Hicklin a kol., 1999; Johnsen a kol., 1999; Restifo a

kol., 1993; Rotem-Yehudar, 1996; Seliger a kol., 1997). To vede ke snížené expresi rakovinných antigenů, které nejsou nadále účinně rozpoznávány cytotoxickými T lymfocyty (CTLs), což vede ke zvýšenému výskytu tumorů a metastáz (Maeurer a kol., 1996).

Maskování antigenu

Tento mechanismus spočívá v překrytí antigenu molekulami glykokalixu např. kys. sialová v mukopolysacharidech. Často je oproti normálním buňkám v buňkách nádorových exprimováno větší množství těchto molekul (Šťastný a kol., 2015).

Inhibiční molekuly (kontrolní body imunitní reakce)

Mimo existenci stimulujících molekul a receptorů stimulujících přeměnu naivních T lymfocytů v aktivní CTLs, existují i molekuly a receptory inhibiční. Ty zabraňují přehnané stimulaci této přeměny a zabraňují např. autoimunitním poruchám, udržují imunologickou homeostázu a zabraňují nadměrnému poškození tkání v místech, kde se vyskytuje zánět. Avšak nádory využívají funkcí těchto inhibičních struktur ve svůj prospěch a znovu tak unikají imunitnímu dohledu tím, že zabraňují tvorbě aktivních CTLs (Hanahan a kol., 2011). Tyto inhibitory jsou produkovány nádorovými buňkami, ale i buňkami okolních tkání sahajících do mikroprostředí nádoru (Vinay a kol., 2015).

Hlavním inhibitorem pomocí kterého je tohoto úniku docíleno je *TGF-β* (transforming growth factor β). Tento mediátor kromě regulace vývojových procesů tkání a orgánů ovlivňuje karcinogenezi a imunitní odpověď (Šťastný a kol., 2015). TGF-β má významné protinádorové vlastnosti, ty ale nádorové buňky dokážou potlačit a využít pouze jeho protiimunitní a prometastatické vlastnosti (Massagué, 2008).

IL-10 byl probrán v kapitole o cytokinech. Nejdůležitější informací v souvislosti s únikem je schopnost nádorových buněk v pokročilém stádiu exprimovat na svém povrchu receptor pro tento cytokin, který pak funguje opačně než na začátku a zvyšuje proliferaci nádorových buněk (Mannino a kol., 2015).

Dále mezi inhibiční molekuly patří *IL-1, IL-6, CSF-1, IL-8, IL-10, typ I IFN, TNF-α* (Lin a Dibling, 2002; Matsuda, 1994).

VEGF, který je produkován nádorovými buňkami inhibuje diferenciaci progenitorů DCs (Gabrilovich a kol., 2004). VEGF spolu s IL-10 a TGF-β inhibují maturaci DCs, tyto nematurované DCs jsou tolerantní vůči Ags a neprezentují je na svém povrchu T buňkám (Gabrilovic, 2004). Mezi další velmi důležité inhibiční molekuly patří *CTLA-4* (cytotoxic T-lymphocyte antigen-4), *receptor PD-1* (programmed death-1), *LAG-3* (lymphocyte

activation gene-3), TIM-3 (T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3) a další (Perez-Gracia a kol., 2014). Tyto inhibiční molekuly jsou i checkpointy imunitní reakce. Nesmíme zapomínat ani na únikový mechanismus zprostředkovaný pomocí *FasL*.

7 Rakovinné antigeny

Základem vyvolání imunitní reakce je rozpoznání antigenu imunitním systémem. U rakovinných buněk je to o něco složitější, neboť jsou často imunitním systémem vyhodnoceny jako buňky příliš podobné buňkám normálním a imunitní reakce pak není dostatečná. Účinnost imunitní odpovědi je potlačena i velmi silným imunosupresivním prostředím okolo nádoru (Hořejší, 2015). Nádorové buňky jsou pak imunitním systémem více méně tolerovány a dochází i k ochraně těchto buněk imunitním systémem, podobně jako u semialogenního štěpu tak, aby nedošlo k potratu zárodku (Holtan a kol., 2009).

Nádorové antigeny lze rozdělit do dvou skupin. Prvními jsou tzv. tumor-specific-antigens (***TSAs***), které jsou pro nádorové buňky specifické a v souvislosti s jinými buňkami se nevyskytují. Další skupinou jsou ***TAA***s (tumor-associated-antigens), tyto antigeny jsou specifické pro nádorové buňky, ale vyskytují se i v souvislosti s buňkami jiných, normálních tkání (Hořejší, 2015). TSAs a TAAs jsou především prezentovány molekulami MHC I a MHC II komplexu (Vigneron a kol., 2015).

TSAs jsou tedy antigeny, které se vyskytují pouze na buňkách rakoviny. Patří mezi ně komplexy HLAs (human-leucocyte-antigen) a to hlavně HLA-A a HLA-B molekul I. třídy s produkty abnormálního štěpení proteinů, ke kterému došlo v nádorových buňkách. Tyto komplexy tedy nesou abnormální proteinové fragmenty. Příkladem může být fúzní protein Bcr-Abl, který vzniká transkripcí fúzního genu. Dalším příkladem TSA je molekula EPCAM, což je adhezivní molekula epiteliálních buněk. CALLA (common acute lymphoblastoid leukaemia antigen), též známý jako CD10, který je exprimován na buňkách akutní lymfoblastické leukémie (Hořejší, 2015). Antigeny s vysokou nádorovou specificitou vyvolávají nádorově specifickou T buněčnou odpověď. To je umožněno jejich zobrazením specifických vzorců exprese (Coulie a kol., 2014).

MHC molekuly dále mohou prezentovat fragменты onkogenních virů (SV40, EBV) a neobvyklých glykoproteinů, které vznikly např. připojením kyseliny sialové. Mnohé povrchové glykoproteiny nádorových buněk se odlišují od ostatních buněk normálních tkání.

Další skupinou antigenů jsou tzv. neoantigeny, ty jsou kódovány tumor-specifickými mutantními geny. Tyto antigeny vznikají prostřednictvím mutací, které mění pořadí

kódujících sekvencí aminokyselin, některé z těchto mutací mohou být zpracovány a prezentovány na buněčném povrchu a následně rozpoznány T buňkami. Vzhledem k tomu, že normální tkáň nemají tyto somatické mutace, neoantigenně specifické T lymfocyty nepodléhají periferní ani centrální toleranci ani nevykazují nedostatečnou schopnost vyvolat tkáňovou destrukci. Z tohoto důvodu jsou neoantigeny ideálním cílem pro imunoterapii, která je založena na T buňkách (Lu a Robbins, 2016).

8 Nádorová imunoterapie

8.1 Protinádorové zbraně imunitního systému

Jak již bylo několikrát řečeno buňky nádorové vznikají z buněk normálních, není proto překvapením, že nesou stejné povrchové antigeny, tyto antigeny jsou imunitním systémem rozpoznávány, avšak tolerovány jako antigeny sobě vlastní. Pokud dojde k rozpoznání cizorodého antigenu, na jeho likvidaci se mohou podílet prakticky všechny efektorové složky imunitního systému, jako jsou složky vrozené imunity (neutrofilů, NK buňky, aktivované makrofágy) a složky imunity získané (opsonizační protilátky aktivující komplement, fagocytózu a CTLs s prozánětlivými Th1 buňkami, které způsobují buněčnou cytotoxicitu) (Hořejší, 2015).

8.2 Imunoterapie založená na principech vrozené imunity

Vrozená imunita tvoří první obranu linii imunitního systému, její funkce spočívá v rozpoznání PAMPs a DAMPs motivů pomocí buněčných receptorů patterns recognition receptors (PRRs). Tyto receptory se vyskytují především na buňkách imunitního systému, kterými jsou neutrofilů, makrofágy, monocytů, dendritické buňky, ale i buňky epiteliální (Beutler a kol., 2004).

Pattern recognition receptors a jejich využití v imunoterapii

Tyto receptory jsou nezbytné pro vznik imunitní odpovědi, jsou prvním krokem obranné linie, kdy rozpoznávají to, co je buňce cizí, tedy PAMPs. Po rozpoznání tohoto cizorodého agens dojde k fagocytóze, při níž jsou tyto patogeny zneškodněny a produkty fagocytózy jsou následně prezentovány APC buňkami (antigen prezentující buňky).

Tyto buňky prezentují antigeny jak CD4+ prekurzorům Th buněk ve spojení s MHCII molekulami, tak crossprezentují antigeny s MHCI molekulami CD8+ prekurzorům

Tc buněk. Nositelé takto prezentovaných antigenů jsou poté rozpoznány buňkami získané imunity a cytotoxickými mechanismy, nebo protilátkami a jsou následně zneškodněny.

PRRs jsou tedy pro imunitní odpověď zásadní, při imunoterapii se využívá vazby nejružnějších ligandů (ve vakcínách) na tyto receptory, čímž dojde k nastartování imunitní odpovědi organismu. PRRs můžeme na základě jejich lokalizace rozdělit do tří skupin; membránové PRRs, cytoplazmatické PRRs a PRRs sekretované.

membránové PRRs

Toll-like receptors (TLRs)

Patří mezi PRRs složky vrozené imunity rozpoznávající PAMPs motivy. Je to rodina receptorových proteinů PRRs, která je ze všech druhů nejvíce prozkoumána a v posledních letech roste zájem o její začlenění do nádorové imunoterapie. Jsou to transmembránové proteiny typu I obsahující motivy bohaté na leucin ve svých extracelulárních doménách, který je podobný motivům ostatních PRRs. Mají konzervovaný intracelulární motiv skládající se z TIR domény, který iniciuje signální transdukcí (Maruyama a kol., 2010). Existují jednotlivé typy TRLs, které jsou specializované na konkrétní PAMPs motivy. Existuje hned 10 typů lidských TLR (TLR 1-10) receptorů u myši je jich dokonce 12 (TLR 1-9 a TLR 11-13) (Takeda a Akira, 2005).

Po vazbě ligandu (PAMPs motivu) k tomuto receptoru dojde k aktivaci buněk vrozené imunity. TLR1, TLR2 a TLR6 na sebe váží ligandy ve formě bakteriálních lipoproteinů, kyseliny lipoteichoové a fungálního zymosanu. TL3 na sebe váže vzor dvouvláknové RNA, TL4 liposacharidy (LPS) z Gram-negativních bakterií. TLR5 na sebe váže bakteriální flagelin, TLR7 a TLR8 jednovláknovou RNA, TLR9 nemetylované CpG motivy v DNA a ligand pro TLR10 není dosud znám (Maruyama a kol., 2010). Jelikož nádorové buňky neobsahují PAMPs využívá se vazby těchto ligandů pomocí kotev na nádorové buňky a to proto, aby došlo k rozpoznání těchto buněk imunitním systémem a vyvolání imunitní odpovědi.

C- lektinové receptory (CRP)

Jsou obrovskou proteinovou superrodinou, jež je definována schopností vázat na sebe sacharidy. Mezi CRPs patří dectin-1, jehož ligandem je β -glukan. Dectin-2 receptor váže vysokomolekulární mannózové oligosacharidy. DC-SIGN vážící mannin, Langerin vážící mannózu, fukózu a N-acetylglukózamin atd. Nejvíce pozornosti se věnuje dectin-1 a dectin-2 receptoru a jejich protifungální imunitě (Hollmig a kol., 2009).

Mezi další pro nás významné receptory patří *FPRs* (s G-proteinem spřezané formyl-peptidové receptory), nebo membránově vázané *scavengerové receptory* (Le a kol., 2002; PrabhuDas a kol., 2014).

Cytoplazmatické PRRs

Mezi cytoplazmatické PRRs patří např. *NLR* (NOD like receptory), které váží ligandy bakteriálního RNA původu. Dalším zástupcem jsou tzv. *RIG-I-like receptor*, který rozpoznává rozdíl od NLR virovou RNA. Oba tyto typy receptoru slouží až jako druhá linie obrany za membránovými receptory a chrání organismus před patogenními mikroorganismy (Akira a kol., 2006).

Sekretované PRRs

Posledním typem jsou sekretované PRRs, mezi něž patří např. *CRP* (C-reaktivní protein), nebo *MBL* (manózu vázající lektin). Tyto PRRs iniciují komplementovou kaskádu, jež vede k opsonizaci patogenu a urychlení fagocytózy (Janeway a kol., 2002).

8.3 Imunoterapie založená na principech získané imunity

Získaná imunita se do celého procesu protinádorové imunitní odpovědi zapojuje až následně po rozpoznání PAMPs pomocí PRRs buněk IS a následnou prezentací antigenu ve spojitosti s MHCI a MHCII molekulami. MHCI molekuly jsou nesené na všech jaderných buňkách, MHCII molekuly pouze v souvislosti s APC buňkami (antigen prezentující buňky). Mezi nejvýznamnější APC buňky patří dendritické buňky a makrofágy a hned za nimi B lymfocyty a neutrofily. Cytotoxické T lymfocyty jsou schopny rozpoznávat Ag pouze ve spojitosti s MHCI molekulami.

Monoklonální protilátky

Protinádorové monoklonální protilátky (mAb) jsou již delší dobu ve fázi preklinických výzkumů a klinických studií. Jejich funkce spočívá např. v blokaci receptorů růstových faktorů nádorových buněk, v opsonizaci, v aktivaci buněk schopných fagocytózy a NK buněk a to prostřednictvím Fc-receptorů, v aktivaci komplementu a buněčné smrti. Aktivace cytotoxických buněk prostřednictvím Fc-receptorů se nazývá antibody-dependent cellular-cytotoxicity (ADCC). Kromě mAb, které jsou používány samostatně existují ještě

jejich konjugáty s radioizotopy (radioimunotoxiyn), nebo s účinnými toxiny (imunitoxiny) (Hořejší, 2015).

Bispecifické protilátkové konstrukty

Tyto uměle konstruované bispecifické mAbs, jsou velmi nadějným terapeutickým přístupem. Obsahují dvě vazebná místa, z nichž jedno na sebe váže nádorový Ag a druhé některou z molekul na povrchu NK a T buněk, např. CD2 molekulu, CD3, nebo CD16. Tyto vazby mohou přivést do těsného kontaktu nádorové buňky s velkým počtem NKs, nebo T buněk. Tyto NKs a T buňky nemusí na svém povrchu nést receptory, které by byly schopné rozeznat nádorové Ags. Překvapivě dojde k cytotoxické odpovědi těchto "nespecifických" lymfocytů a k zneškodnění napadené nádorové buňky (Hořejší, 2015).

Vakcíny založené na DCs

DCs (dendritické buňky) jsou profesionálními APCs (antigen prezentující buňky) díky jejich schopnosti prezentovat antigen T buňkám a poskytnout jim veškeré signály potřebné k jejich aktivaci (Cools a kol., 2007). Pro optimální aktivaci musí T buňky přijmout nejméně 3 koordinované signály (Zinkernagel a kol., 2011; Reis e Sousa, 2006). První signál je zprostředkován pomocí MHC molekul, které prezentují antigenní peptidy TCR (T buněčným receptorům). Druhý signál je zajištěn vazbou kostimulačních molekul s jejich příslušnými ligandy na T buňky. Hlavním kostimulačním signálem je vazba mezi CD28 receptorem na povrchu T buněk a ligandy B7 rodiny, mezi něž patří např. CD80 a CD86, ty jsou exprimovány DCs. Třetím signálem jsou cytokiny a jejich kombinace, které určují vývoj imunitní odpovědi směrem Th1, Th2, Th9, Th17 a Th22 případně indukují tvorbu Tregs.

Při nádorové imunoterapii se velmi efektivně osvědčilo vyvolání TH1 buněčné odpovědi, která podporuje účinek CTL (cytotoxických T lymfocytů) schopných rozpoznat a ničit nádorové buňky antigen dependentním způsobem (Anguille a kol., 2012). Mimo aktivaci CTLs jsou DCs schopny aktivovat i NK buňky, které jsou hlavními hrdiny vrozené imunitní odpovědi (Degli-Esposti a kol., 2005). NK buňky mají nejen cytotoxickou funkci, ale i regulační. K dosažení jejich efektorového potenciálu potřebují stimulaci řadou cytokinů, kterými jsou; IL-12, IL-15, IL-18 a typ I IFN. Tyto cytokiny jsou produkovány právě DCs (Moretta a kol., 2006).

Při tvorbě vakcín byly podstatné dvě zjištění a to sice, že DCs hrají klíčovou roli při zahájení imunitní odpovědi na cizí antigeny a adjuvants, které hrají primární roli, neboť jsou

aktivátory DCs (Diamond a kol., 2011). Terapeutické vakcíny pro chronické infekce, nebo rakovinu mají dva cíle; prvním je priming, dalším modulace a reprogramace paměťových buněk vedoucích k přechodu z jednoho typu imunity na druhý (to znamená z regulačního na cytotoxický)(Meiliana a kol., 2016).

Existují další mechanismy využívající vrozené imunity, kterými je např. **adoptivní T buněčné terapie**, která spočívá v namnožení a aktivaci předem získaných pacientových T lymfocytů *ex vivo* a následném navrácení zpět do organismu nitrožilní infuzí (Rosenberg a kol., 2015), nebo metoda využívající **chimerické antigenní receptory (CAR)** (Hořejší, 2015).

8.4 Naše imunoterapie

Jak již bylo výše naznačeno, naše imunoterapie spočívá ve dvou vlnách. První vlna, která je pro nás zásadní, funguje na principech vrozené imunity. Nádorové buňky na svém povrchu nesou jen malé množství antigenů a žádné PAMPs. Proto je imunitní systém toleruje a není schopný proti těmto buňkám zaútočit. Proto jsme se rozhodli, že takové buňky můžeme označit. Nejprve kolektiv Terezy Janotové v roce 2014 vyzkoušel značení nádorových buněk myšního melanomu B16-F10 pomocí agonistů stimulujících fagocytózu; laminarin, molekuly s terminální manózou a N-Formyl-methioninyl-leucyl-phenylalanin (f-MLF).

Tyto agonisté byly navázání pomocí kotev na povrch nádorových buněk. Mezi použité kotvy patřily; BAM (Biocompatible Anchor for cell Membrane), N-(Succinimidyl-oxy-glutaryl)-L- α -phosphatidylethanolamine, Dioleoyl (DOPE) a SMCC (cyklohexanecarboxylic-acid N-hydroxysuccinimide ester). Jako stimulátor zánětlivé infiltrace byl použit lipopolysacharid (LPS). TLR agonisté jsou rozpoznávány TLR receptory a receptory pro fagocytózu zase rozpoznávají specifické motivy fagocytárních agonistů (Janotová a kol., 2014).

V tomto pokusu byl jako první agonistou fagocytárních receptorů zvolen laminarin. Laminarin je nízkomolekulární β -glukan, jehož protinádorové schopnosti byly již v posledních 40 letech prokázány (Vetvicka, 2011), nicméně jeho vysokomolekulární formy se v praxi využívají daleko častěji. Jejich mechanismus účinku spočívá ve stimulaci granulocytů, monocytů a v aktivaci makrofágů (Chan a kol., 2009). Orální aplikací vysokomolekulárních β -glukanů jsme schopni dosáhnout až 50% redukce nádorového růstu, avšak intratumorální administrace nevykazovala žádný efekt, stejně jako intratumorální

aplikace laminarinu. Rozpustný laminarin je používán jako inhibitor Dectin-1 receptoru (Frasnelli a kol., 2005), tato jeho funkce je pro nás nežádoucí, neboť nám jde právě o aktivaci tohoto fagocytárního receptoru, který je nesen na povrchu některých buněk imunitního systému, kterými jsou např. makrofágy, neutrofilů a dendritické buňky (Janotová a kol., 2014). Proto jsme laminarin navázali pomocí kotvy BAM na povrch melanomových buněk. Toto navázání laminarinu na povrch buněk v dostatečné hustotě vede k tomu, že je prostřednictvím Dectin-1 vnímán jako fagocytární ligand. Buňky melanomu tvořily převážnou část tumoru, proto byl fagocytární útok směřován proti nim. Po přidání LPS došlo k mnohonásobnému zesílení tohoto útoku, došlo tedy k silné synergii, bez ohledu na částečnou inhibici Dectin-1 pod vlivem LPS (Willment a kol., 2003).

Jako další agonista byl použit mannan jehož terminální mannóza se váže na MR receptor, který je exprimován především na povrchu makrofágů. Pomocí mannan vázajícího lektinu (MBL) dochází též k aktivaci komplementu a opsonizaci na úrovni C3b a tvorbě cytotoxických terminálních komplexů. Ukázalo se, že rozhodujícím pro eliminaci nádorových buněk je tvorba C3b a iC3b na povrchu nádorových buněk, která stimuluje kromě fagocytárního ataku i atak NK buněk. Obojí je dáno výskytem CR3 receptorů na těchto buňkách.

Posledním fagocytárním agonistou byl f-MLF, který stimuluje FPRs (formylmethionine phagocytic receptors). Osm FPRs bylo popsáno u myši a tři u lidí (Le a ko., 2002). Kombinace LPS s vázaným f-MLF vedla k silnému potlačení nádorového růstu. LPS je agonistou TLR 4, LPS (důležitá složka stěny gramnegativních bakterií) je pro lidský organismus velmi nebezpečné, proto je třeba zamyslet se nad dávkováním LPS, nebo nejlépe nad lepším kandidátem pro agonistu TLR receptorů, jakým je např. LTA, nebo flagelin (Janotová a kol., 2014).

Při kombinaci TLRs ligandů a fagocytárních ligandů bylo u kombinace mannan-BAM a LPS dosaženo 80% dlouhodobého přežití (více než 100 dní), u kombinace f-MLF-KK-DOPE a LPS jen 60%. K dlouhodobému přežití je kromě vhodné kombinace TLR ligandů a kotvených agonistů fagocytárních receptorů nezbytný vhodný timing. Pulzní režim a zvyšování intenzity na začátku terapie se ukázalo jako velice efektivní způsob. Z různých způsobů kotvení (nábojové interakce, hydrofóbní kotvy BAM a DOPE, kovalentní vazby SMCC) se nejlépe osvědčila kotva BAM (Janotová a kol., 2014). Pokusy *in vitro* prokázaly, že agonisté fagocytárních receptorů, kteří jsou vázáni na nádorové buňky zvyšují cytotoxickou odpověď aktivovaných fagocytů, především neutrofilů (Janotová a kol., 2014; Waldmannová a kol., 2016).

Pomocí průtokové cytometrie bylo v pokuse *in vivo* dokázáno, že přítomnost agonistů pro fagocytární a TLR receptory má za následek rychlejší zahájení zánětlivé infiltrace (Janotová a kol., 2014). Synergie mezi TLR a fagocytárními agonisty je podpořena fakty, že TLR ligandy zahajují brzkou a obrovskou zánětlivou infiltraci nádoru. Efekt buněčné infiltrace je směřován k nádoru, na jehož buňky jsou navázány fagocytární agonisté. Celková efektivnost útoku je zvýšena interakcemi mezi TLR a fagocytárními receptory (Underhill a Gantner, 2004).

Těmito pokusy Janotová a kol. dokázala, že vazba agonistů pro fagocytární receptory souběžně se stimulací TLR receptorů je vhodným kandidátem pro cílení imunitní odpovědi. Existence synergie mezi těmito receptory, síla vazeb agonistů na povrch nádorových buněk, druh kotvy a správné načasování je pro tuto metodu podstatné. Jak bylo zmíněno, LPS jako TLR ligand je vhodné při pokusech na myších, nicméně je třeba uvažovat nad jeho možnými toxickými účinky v lidském organismu a pečlivě zvážit jeho dávkování, nebo nahrazení jiným TLR agonistou, kterým může být např. LTA (Janotová a kol., 2014).

Dalších významných pokusů se účastnil kolektiv okolo Evy Waldmannové, ti se zabývali kotvením usmrcených mikroorganismů na povrch nádorových buněk. Použití mikroorganismů v nádorové imunoterapii má dlouhodobou historii, nicméně otázka jejich kotvení na nádorové buňky nebyla dosud řešena. Pokusy byly prováděny na myším melanomu B16-F10 (Waldmanová a kol., 2016).

Předešlá studie Janotové a kol. byla založena na kombinaci rozpustných TLR agonistů a vázaných fagocytárních ligandů na povrchu nádorových buněk. Aktivace TLR vedla k silné zánětlivé infiltraci. Fagocytární agonisté způsobily díky fagocytům uměle vyvolanou opsonizaci nádorových buněk a jejich zabití (Janotová a kol., 2014).

Waldmannová a kolektiv se díky těmto výsledkům rozhodli použít přírodnější formy PAMPs, jednak Zymosan A tak i Gram negativní a Gram pozitivní usmrcené bakterie. Použitím Zymosanu A-SMCC došlo k silné synergii s LPS a ke zmenšení nádorů a jejich dočasné, nebo stálé eliminaci. Síla imunitní odpovědi byla závislá na síle ukotvení Zymosanu A na povrchu nádorových buněk, data byla podobná s předešlým pokusem, v němž byl použit kotvený laminarin a manan v synergii s LPS, což vzhledem ke složení Zymosanu A je logické. Jako účinné se ukázalo i navázání teplem usmrcených bakterií *Mycobacterium tuberculosis*, či opsonizace bakteriemi *Streptococcus maltophilia*, které byly kotveny pomocí nábojových interakcí (Waldmannová a kol., 2016). Zde bylo důležitým

momentem potvrzení účinnosti komplementu, k finálnímu zneškodnění nádorových buněk nedocházelo pomocí terminálního komplexu, ale působením neutrofilů, makrofágů a NK buněk. Tyto buňky vzájemně působily s opsonizovanými nádorovými buňkami na úrovni C3b/iC3b signalizací (Janotová a kol., 2014; Waldmannová a kol., 2016; Caisová a kol., 2016).

Posledním a prozatím nejdůležitějším byly experimenty Caisové a kolektivu, kteří vycházeli z výsledků Janotové a Waldmannové. Stejně jako v předešlých pokusech byl využit myši melanom B16-F10. Využili stimulace fagocytózy pomocí agonistů; mannan, nebo N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin, vázaných hydrofóbními vazbami na povrch nádorových buněk. Vyzkoušeli i další TLR agonisty; MPLA (monophosphoryl lipid A), R-837 (imiquimod), R-848 (resiquimod), poly(I:C) a teplem usmrcené *Listeria monocytogenes*. Jako nejúčinnější kombinace vyzkoušených ligandů se ukázala kombinace R-848, poly(I:C), LTA a mannan-BAM (Caisová a kol., 2017).

Dále se řešil správný timing založený na terapeutických pulzech a to hlavně proto, aby nedošlo k resistenci vůči TLR agonistům tak i správnému začlenění získané imunity. Ta je aktivována díky prezentaci antigenů T lymfocytům. Hlavní APC, dendritické buňky musí pro splnění své úlohy maturovat, což složky terapeutické směsi (TLR agonisti) zabezpečují. R-848 a poly (I:C) vyvolávají silnou produkci IL-12, což vede k nastolení požadované protinádorové Th1 odpovědi a tvorbě IFN- γ .

Dále jsme začlenili do směsi protilátky, z nichž se nejlépe osvědčila protilátka anti-CD40. Ta nahrazuje funkci Th buněk, dochází k podpoře fagocytů a zrání DCs. Finální podoba směsi používané v současnosti pro intratumorální imunoterapii je tedy: **mannan-BAM + poly(I:C)+ R-848+ LTA+ anti-CD40** (Caisová a kol., *in prep.*).

Do tohoto finálního složení tým vedený Dr. Ženkou vkládá největší naděje. Dochází k účinné redukci nádoru, dlouhodobému přežití, potlačení nádorového růstu a úplnému vyléčení nejen u melanomu, ale i u 80% myši s pankreatickým adenokarcinomem Panc02 (Ženka ústní sdělení). Navíc získaná imunita organismus ochránila i po následné retransplantaci po 120 dnech od první transplantace (Caisová a kol., *in prep.*). Organismus je tedy nejen schopen zlikvidovat nádor, ale zároveň je naimunizován pro případný výskyt metastáz. Důležitou součástí imunity jsou již několikrát zmíněné paměťové buňky, které jsou při znovuobjevení rakoviny a při tvorbě metastáz nepostradatelné k rychlému a účinnému útoku proti nádorovým buňkám.

Boj proti metastázám je v současnosti v centru pozornosti týmu Dr. Ženky. Primární nádor se nám daří vyléčit, ale problém stále zůstává u metastáz, které ne vždy lze léčit

intratumorální aplikací vakcín, jak tomu bylo u primárních nádorů. Snažíme se naši terapii rozšířit o systémové podání naší směsi látek, tak aby došlo k odstranění i metastáz, které nejsou vždy snadno dohledatelné. Proto v posledním pokusu podáváme dvojitou dávku Panc02 a to na každou stranu myšního modelu (dvounádorový model).

Bylo by vhodné naši vakcínu rozšířit o látku, postup, mechanismus, který nutně nemusí souviset s imunoterapií a který by byl schopný sekundární nádory oslabit a zničit. Samozřejmě se nabízí RT, nebo klasická chemoterapie, nicméně mě napadlo naši terapii rozšířit o blokaci jednoho proteinu z IAPs (proteiny inhibující apoptózu) rodiny proteinů. Jako vhodný adept se mi jevil survivin, níže se podíváme zda je má teorie správná, zda je vhodným kandidátem. Zda je vhodné kombinovat jeho blokaci s imunoterapií a jaký dopad by to mohlo mít jak na léčbu, nádory a tělo samotné, tak na buňky imunitního systému. Nejdříve však začnu s jeho charakteristikou, funkcemi, lokalizací, vlivem na nádorové buňky a možnostmi jeho blokace, v diskuzi si shrneme následné benefity a nevýhody jeho cílení.

9 Inhibitory apoptózy (IAPs)

IAPs jsou významnou skupinou antiapoptických proteinů, které jsou zapojeny do regulace apoptózy. Mají důležitou úlohu v regulaci T buněčných odpovědí a v protinádorové imunitě (Garg a kol., 2016). IAPs váží a inhibují kaspázy 3,7 a/nebo 9, ale ne kaspázu 8. Nárůst poznatků naznačuje, že IAPs také formují buněčné dělení, průběh a progresi buněčného cyklu a signální transdukční dráhy (Schimmer a kol., 2004).

Vzhledem k objevení významu a funkcí IAPs, dochází stále více k jejich přenesení do klinického výzkumu. Jsou využívány k efektivnějšímu stanovení diagnózy a léčbě malignit. IAPs jsou atraktivními terapeutickými cíli, při tvorbě chemických a antisense inhibitorů IAPs, které mohou být účinné při léčbě rakoviny (Schimmer a kol., 2004). Nadměrná exprese IAPs je signálem závažné prognózy solidních i hematologických malignit.

Funkce IAPs tedy nespočívá pouze v inhibici apoptózy, proto je nutné řádně promyslet, jak jejich blokaci využít k léčbě tak, aby nedošlo k poškození jiných mechanismů, které jsou pro organismus nezbytné např. aby nedošlo k poškození buněčného cyklu zdravých buněk, nebo k deformaci T buněčné odpovědi. IAPs se tedy jeví jako velmi atraktivní cíl při léčbě malignit, avšak otázkou zůstává, jak ho začlenit do klinické praxe.

9.1 Struktura a rozdělení IAPs

V současné době existuje 8 členů IAPs s řadou jejich homologů, které se vyskytují např. u hmyzu. IAPs proteiny jsou do jednotlivých skupin rozčleněny na základě počtu BIR domén, jejichž počet se pohybuje od jedné do tří a na základě zinc-binding oblasti o velikosti ~ 70 AK. Ne všechny skupiny obsahující BIR doménu jsou zodpovědné za antiapoptické účinky (Uren a kol., 2000; Fraser a kol., 1999; Li a kol., 2000). Prvním neviróvým savčím buněčným inhibitorem je NAIP (BIRC1; neuronal apoptosis inhibitory protein), dalšími sedmi členy IAPs jsou: cIAP1 (BIRC2; cellular IAP), cIAP2 (BIRC3; cellular IAP), XIAP (BIRC4; X-linked IAP), survivin (BIRC5), apollon (Bruce, BIRC6), livin (BIRC7; známý také jako melanoma IAP (ML-IAP)), ILP2 (BIRC8; IAP-like protein 2). Těchto 8 IAPs je dále rozděleno do tří tříd na základě jejich struktury, funkce a exprese (Schimmer a kol., 2004). Převážně se budeme věnovat členovi třetí třídy, kterým je survivin.

9.2 IAPs a inhibice kaspáz

Nádorové buňky často neodpovídají na klasickou léčbu jako je chemoterapie, radioterapie, nebo imunitní terapii, která je založená na endogenních cytotoxických T buňkách a NK buňkách (natural killer). Proč se to ale děje?

Na tom, že buňka neodpovídá na signály, které by vedly k přirozené programované buněčné smrti se podílí procesy, při kterých dochází k narušení, nebo zabránění některé z apoptických či kaspázových drah. Inhibitory apoptických proteinů (IAPs) jsou skupinou proteinů, které blokují buněčnou smrt inhibicí dolní části (downstream) kaspázových aktivačních drah (Schimmer a kol., 2004).

9.2.1 Cesty aktivace kaspáz

Z molekulárního hlediska je apoptóza u nenádorových buněk způsobena aktivací kaspáz. Kaspázy jsou intracelulární cysteinové proteázy, které štěpí substráty na zbytcích kyseliny asparagové (Cryns a kol., 1998; Thornberry a kol., 1998).

Kaspázy se v buňkách vyskytují v latentním stavu, aktivují se v reakci na širokou škálu stimulů vedoucích k programované buněčné smrti. Kaspázy jsou navzájem funkčně spojeny prostřednictvím proteolytické kaskády, přičemž iniciační (upstream) kaskády štěpí a aktivují efektorové (downstream) kaspázy (Salvesen a kol., 1997).

IAPs inhibují alespoň dvě z hlavních cest pro iniciaci aktivace kaspáz a to za prvé: mitochondriální dráhu s cytochromem c a za druhé: dráhu receptoru smrti s TNF (tumor necrosis factor), což je skupina receptorů smrti. IAPs také ovlivňují ještě třetí malou dráhu, ve které granzym B přímo aktivuje kaspázu 3 (Zapata a kol., 1998; Barry a kol., 2000).

Vnitřní (mitochondriální) aktivace kaspázy

Vnitřní cesta vedoucí k aktivaci kaspáz je iniciována uvolněním cytochromu c z mitochondrií. Cytochrom c se normálně vyskytuje mezi vnější a vnitřní membránou mitochondrie. Na různé proapoptické stimuly buňka reaguje uvolněním cytochromu c do cytosolu (Kluck, 1997). Cytochrom c pak váže a aktivuje Apaf-1. Apaf-1 aktivuje prokaspázu 9 na kaspázu 9, která zase aktivuje efektorové kaspázy, např. prokaspázu 3 na kaspázu 3 (Saleh a kol., 1999; Zou a kol., 1997).

Vnější aktivace kaspázy (death receptor)

Vnější cesta aktivace kaspáz přes Fas receptor vede k aktivaci prokaspázy 8. Je iniciována NK buňkami, nebo aktivovanými T-lymfocyty, které obsahují ve své membráně Fas ligand (Khosravi-Far a White, 2008). Tato cesta vedoucí k aktivaci kaspázy začíná TNF rodinou cytokinových receptorů, mezi které patří Fas (CD95), DR4 (Trail-R1) a TNF-R1 (CD120a).

Death receptory se aktivují vazbou ligandu na extracelulární doménu receptoru. Jakmile jsou tyto receptory aktivovány, získají proteinovou doménu Fadd/Mort-1. Při vazbě k death receptoru se Fas doména naopak váže na kaspázu 8 (Chang a kol., 1999; Berglund a kol., 2000), čímž vzniká smrt indukující signální komplex (DISC). Protože kaspáza 8 se koncentruje na DISC, dimeruje a tím se stává aktivní. Štěpením kaspázy 8 dochází k její stabilizaci v dimerové formě (Boatright a kol., 2003). Aktivovaná kaspáza 8 se uvolňuje z DISC do cytosolu, kde štěpí a aktivuje downstream efektorové kaspázy (Kang a kol., 1999; Stennicke a kol., 1998).

Ač oba způsoby aktivace existují jako samostatné jednotky, dochází mezi nimi ke komunikaci a sbíhání, příkladem je aktivace downstream efektorových kaspáz např. kaspázy 3. Tyto dvě jednotky spolupracují ve snaze zvýšit apoptózu prostřednictvím Bid. Protein Bid je členem skupiny proapoptických BH3 proteinů, je štěpen a aktivován kaspázou 8. Po jeho štěpení dochází k přesunu Bid do mitochondrie, kde aktivuje permeabilizaci mitochondriální membrány, uvolnění cytochromu c a iniciuje aktivaci mitochondriální cesty aktivace kaspáz (Gross a kol., 1999; Kulik a kol., 2001; Tang a kol., 2000).

10 Survivin

Survivin je nejmenším členem skupiny inhibitorů apoptózy. Je to antiapoptický protein o molekulové hmotnosti 16,5 kDa (Ryan a kol., 2009), který objevila Grazia Ambrosini a Dario C. Altieri v roce 1997 (Ambrosini a kol., 1997). Jedná se o unikátní protein, který se s ostatními členy IAPs podílí na řadě odlišných funkcí, kterými jsou; inhibice programované buněčné smrti a regulace buněčného cyklu (Chen a kol., 2016). Ve skutečnosti se survivin podílí i na regulaci neurogeneze a hematopoézy (Delvaeye a kol., 2009; Jiang a kol., 2005). Právě při blokaci survivinu, která by vedla k narušení hematopoézy, by mohlo dojít k problému při tvorbě nejen neutrofilů, ale i ostatních buněk imunitního systému, které jsou pro naši imunoterapii zásadní.

Survivin zajišťuje přežití nádorových buněk pomocí interference s řadou proteinů buněčného cyklu jako je INCENP (inner centromere protein) a Aurora B kináza. Survivin také inhibuje, jak na kaspáze závislou, tak i nezávislou aktivaci apoptózy. Zajímavé je, že nynější studie ukazují na roli survivinu v regulaci buněčné autofagie (Cheung a kol., 2013). Při pokusu Uren a kol., bylo dokázáno, že při homozygotní delecii survivinu u gravidních myši došlo díky narušení mikrotubulů, k polyploidii a k časné smrti embryí, což jen potvrzuje význam survivinu (Uren a kol., 2000). Při poškození survivinu u HeLa buněk došlo k aberantní mitóze a tvorbě polyploidie (Li a kol., 1999). Tyto dvě studie jasně potvrzují funkci survivinu v regulaci buněčného dělení.

Vzor genové exprese je také charakteristický, survivin je vyjímkou z rodiny proteinů IAPs. Jako jediný je výsadně exprimován během embryonálního a fetálního vývoje, ostatní IAPs jsou hojně exprimovány běžně v normálních tkáních (Johnsen a kol., 2009). Chybí u většiny zdravých, terminálně diferenciováných tkání, ale jeho exprese je zvýšena u různých druhů lidské rakoviny (Ambrosini a kol., 1997).

Je nutné všimnout si rozdílů na základě, kterých dojde k ulehčení targetingu při imunoterapii, survivin se ze všech IAPs díky své rozdílné expresi dá nejlépe cílit a tím se vyhnout možným nežádoucím účinkům u zdravých tkání a buněk. Navíc je u nádorových buněk exprimován ve velkém množství oproti ostatním IAPs. To je další rys, který podporuje survivin jako vhodného adepta pro cílení.

Exprese survivinu v nádorech koreluje nejen s inhibicí apoptózy a sníženou schopností rakovinných buněk podléhat signálům vedoucím k buněčné smrti, ale také s resistencí vůči chemoterapii a agresivitou nádorů. Survivin se též výhradně exprimuje v kmenových buňkách, ať už embryonálních, tak i u různých typů somatických kmenových buněk. Jeho role v buněčné homeostáze je daleko důležitější než se z počátku zdálo (Garg a kol., 2016).

Detekce survivinu v tělních tekutinách by mohla sloužit jako diagnostický marker a umožnit tak časnější detekci malignity (Schimmer a kol., 2004). V pokusu Smith a kol., byla hladina survivinu měřena a kontrolována u pacientů trpících rakovinou močového měchýře. Moč byla filtrována přes nitrocelulózovou membránu obsahující anti-survivin protilátky. U celých 100% testovaných pacientů s malignitou močového měchýře byl zjištěn vysoký obsah survivinu, stejné výsledky byly obdrženy pomocí reverzní PCR (Smith a kol., 2001).

Survivin by mohl být použit jako univerzální antigen nádoru, neboť se vyskytuje u většiny lidských malignit a má potenciál spouštět imunitní odpověď.

Výše zmíněné skutečnosti činí ze survivinu velmi zajímavý cíl, jehož blokací a v kombinaci s mechanismy vrozené imunity, kterým se budeme věnovat především, tak i pomocí principů získané imunity, zajistit sníženou proliferaci nádoru a jeho zvýšenou citlivost na imunoterapii a signály vedoucí k apoptóze.

10.1 Molekulární struktura survivinu

Skládá se z jediné BIR domény a neobsahuje RING (really interesting new gene) finger doménu. Survivin je exprimován ve fetálních ledvinách, játrech, plicích, gastrointestinálním traktu, ale není exprimován ve většině zdravých, dospělých tkání (Ambrosini a kol., 1997). Survivin je kódován bakulovirálním opakováním zahrnujícím BIRC5 oblast, díky níž je survivin někdy nazýván též BIRC5 a jeho molekulová hmotnost je rovna 16.5 kDa (Ryan a kol., 2009).

Gen survivinu je pozitivně regulován transkripčními faktory, kterými jsou např. β -catenin/TCF-Lef (T cell factor/ lymphoid enhancer factor), HIF1 α (Hypoxia-inducible factor 1- α), Sp1 (specificity protein) a STAT 3 (signal transducer and activator of transcription). Negativně je ovlivňován přítomností supresorového genu p53, Rb (retinoblastoma protein) a PTAN (phosphatase and tensin homolog) (Guha a kol., 2009). BIRC5 gen se skládá z 4 exonů a 3 intronů pokrývajících 14,796 nukleotidů na chromozomu 17q25 tvořící transkripty s různými funkčními doménami. BIRC5 gen kóduje divoký (wild) typ survivinu (WT, čtyři exony, 142 aminokyselin) a 5 známých dodatečných druhů setřihů (splicings) jako je; Δ Ex3 (survivin s delecí exonu 3; 137 AK), 2B (survivin s přidaným exonem; 165 AK), 3B (5 exonů; 120 AK), 2 α (2 exony; 74AK), 3 α (2 exony; 78 AK) (Mahotka a kol., 2002; Caldas a kol., 2005; Sampath a kol., 2007). Různé survivinové izoformy sdílejí úplnou identitu sekvencí v N-terminálním konci, zahrnující některé nebo všechny BIR domény, které se však liší v C-terminálním konci (Necochea-Campio a kol., 2013).

Pokud porovnáme jednotlivé izoformy divokého typu survivinu, můžeme pozorovat odlišné vzory exprese a liší se i v buněčné lokalizaci. Survivin- Δ Ex3 je převážně lokalizován v jádře, Survivin-2B se nachází v cytoplazmě.

Byla nalezena značná souvislost mezi jednotlivými druhy alternativních sestřihů survivinu a různými studii zabývajícími se aktivitou různých onemocnění. Survivin WT, 2B a Δ Ex3 formy byly rozsáhle studovány v klinických a prognostických studiích zabývajícími se rakovinou (Garg a kol., 2016). Přítomnost Δ Ex3 formy je spojována s nepříznivými klinickými výsledky a prognózou (Necochea-Campio a kol., 2013).

Rozporuplná data existují i pro souvislost mezi přítomností B2 a rakovinou, některé studie demonstrují souvislost mezi B2 formou a agresivní formou onemocnění a s špatnou prognózou (Antonacopoulou a kol., 2010), zatímco jiné studie spojují přítomnost B2 formy s méně závažnými chorobami (Suga a kol., 2005). Nicméně existují i studie, které demonstrují Δ Ex3 formu jako anti-apoptickou a B2 formu jako pro-apoptickou. Tyto dvě varianty mohou hrát svými protichůdnými funkcemi velikou roli v nádorové proliferaci a mohou mít vliv i na průběh nádorové terapie (Li a kol., 2005).

Přítomnost různých izoform survivinu má též vliv na angiogenezi. Ve studii od Doucette a kol., přítomnost izoformy survivinu typu 2 podporuje progres, maligní zvrát, komplikuje angiogenezi u myšního modelu s výskytem gliomu a zkracuje dobu bez nádorového nálezu (Doucette a kol., 2014).

Stále zůstává nejasné, zda alternativní sestřih survivinu je adaptací rakovinné buňky, která podporuje její proliferaci a je jedním z jejích únikových mechanismů před imunitou. Různé formy alternativního sestřihu survivinu s různými patologickými výsledky a nadějí na přežití hrají významnou roli při určení dalšího vývoje onemocnění. Příspěvek těchto alternativních sestřihů survivinu na vývoji rakoviny, mechanismus úniku před imunitním systémem a na celkovou reakci nádoru na terapii není zcela jasný a je nutno tyto mechanismy a souvislosti nadále zkoumat (Garg a kol., 2016).

10.2 Buněčná lokalizace survivinu

Survivin v jednotlivých okrcích buňky disponuje odlišnými funkcemi. Ač se survivin u nádorových buněk vyskytuje v cytosolu, byl také objeven v menších jaderných frakcích na kinetochorech metafázních chromozomů (Dohi a kol., 2004; Li a kol., 2005).

Survivin, vyskytující se v cytosolu, je uvolňován z mitochondrie, kde předchází aktivaci kaspáz, inhibuje apoptózu a zvyšuje tumorigenezi *in vivo*.

Jaderný survivin reguluje buněčné dělení (Garg a kol., 2016), kdežto cytoplazmatický survivin se na proliferaci nepodílí, ale na buněčném přežití buňky (Li a kol., 2005). Konkrétně zasahuje do přežití buňky interakcí a stabilizací fosforylovaného X-linked IAPs (XIAPs), a inhibuje kaspázu-3 a kaspázu-9 (McKenzie a Grossman, 2012).

Mimo cytosol a jádro se survivin nachází i v mitochondriích, odkud je vlivem stresových stimulů uvolňován do cytosolu (Dohi a kol., 2004). Byla navržena teze, že právě mitochondriální frakce survivinu, namísto cytosolových frakcí inhibují apoptózu interferencí

s kaspázami. Navíc podporuje tumorigenezi (Shin a kol., 2001; Tamm a kol., 1998; Dohi a kol., 2004).

Dalším místem výskytu jsou exozómy, váčky (40-100 nm) uvolněné z nádorových buněk, které jsou posléze přijaty okolními buňkami (Khan a kol., 2015). Exozómy jsou schopny znovuvstoupení do buněk a tím podporují růst nádoru.

Khan a kol. dokázali, že extracelulární výskyt survivinu zvyšuje odolnost okolních rakovinných buněk vůči účinkům nádorové terapie, zvyšují proliferační potenciál a *in vitro* získávají vyšší potenciál k invazi (Khan a kol., 2009).

Je tedy zřejmé, že survivin disponuje odlišnými funkcemi v závislosti na místě jeho výskytu, má dokonce jiný vliv i na průběh onemocnění. Vedle jeho různých forem je jeho buněčný výskyt dalším rysem, který by mohl usnadnit targeting.

10.3 Survivin a rakovinné kmenové buňky

Survivin se exprimuje mimo jiné i u různých typů kmenových buněk, není tedy překvapením, že má klíčovou roli i u nádorových kmenových buněk. Kmenové rakovinné buňky jsou zodpovědné za častou návratnost onemocnění, předpokládá se, že nádory jsou udržovány právě touto podskupinou kmenových buněk, které mají svou vlastní obnovovací schopnost podobnou nám dobře známým kmenovým buňkám (Oliveira a kol., 2011).

Role survivinu byla prokázána v regulaci fyziologie dospělých kmenových buněk, jako jsou např. hematopoetické kmenové buňky, neuronální kmenové buňky, nebo kmenové buňky střev (Fukuda, 2006; Feng a kol., 2003). Kmenové buňky i nádorové kmenové buňky mají společné rysy, dá se předpokládat, že jejich regulace také spočívá v expresi survivinu.

Byla zkoumána souběžná exprese survivinu a proteinů specifických pro kmenové buňky u pacientů trpících ESCC (esofageální dlaždicový karcinom jícnu), pacienti vykazovali vysokou expresi survivinu i specifického proteinu Oct-4 (octamer-binding transcription factor) u kmenových buněk ESCC, tato kombinace vedla k nejvíce závažné prognóze. Korelace mezi vysokou expresí survivinu a Oct-4 u ESCC naznačuje, že by mezi survivinem a Oct-4 mohlo docházet k jejich vzájemné regulaci, nebo interakci (Li a kol., 2012). Tento mechanismus však není zcela znám, je potřeba vykonat další pokusy a pozorování, které by tuto tezi potvrdily. V pokusu Fukuda a kol., bylo zjištěno, že je survivin odpovědný za regulaci genů LCSC (stem cells of leukemia), to však není potvrzeno u HSC (normal

hematopoetic stem cells) (Fukuda a kol., 2011). Tato odlišnost by mohla být rozhodujícím markerem při cílení léčby.

Je nutné uvědomit si a zvážit, že sice blokací survivinu dojde k narušení kmenových buněk nádorů, ale je více než pravděpodobné, že to bude mít za následek poškození i ostatních kmenových buněk hostitele, nebo pro imunoterapii nezbytných kmenových buněk.

10.4 Výskyt survivinu u různých typů malignit

Jak již bylo zmíněno, survivin je vysoce exprimován u různých typů lidských malignit. Po objevení survivinu jako vhodného adepta k detekci, byla provedena řada pokusů vedoucích k jeho potvrzení. U výše zmíněného pokusu Smith a kol., byli pacienti trpící malignitou močového měchýře testováni na obsah survivinu v moči. Survivin byl prokázán u 100% testovaných pacientů. Ve studii Muzio a kol. byla dokázána pomocí imunochemických metod zvýšená exprese survivinu u 94% pacientů trpících orálními prekancerózními lézemi, z nichž 66% propuklo v maligní zvrát (Muzio a kol., 2003).

Survivin tedy nemusí sloužit pouze k detekci maligních onemocnění, ale i k rozeznání prekarcenózních stavů u nichž již logicky dochází ke zvýšené expresi survivinu. Ve studii Lin a kol. byl survivin exprimován u 60 pacientů trpících perorální dysplazií z 62 pacientů, což činí 97%. U pacientů s karcinomem skvamózních buněk došlo ke zvýšené expresi survivinu u 94 pacientů z 96, což činí 98%, avšak u přilehlé zdravé ústní sliznice k nadměrné expresi nedošlo (Lin a kol., 2005). Tato studie tedy potvrzuje, že je survivin nadměrně exprimován pouze u rakovinných buněk. Nadměrná exprese survivinu byla pozorována i u pacientů trpících kolorektálním karcinomem a lymfomy (Gu a kol., 2005).

V dalších dvou studiích byla vysoká hladina survivinu pozorována u adenomatózních polypů a pankriatického adenokarcinomu, ve srovnání s normální sliznicí. Jeho exprese korelovala i se špatnou prognózou pacientů ve stádiu II onemocnění (Sahasrabudde a kol., 2009; Sarella a kol., 2002).

Na druhou stranu, to vypadá, že survivin hraje roli v přechodu mezi adenomem s nízkou dysplazií a adenomem s vysokou dysplazií během kolorektální tumorigeneze (Kawasaki a kol., 2001).

Survivin tedy může sloužit jako prognostický marker, vyskytuje se i u prekarcenózních stavů, pokud by došlo k jeho blokaci v tomto stádiu, mohlo by to přinést velmi pozitivní prognózu.

10.5 Survivin-prognostický marker

Survivin slouží též jako prognostický marker. Tedy čím vyšší exprese survivinu tím těžší prognóza onemocnění.

Ve studii, která se zabývala detekcí a měřením množství survivinu u 144 pacientů trpících rakovinou tlustého střeva, kteří byli léčeni resekcí, a celkovou prognózou se ukázalo, že zvýšené množství survivinové mRNA je spojené s celkovým poklesem přežití (Sarela a kol., 2002). Ve studii pacientů s astrocytárním mozkovým tumorem, bylo opět potvrzeno, že zvýšená exprese survivinu je spojena se zvýšeným stupněm malignity a snížením celkové šance na přežití (Kajiwara a kol., 2003).

Dalé byla vysoká exprese survivinu prokázána jako faktor zvyšující špatnou prognózu malignit u hepatocelulárního karcinomu (Ikeguchi a kol., 2002), urotheliálního karcinomu (Schultz a kol., 2003) a u karcinomu žaludku (Miyachi a kol., 2003). Snížením hladiny survivinu u nádorových buněk, by mohlo být dosaženo zlepšení prognózy u pacientů.

10.6 Funkce survivinu

Jak již bylo výše nastíněno, survivin se podílí a je zodpovědný za široké spektrum funkcí, ať už u nádorových nebo zdravých buněk. Mezi jeho hlavní funkce patří regulace buněčného cyklu, buněčná proliferace a regulace programované buněčné smrti.

10.6.1 CPC komplex

Výhradní funkcí survivinu mimo regulaci apoptózy v buněčném cyklu je regulace buněčného dělení. Zdravé buňky vykazují závislost na syntéze, expresi a degradaci survivinu (Garg a kol., 2016). Survivin tvoří nedílnou součást chromozomálního passenger komplexu (CPC), který zajišťuje správné fungování segregace chromozomů a cytokinosinů během buněčného dělení (Li a kol., 1999). Během buněčného cyklu prochází všechny buňky živých organismů kontrolními body. Různé kontrolní body zajišťují buněčné dělení, připojení k mitotickému vřeténku a cytokinezi.

CPC je hetero-tetramerní komplex, který se vyskytuje během mitózy na různých místech v různém čase. Slouží k regulaci klíčových událostí v buněčném dělení jako je např. připojení chromozomů k mikrotubulům, správná struktura dělicího vřeténka a cytokineze (Garg a kol., 2016). Během profáze/metafáze mitózy se survivin vyskytuje na para-polárních osách centromer, během anafáze/telofáze je přemístěn do středové fáze dělicího vřeténka a na konci telofáze vymizí (Uren a kol., 2000).

První složku CPC tvoří enzym Aurora B kináza, druhá složka je tvořena třemi komponenty; INCEP, což je vnitřní centromerní protein, survivin a Borealin (též známý jako Darsa). INCEP, Survivin a Borealin mají specifické funkce a schopnost cílení (Garg a kol., 2016). Změna v jedné ze čtyř komponent může vést k defektu chromozomální segregace a/nebo k defektu cytokineze (Ruchaud a kol., 2007; Ruchaud a kol., 2007; Stauber a kol., 2007; Kitagawa a Lee, 2015). Jak je známo za segregace chromozómů během mitózy i meiózy je regulována pomocí kináz a fosfatáz. Aurora B kináza je spojována s mikrotubuly během pohybu chromozómů a při jejich segregaci. Aurora B kináza se vyskytuje na mikrotubulech poblíž, konkrétně na mikrotubulech K-fibres a Aurora kináza A na centrozomech (Liu a kol., 2009).

Analýza příspěvků jednotlivých komponent CPC ukazuje, že enzymatická složka Aurora B kináza je cílena na mitotické buňky ostatními třemi proteiny CPC komplexu. INCEP slouží jako strukturní bílkovina a stabilizuje celý CPC komplex. Borealin podporuje vazbu mezi survivinem a INCEP. Survivin hraje rozhodující roli v centromerní lokalizaci CPC (Vader a kol., 2006; Lens a kol., 2006).

10.6.2 Survivin- inhibitor apoptózy

Nadměrná exprese survivinu inhibuje jak vnější tak vnitřní dráhu apoptózy (viz výše kapitola o IAPs). Pokud dojde u lidských buněk k vyčerpání zásob survivinu, můžeme sledovat vznik chyb v průběhu apoptózy, ale ještě více chyb při buněčném dělení (Li a kol., 1999; Adams a kol., 2001).

Přesný mechanismus toho, jak dojde k inhibici není zcela znám. Předpokládá se, že k inhibici dojde přímou, nebo nepřímou vazbou na efektorové, nebo iniciační kaspázy, čímž dojde k inhibici apoptózy (Cheung a kol., 2013).

S odkazem na některé studie (Shin a kol., 2001; Tamm a kol., 1998), se survivin váže pomocí nanomolární afinity na aktivované kaspázy 3,7, ale nikoli na kaspázu 8. Jiné zase nepotvrzují interakci mezi survivinem a kaspázou 3 (Bank a kol., 2000). Tuto tezi podporuje i studie Eckelman a kol., která zpochybňuje vznik přímé vazby mezi survivinem a kaspázou 3, neboť právě survivin na rozdíl od ostatních IAPs, neobsahuje strukturní skupinu, která by byla schopná vytvořit vazbu mezi BIR doménou a kaspázou 3 (Eckelman a kol., 2006). Další studie popisuje přímou vazbu mezi survivinem a kaspázou 9, jejíž aktivita je tak inhibována (Johnson a kol., 2004).

Studie Marusawa a kol., zjistila, že survivin neinhibuje rekombinantní kaspázy 3,7, nebo 9 v enzymatických reakcích ani v extraktech z cytosolu buněk, které byly předtím stimulovány cytochromem c a dATP. Pokud je, ale survivin do tohoto extraktu přidán před aktivací kaspázy 9 pomocí přídatku cytochromu c a dATP, nedojde k aktivaci kaspázy 3/7.

Tyto výsledky napovídají, že survivin inhibuje aktivovanou kaspázu 9, ale ne aktivovanou kaspázu 3 a 7. Inhibice kaspázy 9 vyžaduje kofaktor (Marusawa a kol., 2003). V následující studii Marusawa a kol., byl jako kofaktor objeven HBXIP (hepatitis B virus X-interacting protein), který v kombinaci se survivinem inhibuje kaspázu 9 (Marusawa a kol., 2000).

Dalším navrhovaným mechanismem je, že survivin inhibuje vnitřní dráhu aktivace kaspáz (apoptózy) vazbou na pro-apoptické proteiny nazývané sekundární aktivátory kaspáz, které jsou odvozeny od mitochondrie (SMAC/DIABLO), SMAC/DIABLO se uvolňuje během vnitřní cesty z mitochondrie a aktivuje kaspázu 9, aby došlo k apoptóze. Pokud dojde k navázání survivinu na SMAC/DIABLO, nedojde k aktivaci kaspázy 9 a tak dojde k zabránění programované buněčné smrti (Johnson a kol., 2004).

Dalším pohledem na tuto problematiku je zaměření se na terminální konce survivinu. Podle studie Wheatley a kol., je C-terminální konec survivinu potřebný pro buněčné dělení. N-terminální konec není nezbytný pro apoptózu. Dále se předpokládá, že N-terminální konec slouží k ochraně před IR (irradiation) (Wheatley a kol., 2015).

V nedávných studiích byla nalezena spojitost mezi regulací pomocí survivinu a na kaspázách nezávislé apoptózy. Např. byla nalezena souvislost mezi survivinem a translokací AIF (apoptosis-inducing factor). AIF je flavoprotein, jehož výskyt je běžně omezen pouze na oblast mezi mitochondriálními membránami. Spouští kondenzaci chromatinu a fragmentaci DNA do vysokomolekulárních forem (o velikosti > 50kb), když je přesunut do jádra (Candé a kol., 2002; Wang a kol., 2002). Down-regulace survivinu způsobuje translokaci AIF u řady malignit (Cheung a kol., 2009; Okuya a kol., 2010; Croci a kol., 2008).

Z výše zmíněných studií je jasné, že mechanismus inhibice apoptózy není zcela znám. Existuje řada rozporuplných dat, avšak většina se shoduje v inhibici kaspázy 3,7 a 9.

10.6.3 Survivin a drug resistance

Šance na přežití nádorových buněk by měla být zvýšena na základě interakcí survivinu s řadou molekul účastnících se mitózy i apoptózy. Jedním z mechanismů úniku nádorů před apoptózou je tzv. drug-resistance, kdy s nadměrnou expresí survivinu koreluje i schopnost nádorových buněk být chemoresistentní (Kojima a kol., 2006; Pennati a kol., 2007; Zhang a kol., 2005).

Byla sledována chemoresistence vůči cisplatinové léčbě, pomocí nadměrné exprese survivinu, což mělo za následek inhibici apoptózy u rakoviny plic a rakoviny žaludku (Nomura a kol., 2005; Ikeguchi a kol., 2002). Stejná rezistence byla pozorována *in vitro* u rakoviny žaludku, buněčné linie MKN-45. Existuje korelace mezi silou chemoresistence a množstvím exprimovaného survivinu, tedy čím vyšší hladina survivinu, tím vyšší chemoresistence (Ikeguchi a kol., 2002). Tato schopnost byla podpořena i opačným mechanismem, tedy blokací survivinu pomocí shRNA, která indukovala na kaspázách závislou apoptózu a zvýšila citlivost na cisplatinu u skvamózních rakovinných buněk jazyka (Xu a kol., 2010).

Expresí survivinu také narušuje citlivost vůči řadě antimitotických sloučenin a proapoptických chemokinů u rakovinných buněk. Ve studii Zaffaroni a kol. bylo prokázáno, že stálá transfekce lidských buněk rakoviny vaječníků pomocí survivin-cDNA čtyřikrát až šestkrát zvyšuje resistenci těchto rakovinných buněk vůči taxatorové a taxolové chemoterapii (Zaffaroni a kol., 2002).

Survivin hraje významnou roli v indukci resistance vůči endokrinní léčbě rakoviny prsu a prostaty. V endokrinní léčbě rakoviny prsu s estrogen pozitivním receptorem se hojně využívá tamoxifen. Blokací survivinu pomocí siRNA dojde ke zvýšené apoptóze prostřednictvím tamoxifenu u MCF-7 buněk rakoviny prsu *in vitro* (Moriai, 2009).

Survivin nemusí být nutně kombinován pouze s imunoterapií, na tuto kombinaci se zaměřuje moje studie, jeho širší uplatnění je více než zřejmé ze studií výše. Je možné použít jeho blokaci jako doplněk klasické chemoterapie, kde díky inhibici survivinu dojde k vyšší citlivosti na chemoterapeutika a cytostatika. Je však nutné vzít v potaz relativně pomalý nástup inhibice survivinu a správně ji načasovat.

10.6.4 Survivin-podpora angiogeneze, metastáz a chemoresistence

Survivin podporuje angiogenezi, což je jedna z cest, která je zodpovědná za progresi nádorů. Survivin zvyšuje expresi VEGF a podporuje proliferaci endotelových buněk (ECS) (Fernández a kol., 2014).

Survivin tvoří zpětnovazebnou smyčku, kdy zvýšením transkripční aktivity β -catenin-TCF/LEF dojde ke zvýšení exprese cílových genů a tím získání vlastností, které jsou spojeny s vývojem, přežitím a progresí nádoru. Toho je dosaženo pomocí PI3K/Akt závislé signalizace v buňkách stejného druhu.

Survivin funguje po down-streamu VEGF signalizace, zahrnuje angiogenezi, která je spojena s progresí a růstem nádoru. Studie Fernández a kol. ukazuje, že survivin aktivuje transkripci VEGF, jeho expresi a akumulaci v podmíněném médiu a upřednostňuje angiogenezi ve VEGF-závislém prostředí (Fernández a kol., 2014). Ve studii Wang a kol. mělo vypnutí survivinu u gliomu za následek inhibici angiogeneze (Wang a kol., 2012). Indukce exprese VEGF pomocí survivinu má nejen vliv na angiogenezi, ale také na chemoresistenci a to tak, že stimuluje organizaci tubulinu do odlišných vláken (Tran a kol., 2002).

Survivin je zejména zvýšen u nádorových vaskulárních endotelových buněk v porovnání s buňkami ostatních tkání, čímž se zvyšuje chemoresistence těchto buněk (Virrey a kol., 2008). Blokadí survivinu by tedy nedošlo jen k usmrcení nádorových buněk, došlo by i k pozitivnímu zvratu u chemoresistentních vaskulo-endoteliárních nádorů.

Intermolekulární interakce mezi survivinem a XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis, také znám jako IAP3 (inhibitor of apoptosis protein 3)) podporuje invazi nádorových buněk *in vitro* a jejich rozsev *in vivo* u rakoviny prsu myšího modelu a insulinomu u potkaního modelu. Tato cesta funguje nezávisle na roli IAP v buněčném přežití. Transdukce touto cestou vedla k aktivaci NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), ke zvýšené transkripci fibroenktinu, autokrynní/parakrynní signalizaci pomocí β 1 intergrinů a konstitutivní fosforylaci, což je aktivace buněčných pohybových kináz jako je FAK (focal adhesion kinase) a Src (proto-oncogene tyrosine-kinase), včetně přímého zapojení IAPs do podpory metastáz (Garg a kol., 2016).

Nejpodstatnějším faktem je, že signální transdukce touto cestou nevyvolává klasickou epitel-mezenchymální tranzici (EMT) (Mehrotra a kol., 2010). EMT je proces, při kterém jsou epitelální buňky schopné změnit svůj fenotyp a migrovat (Thiery a kol., 2009). Vyvolává však adhezivní genový podpis a mnohokrát zvyšuje expresi genu pro fibroenktin v nádorových buňkách (Mehrotra a kol., 2010).

Další studii podporující funkci survivinu během metastazování nádorů vypracoval McKenzie a kol., jejímž závěrem je survivin, který hraje hlavní roli v metastazování melanomu prostřednictvím zvýšené regulace integrinů (McKenzie a kol., 2013). Studii dokládající spolupráci mezi survivinem a VEGF-C (vaskulární endotelový růstový faktor) podporující lymfatické šíření rakoviny prsu vypracoval Cai a kol. (Cai a kol., 2012). I mnoho dalších studií potvrzuje přímou korelaci mezi zvýšenou invazí a metastazováním nádorů a nadměrnou expresí survivinu.

Je tedy více než zřejmé, že survivin má daleko širší pole působnosti než je regulace apoptózy a dělení rakovinných buněk. Má vliv i na expanzi nádorů, pomocí upregulace angiogeneze a zvýšení chemoresistence.

10.7 Targeting a blokace survivinu

Z výše zmíněných funkcí survivinu je zřejmé, proč jsem si ho jako zástupce IAPs pro svou terapii vybrala. Vedlejší účinky jeho disrupce by mohly mít vliv na proliferaci buněk imunitního systému, které jsou pro naši imunoterapii nezbytné, proto si jeho benefity a naopak nevýhody shrneme v diskuzi.

Pro jeho narušení, blokaci a cílení existuje hned několik přístupů, mezi něž patří; imunoterapie cílená proti antigenu-survividu, malé molekulární inhibitory/antagonisti, princip založený na nukleových kyselinách.

1. Imunoterapie, která cílí survivin, je založena především na principech imunity získané, je zde potřeba prezentace pomocí APCs, především DCs cytotoxickým buňkám tak, aby došlo k vyvolání cytotoxické odpovědi. Survivin je u lidí 4. nejrozšířenějším antigenem u všech typů rakoviny, proto jeho cílení dává smysl a dochází v klinických a preklinických výzkumech k značným úspěchům (Garg a kol., 2016).

Normální vakcíny, které jsou využívány v imunoterapii obsahují peptidy, nebo celé rekombinantní proteiny spolu s adjuvanty, rekombinantní viry kódující požadovaný antigen, nebo jiné rekombinantní mikroorganismy, používají se DNA vakcíny, cytokinní a kostimulačně navyšující vakcíny, usmrcené nádorové buňky, pulzované DCs s proteiny a peptidy. Adjuvanty zvyšují antigenní prezentaci a aktivaci efektorových mechanismů, což vede k indukci silné CTL odpovědi proti antigenu (Garg a kol., 2016).

Důvody, proč je survivin ideálním antigenem mimo jeho vysokou expresi na různých druzích rakovinných buněk, již byly zmíněny. Bylo dokázáno, že survivin je vhodným proteinem, který indukuje CTL odpověď, pokud dojde k jeho prezentaci pomocí DCs (Diestelkoetter a kol., 2000) a u myšího modelu melanomu i u peptidů odvozených od survivinu (Hofmann a kol., 2009). Generace survivin specifických CTLs způsobuje lýzu nádorových buněk ve spojení s HLA komplexem u pacientů s rakovinou (Andersen a kol., 2001). Dále byla potvrzena u pacientů s melanomy, rakovinou prsu a leukemií přítomnost spontánní CTL odpovědi proti peptidům odvozených od survivinu a prezentovaných s MHCI molekulami (Reker a kol., 2004).

Dále byla studována kombinace lokální a systémové imunitní odpovědi, kdy došlo ke spojení účinné CTL odpovědi s cílením specifických CTLs na nádor *in situ* u melanomu a rakoviny prsu, kdy byl potvrzen survivin jako vhodný kandidát při tvorbě vakcín (Andersen a kol., 2001). Nyní jsou v preklinických a klinických studiích vakcíny založené na DCs, DNA vakcíny, peptidové vakcíny či VLP (virus-like-particle) vakcíny (Garg a kol., 2016).

Mimo CTL odpověď je v imunitní odpovědi podstatná i přítomnost protilátek a CD4+ T buněk (Aarntzen a kol., 2013). CD4+ buňky jako pomocné buňky hrají kritickou roli při nastartování a zesílení funkce CTLs a zvýšení proti-survivinové odpovědi (Tanaka a kol., 2011).

Survivinové peptidy byly prokázány jako vhodné epitopy MHCII molekul stimující Th buněčnou odpověď (Ohtake a kol., 2014). Vakcíny obsahující survivin tež ukázaly na roli CD4+ T buněk při udržení prvotní a paměťové protinádorové odpovědi (Sharma a kol., 2013).

Kromě možnosti použít survivin jakožto výrazně univerzální antigen v nádorové imunoterapii existují zcela odlišné přístupy vedoucí k poškození jeho funkce. Jednou z těchto možností jsou nízkomolekulární inhibitory survivinu.

2. Nízkomolekulární látky jsou již nějakou dobu vytvářené malé molekuly, které lze přesně cílit na survivin, jejich efekt je již zkoumán v řadě preklinických a klinických studií. Z těchto látek je nejrozšířenější třída YM155 (Nakahara a kol., 2007).

YM155 agents působí jako inhibitor vážící se na promotor survivinu a tím narušuje funkci promotoru (Nakahara a kol., 2007; Garg a kol., 2016). Jeho efekt byl sledován na preklinických modelech a ukázal se jako inhibitor specifický pro gen survivin (Nakahara a kol., 2007). Je to molekula, která výhradně potlačuje expresi survivinu a indukuje apoptózu u nádorových buněk s deficitem p53 *in vitro* (Nakahara a kol., 2007). Gen p53 je transkripčním faktorem, který zabraňuje vzniku nádoru (Aschroft a kol., 1999). YM155 se ukázal jako vhodný kandidát při blokaci survivinu i v pokusech *in vivo* u rakoviny prostaty (Nakahara a kol., 2007), pankreatického adenokarcinomu (Na a kol., 2012) a rakoviny plic (Giaccone a kol., 2009). YM155 je nyní v II. fázi klinických pokusů u pacientů s difúzním velkobuněčným lymfomem (Mobahat a kol., 2014).

Terameprocol (*tetra-O-methyl nordihydroguaiaretic acid (M(4)N)*) je malomolekulární inhibitor, který funguje podobně jako předešlý zástupce, stejně jako YM155 je transkripčním represorem, který se váže na oblast promotoru. Tato látka je nazývána Terameprecol (EM-1421) a je získávána z rostlin (Chang a kol., 2004).

UCI12 je znám jako potenciální selektivní inhibitor survivinu (viz diskuze)(Wang a kol., 2014).

Shepherdin je antagonistou survivin-Hsp90 komplexu (Plescia a kol., 2005). Shepherdin je ve skutečnosti sekvencí survivinu konkrétně K79-L82. Tento inhibitor byl nazván po shepherdin chaperonu Hsp90.

Purvalanol A je specifickým CDK inhibitorem p34^{cdc2}, inhibuje nejen aktivitu Cdc2, ale taktéž zabraňuje expresi survivinu (Iizuka a kol., 2008).

Piperine je alkaloidem z černého pepře, u něhož bylo zjištěno, že potlačuje růst u několika buněčných linií rakoviny tlustého střeva. Též je schopný zvýšit citlivost nádoru vůči chemoterapeutikům díky inhibici survivinu (Stella a kol., 2013).

Panepoxydone je sekundárním metabolitem izolovaným z jedlých hub, je dlouho znám pro své antibakteriální účinky. Panepoxydone interferuje s NF-kB, což vede k potlačení nádoru (Erkel a kol., 1996; Arora a kol., 2014). U buněk, které byly léčeny tímto agents, došlo k poklesu hladiny survivinu (Arora a kol., 2014).

NU6140 je novým CDK inhibitorem, který byl vytvořen Deviesem a kolektivem v roce 2002. Tento inhibitor potlačuje expresi a fosforylaci survivinu a v kombinaci s taxolem u HeLa buněk způsobuje synergický efekt vedoucí k potlačení růstu nádoru (Pennati a kol., 2005).

MK-2206 je alosterickým inhibitorem Akt a má neobyčejný protinádorový efekt v řadě nádorových buněčných linií (Chung a kol., 2017; Liu a kol., 2012). Bylo dokázáno, že fosforylace Akt je spojena s formací survivinu/XIAPs komplexu, zabránění fosforylace Akt vedlo ke snížení exprese survivinu (Chowdhury a kol., 2011). Díky inhibici Akt tedy dochází k potlačení survivinu.

Lapatinib je inhibitorem ErbB1 a ErbB2 tyrosine kinázy, touto inhibicí dochází k potlačení exprese survivinu a následnému vyvolání programované buněčné smrti (Xiao a Li., 2015).

KPT-185 je inhibitorem nukleárního exportu, u něhož bylo prokázáno, že má poměrně veliký úspěch u několika druhů rakovin např. rakoviny pankreatu (Azmi a kol., 2013). Značně vyvolává potlačení růstu nádoru a apoptózu nádorových buněk, dochází k down-regulaci survivinu (Wang a kol., 2014).

ICG-001 je inhibitorem TCF (β -catenin/T cell factor). Bylo prokázáno, že gen survivinu je zprostředkován právě TCF. Při léčbě rakoviny tlustého střeva bylo objeveno, že právě ICG-011 má vliv na sníženou expresi survivinu, což opět vedlo k potlačení nádorového růstu a apoptóze (Emami a kol., 2004).

Flavopiridol má široké pole působení na cyclin-dependentní kinázy (CDKs), je jejich inhibitorem. Tento inhibitor využívá narušení Thr34 fosforylace survivinu, jež je nezbytná pro správnou funkci survivinu (O'Connor a kol., 2000).

FL118 je velmi výkonným inhibitorem survivinu, jež funguje na principu navázání se na promotor survivinu a tím zabrání jeho expresi. Funguje tedy na podobném principu

jako YM155, nebo Terameprocol. Je účinný již při koncentraci menší než 1nM (Ling a kol., 2012).

Cephalochromin je látka izolovaná z fermentované *Cosmospora vilior*, YMJ8905150 a je využíván jako antibakteriální agent. Tento inhibitor potlačuje nejen survivin, ale i ostatní IAPs (Hsiao a kol., 2014).

Arctigenin je ligand izolovaný ze semen *Arctium lappa*, potlačuje proliferaci u různých druhů rakovin. Jeho protinádorový účinek spočívá v potlačení fosforylace STAT 3 a exprese survivinu (Wang a kol., 2014).

AICAR je posledním ze zástupců nízkomolekulárních inhibitorů survivinu, je novým inhibitorem Hsp90 (Meli a kol., 2006).

3. Molekulární antagonisté jsou další možností při blokaci účinku survivinu. Down-regulace survivinu pomocí liposomální/adenovirální siRNA se ukázala jako efektivní postup indukující apoptózu u různých druhů rakoviny (Cheung a kol., 2011). Malé interferující RNA (siRNA) jsou používány k akutnímu snížení hodnoty survivinu v rakovinných buňkách. Nyní v preklinických studiích tyto agents vykazují vysokou protinádorovou aktivitu, pokud jsou používány samostatně, nebo v kombinaci s chemoterapií, která samozřejmě způsobuje měřitelnou toxicitu (Pennati a kol., 2008).

Pokusy *in vivo*, kde byly použity siRNA napovídají, že utišení (silencing) survivin genu může hrát na určité úrovni velkou roli u pacientů s rakovinou (Davis a kol., 2010). Vedle siRNA jsou dalším příkladem molekulárních antagonistů anti-sense oligonukleotidy, které jsou také úspěšné při vyvolání programované buněčné smrti u rakovinných buněk. Mezi zástupce antisense-nukleotidů patří např. SPC3042 (Cheung a kol., 2011).

SPC3042 patří do skupiny LNA (locked nucleic acid) oligoneukleotidů, byl vytvořen jako plně fosforothioylovaný gapmer, který po stranách obsahuje 7 LNA nukleotidů. Tyto nukleotidy zajišťují stabilitu nukleáz a vyšší šanci k inhibici mRNA survivinu ve srovnání s dřívější generací antisense-nukleotidů. Bylo prokázáno, že SPC3042 způsobuje down-regulaci Bcl-2, zastavení cyklu a apoptózu (Hansen a kol., 2008).

Mechanismy založené na bázi oligonukleotidů, či malých interferujících RNA (siRNA), nebo antisense-oligonukleotidů jsou založeny na cílení mRNA survivinu, čímž dojde k zastavení (silence) jeho exprese. SPC3042 je na mRNA survivinu cílen na oblast zahrnující stop kodon otevřeného čtecího rámce v exonu 4 transkriptu survivinu. Preklinické studie odhalily, že SPC3042 je schopné snížit množství výskytu proteinu survivinu vyskytujícího se v buňkách PC3 rakoviny prostaty a následně vyvolat buněčnou

programovanou smrt a navíc ve té stejné studii byla zjištěna spojitost se zvýšením citlivosti buněk rakoviny prostaty vůči taxolové léčbě *in vivo*. Mezi další anti-sense látky patří např. **LY21811308/ISIS23722** (Hansen a kol., 2008).

4. Dominant-negative constructs jsou posledním druhem cílení survivinu pomocí genové transfekce např. T34A, nebo C84A mutanta, dochází k vyvolání apoptózy např. melanomu (Liu a kol., 2004).

C84A dominant-negative mutantní forma survivinu byla navržena na základě objevu, kdy mutace při níž dojde ke změně Cys84 na Ala v krajní C-terminální oblasti BIR domény, což rozruší koordinaci Zn^{2+} iontů a následně dojde ke ztrátě apoptické funkce survivinu (Cheung a kol., 2011).

T34A je dalším příkladem dominant-negative konstruktů, bylo zjištěno, že fosforylace survivinu na Thr34 je nezbytné ke stabilitě survivinu a tudíž hraje roli při podpoře progresu buněčného cyklu a při inhibici kaspáz. Mutace Thr34 na Ala zcela zruší fosforylaci survivinu, což má za následek disociaci komplexu survivin-caspase-9 (O'Connor a kol., 2000). Survivin-T34A má bohatou historii, nejdříve byl použit jako napodobenina nefosforylovaného survivinu a nyní se používá jako možné terapeutikum rakoviny. V molekulární terapii má vysoký potenciál díky své nízké toxicitě a schopnosti vyvolat apoptózu a imunitní modulaci zatímco je snížena angiogeneze, tvorba metastáz a progresse buněčného cyklu v buňkách, které exprimují survivin (Wall a kol., 2012).

11 Diskuze

Pan doktor Ženka se již několik let se svým týmem zabývá problematikou nádorové imunoterapie. Cílem mé práce bylo zvážit možnosti kombinace naší imunoterapie s dalším léčebným postupem, díky němuž by byla naše směsice účinných látek: **mannan-BAM + poly(I:C)+ R-848+ LTA+ anti-CD40** rozšířena o složku, nebo mechanismus, který by měl za následek oslabení nádorových buněk a tím i zesílení terapeutického výsledku. Terapie, která je založena na intratumorální aplikaci imunomodulátorů, sice dosahuje poměrně velmi dobrých výsledků, ale účinek na metastázy je nižší a vznikla tedy potřeba ho výrazně podpořit nezávislou terapií.

Za tento přidaný postup jsem zvolila manipulaci se survivinem. Survivin může sloužit jako univerzální nádorový antigen (Garg a kol., 2016), nebo může být cílen jako funkční protein obsažený ve všech nádorových buňkách, jehož blokáce, jak bude dále rozvedeno, vede k řadě protinádorových, ale i vedlejších účinků. Atak obojích principů vedený nutně naprosto odlišnými způsoby by vedl k jednotnému cíli, jímž je potlačení nádorového růstu a eliminace nádorových buněk.

První mechanismus nádorové terapie cílené na survivin využívá skutečnosti, že je survivin 4. nejrozšířenějším antigenem na povrchu všech rakovinných buněk. Tato skutečnost činí ze survivinu velmi zajímavý univerzální antigen na němž je možné celou imunoterapii postavit (Garg a kol., 2016). Tímto postupem bychom se zcela vyhnuli vedlejším účinkům, které jsou spojeny s blokáci survivinu, ale zároveň bychom nezískali ani výhody blokáce. Tato terapie je cílená na povrchové fragmenty survivinového proteinu, které jsou prezentované ve spojitosti s MHC molekulami. Terapie spočívá v přípravě DCs, tedy antigen prezentujících buněk, které na svém povrchu ponесou právě zmíněný survivin a budou ho následně *in vivo* prezentovat efektorovým cytotoxickým lymfocytům (Diestelkoetter a kol., 2000). Tento mechanismus je jakousi výjimkou mezi všemi ostatními, nejedná se o blokáci a inhibici survivinu, ale jeho cílení, které vede k vyvolání CTL odpovědi. Pokud by se našel mechanismus, kterým by šla dokonce prezentace tohoto antigenu na nádorových buňkách zvýšit tak, aby byl imunitní systém schopný vypátrat i nejdlehlší metastázy, byl by to opravdový zlom v nádorové imunoterapii založené na prezentaci survivinu nádorovými buňkami.

Naše nádorová imunoterapie založená na primární likvidaci nádorů intratumorální aplikací imunomodulátorů s následnou vakcinací organismu se DC terapií v mnohém podobá. Hlavní rozdíl je především v tom, že veškeré procesy probíhají v reálném čase *in situ*. Survivin se bezpochyby stává jedním z antigenů, kterým vakcinujeme a atak jeho

fragmentů s MHC I pomocí vytvořených CTL určitě nastává. Pro antigenní prezentaci vytváříme ideální podmínky, celkový vakcinační účinek bychom však mohli zesílit souběžnou aplikací survivinu při intratumorální vakcinaci. Za zvážení by stálo použití survivinu ve formě umožňující jeho interakci s buněčnými membránami, což by jeho pohlcení APCs a následnou prezentaci mohlo zesílit.

Co se týče blokování survivinu, survivin je velmi atraktivním cílem při tvorbě různých protinádorových postupů. Bohužel podobně jako všechny mechanismy má své výhody a nevýhody. Jeho cílení nám přinese řadu výhod, které by se jistě projevily ve výsledku, nicméně i zde je třeba uvědomit si možná rizika spojená s jeho cílením.

Mezi výhody cílení a likvidace survivinu jakožto biologicky aktivní látky jistě patří fakt, že po jeho potlačení dojde k omezení jeho početných funkcí. Mezi jeho funkce patří např. inhibice na kaspázách závislé i nezávislé apoptózy, díky níž se nádorové buňky stávají nesmrtelnými. Další funkcí je zajištění chemoresistence a radioresistence nádorových buněk vůči chemoterapii a RT (Cheung a kol., 2013). Survivin hraje podstatnou roli při regulaci buněčného cyklu, je schopný ho potlačit podobně jako apoptózu (Wall a kol., 2012). Dále jeho funkce spočívá v regulaci buněčného dělení, zasahuje do proliferace nádorových buněk, tím že podporuje jejich schopnost se dělit, neboť je součástí CPC komplexu, který zajišťuje správnou segregaci chromozomů a cytokinů během buněčného cyklu (Li a kol., 1999). Podporuje progresi, angiogenezi a jeho přítomnost je zpravidla spojována se špatnou prognózou (Chen a kol., 2016).

Potlačením funkcí survivinu by byly splněny všechny cíle, jež jsme si pro tuto práci položili. Došlo by k vyvolání apoptózy, která byla zablokována survivinem, k potlačení proliferace, progresu a angiogeneze nádorových buněk. To vše by mělo za následek zlepšení celkové prognózy pacientů a nádory by přestaly být chemoresistentní vůči cytostatikům a radioresistentní vůči RT terapii. Došlo by k oslabení primárních nádorů, ale i metastáz, díky potlačení angiogeneze, která je nezbytná pro budoucí zásobení vzdálených ložisek nádorových buněk, navíc by byla omezena i progresu nádorového onemocnění, která je při tvorbě metastáz klíčová. Oslabením nádoru a metastáz by došlo k úbytku celkové nádorové masy, díky čemuž by naše terapie byla zase o něco silnější. Všechny výše zmíněné skutečnosti činí ze survivinu opravdu zajímavý terapeutický cíl. Nicméně musíme počítat i s případnými negativy.

Mimo to, že survivin ovlivňuje buněčný cyklus nádorových buněk, ovlivňuje jej i u buněk ostatních. Např. reguluje přechod G₁-S T lymfocytů (Song a kol., 2005), normálních

hematopoetický progenitorových buněk (Fukuda, 2002). Dále je survivin exprimován a reguluje funkce v embryonálních kmenových buňkách, totipotentních kmenových buňkách, v tzv. rakovinných kmenových buňkách (Mull a kol., 2014), dále pak v hematopoetických kmenových buňkách, neuronálních kmenových buňkách či intestinálních kmenových buňkách (Fukuda a kol., 2004; Feng a kol., 2013; Nakay a kol., 2014). Blokace by v tomto případě přinesla výsledky pouze v případě rakovinných kmenových buněk. Survivin má též regulační funkci u vaskulárních endoteliálních buněk (Mesri a kol., 2001), polymorfonukleárních buněk (Altnauer a kol., 2004), T buněk (Xing a kol., 2004), erytroidních buněk (Gurbuxani a kol., 2005). U lidí a myši je exprese survivinu v T buňkách regulována přítomností IL-2, ConA (concanavalin A), anti-CD3, phytohemagglutinin (PHA). Je exprimován v dospělých periferních T buňkách, tymocytech, tak bohužel i v paměťových buňkách, neutrofilech a megakaryocytech (Fukuda, 2006).

Zasahuje tedy do regulace buněk vrozené i získané imunity. Zasahuje do proliferace neutrofilů, které jsou nezbytné při vyvolání vrozené imunitní odpovědi, makrofágů, megakaryocytů a jiných buněk imunitního systému, do následné klonální expanze a funkce T lymfocytů, proliferace efektorových tak i paměťových buněk a ostatních buněk lymfoidní a erytroidní řady. Tyto buňky jsou pro naši imunoterapii zásadní, proto si nemůžeme dovolit naši kombinaci látek rozšířit např. o inhibitor, který by mohl funkci buněk imunitního systému ohrozit. Tyto látky nemohou být použity současně, to by se dalo obejít správným načasováním inhibice survivinu pomocí blokátoru, viz níže.

Proberme tedy jednotlivé skupiny látek blokujících survivin a jeho funkce z hlediska kombinovatelnosti s nádorovou imunoterapií obecně a našim přístupem zvlášť. Začneme molekulárními antagonisty mezi než patří liposomální/adenovirální siRNA a antisense oligonukleotidy, které bych k zajištění uvedených cílů nepreferovala a pokusím se objasnit proč.

Obě tyto podskupiny vedou k utišení genu pro survivin. Liposomální/adenovirální siRNA jsou malé interferující molekuly siRNA, které slouží k akutnímu snížení hladiny survivinu (Pennati a kol., 2008). Antisense oligonukleotidy se navazují na mRNA survivinu a tím zabraňují jeho translaci.

Mezi nejvýznamější antisense oligonukleotidy patří např. SPC3042. Důvodem, proč bych tuto látku nezvolila, je zbytečná složitost tohoto postupu, bála bych se zde negativní interakce s naší imunoterapií (např. zásahu do proliferace buněk imunitního systému), nebo jinými pro nás důležitými proteiny, zároveň nejsou k dispozici informace, které by vznik negativních interakcí vyvrátily (Cheung a kol., 2011). Dalším zástupcem antisense

oligonukleotidů je např. LY21811308/ISIS23722 u jehož použití mám stejné obavy jako u SPC3042 (Hansen a kol., 2008).

Další skupinou inhibitorů jsou tzv. dominant negative-constructs. Tato skupina je ze všech zástupců zdaleka nejsložitější. Zástupci této skupiny C84A a T34A mutanti cílí survivin svou genovou transfekcí (Cheung a kol., 2011), mechanismus jejich působení je nastíněn v kapitole o targetingu a cílení survivinu. Velmi zajímavý je především T34A zástupce, který je velmi slibným kandidátem této skupiny, neboť mimo jiné funkce, které mají i ostatní kandidáti jako je inhibice survivinu nebo vyvolání apoptózy, má dokonce imunomodulační schopnosti, snižuje angiogenezi, tvorbu metastáz aj. (Wall a kol., 2012). Nicméně i tento zástupce ve mě vyvolává strach z možného vzniku negativních dopadů na naši imunoterapii. Již naše imunoterapie imunitní systém moduluje, podporuje směrem jakým potřebujeme. Představa pozitivní koexistence takto složitých principů ve mě vyvolává obavy a je nutné pokračovat ve studiích, které by mou nedůvěřivost zvrátily.

Antisense oligonuklotidy, liposomální/adenovirální siRNA a negative-constructs jsou, jak již jsem výše zmínila, pro naši imunoterapii přehnaně složité. Chybí studie, které by podpořily jejich koexistenci s imunoterapií a imunitním systémem. My potřebujeme najít látky, které jsou rychlé, účinné a jistým benefitem je i cena a postup, který by byl co nejjednodušší kvůli negativním účinkům spoluúčasti dvou odlišných postupů, také nemáme neomezené laboratorní podmínky, které by nám takto složitý postup umožňovaly. Není to nemožné, ale snažím se nalézt postup, který by byl co nejefektivnější a zároveň nás nepříjemně neomezoval.

Potřebujeme postup na bázi chemické látky, kterou můžeme aplikovat krátkodobě a rychle, takové podmínky nejlépe splňují zástupci nízkomolekulárních inhibitorů. Bude pro nás klíčový timing-načasování, tak abychom se co nejvíce vyhnuli negativním účinkům inhibice survivinu a jejich dopadu na buňky imunitního systému.

Z tohoto hlediska mi přijdou nejschůdnější tři možnosti. Tento nízkomolekulární inhibitor bych aplikovala buď před zahájením imunoterapie, tak aby došlo k co největšímu oslabení nádoru spojeného s inhibicí pronádorových funkcí survivinu. Dojde k úbytku nádorové masy, buňky budou citlivější k látkám obsaženým v naší imunoterapii a dojde k tomu, co je velmi vyžadováno a to je tzv. uvolnění nádorových antigenů. Bylo by velmi vhodné se pokusit najít inhibitor, který atakuje nádory, ale v poměrně krátké době dojde k jeho odplavení a vyloučení tak, aby neovlivňoval tvorbu imunitních buněk a zejména klonální expanzi lymfocytů.

Druhou možností je inhibovat survivin až po naší imunoterapii v době, kdy jsou již vytvořené paměťové buňky a kdy je ukončeno navakcinování organismu primárním nádorem. V případě nutnosti boje s metastázemi případně s nádorovou rekurencí se jeví blokace survivinu jako velmi výhodná, neboť zmíněné nádory si budou znovu budovat systémy protiimunitního ataku a blokace survivinu by mohla být cestou, jak tyto nádory rozhodujícím způsobem oslabit. Jelikož bude následně docházet k nutné proliferační expanzi T lymfocytů, je opět nutné, aby účinek blokace survivinu a oslabení nádorů byl krátký a tyto procesy neovlivňoval.

Poslední možností je začlenit blokaci survivinu jako mezistupeň, aplikovat ho po imunoterapii tak, aby došlo k oslabení nádoru a rozvoji protinádorových vlastností spojených s inhibicí, z nichž by byla nejefektivnější v tomto případě inhibice chemoresistence, nebo radioresistence a učinit tak nádor citlivý na tuto terapii. Po úbytku nádorové hmoty, narušení angiogeneze, vyvolání apoptózy a dalších protinádorových funkcí začlenit další terapii a to nejlépe radioterapii, která by nás zbavila veškeré zbývající rakovinné hmoty, která by se v organismu vyskytovala. Bohužel radioterapie opět není v našich laboratorních podmínkách možná, ale do této trojkombinace bych vkládala největší naději. Cílená chemoterapie vyvinutá týmem prof. Říhová je v naší laboratoři testována, takže tato kombinace imuno/survivin/chemo je reálná.

Nejlépe podmínky koordinace s nádorovou imunoterapií splňuje poslední skupina inhibitorů, v kterou vkládám největší naděje a kterou bych vybrala pro naši terapii a to je skupina nízkomolekulárních inhibitorů. Tyto inhibitory jsou na bázi chemických látek a nejlépe by splňovaly podmínky, které v naší kombinaci s imunoterapií vyžadujeme.

Nicméně vývoj těchto inhibitorů je náročný, především kvůli požadavku na narušení interakce protein-protein. Stále je množství těchto inhibitorů limitující a bohužel velká řada z nich interaguje s jinými biomolekulami než je survivin a tak snižuje jeho množství nepřímo (Xiao a Li, 2015). U těchto inhibitorů bych se opět bála nežádoucích interakcí, které by naši imunoterapii mohly ohrozit. Patří mezi ně např. AICAR, Arctigenin, Cephalochromin, Flavopiridol, ICG-001, MK-2206, NU6410, Panepoxydone, Purvanol A, Shepherdin a Lapatinib, který je již dokonce ve III. fázi klinického výzkumu a ze všech kandidátů má nejslibnější výsledky (Xiao a Li., 2015).

Ačkoli by bylo možné použít všechny zástupce nízkomolekulárních inhibitorů, přiklonila bych se k zástupcům, kteří jsou již v klinických fázích pokusu a mají vyvráceny toxické účinky, nebo zástupci kteří působí na gen survivinu nebo protein survivinu přímo.

Mezi jedinné zástupce, které mají výhradně survivinovou specifitu patří např. UC112 (Wang a kol., 2014). Navíc bylo prokázáno, že inhibuje specificky survivin a nijak neovlivňuje ostatní členy IAPs a nemá vedlejší účinky. Je jakýmsi startovním můstkem pro tvorbu specifických inhibitorů cílených výhradně vůči survivinu (Wang a kol., 2014).

Dalším zástupcem, který inhibuje expresi survivinu navázáním na jeho promotor je FL118, tento zástupce je schopný redukovat nádorový růst již při koncentraci menší než 1 nM, může též inhibovat další zástupce IAPs jako je Mcl-1, XIAP nebo cIAP2, což též vede ke snížení pronádorové aktivity. Jeho *in vivo* studie navíc potvrdily tyto excelentní protinádorové vlastnosti bez významné toxicity. Jeho efektivnost a selektivita slibuje velký úspěch pro jeho nástupce FL188 (Zhao a kol., 2014).

Posledními dvěma nejznámějšími zástupci jsou Terameprocol a YM155. Terameprocol, neboli meso-tetra-O-methyl nordihydroguaiaretic acid, též známý jako M4N, byl nejdříve známý pro své inhibiční účinky HIV transaktivace (Hwu a kol., 1998). Následné studie však ukázaly, že je schopným transkripčním inhibitorem, který je schopný zabránit nádorovému růstu pomocí inhibice exprese Cdc2 a survivinu (Chang a kol., 2004). Není tedy výhradním inhibitorem survivinu jako je např. UC112, nebo YM155, ale nyní je ve fázi I klinických testů, jejichž výsledky ukazují na jeho excelentní bezpečnostní profil, z tohoto důvodu bych se nebála použít ani tohoto kandidáta.

Posledním zástupcem je YM155, tento imidazolium bromid je typickým a nejznámějším zástupcem nízkomolekulárních inhibitorů survivinu, který vykazuje dobré selektivní výsledky pro survivin vůči ostatním IAPs. Nicméně ve studii Nakahary a kolektivu vykazovala suprese survivinu jisté nepatrné vedlejší účinky i na ostatní IAPs, navíc zvyšuje citlivost vůči chemoterapeutikům podobně jako ostatní zástupci (Xiao a Li, 2015; Nakahara a kol., 2007). Mechanismus jejich účinku je nastíněn v podkapitole o nízkomolekulárních inhibitorech.

Ráda bych upozornila, že všechny zástupce by bylo možné pro naši terapii použít, bohužel neexistují data, která by potvrdovala, nebo vyvracela mé domněnky ani data shrnující koexistenci naší imunoterapie s blokací survivinu. Snažila jsem se pouze vyzdvihnout zástupce, u nichž by vedlejší efekty měly být, dle mého názoru minimální. Kombinovatelnost konkrétních inhibitorů s naší imunoterapií může ukázat pouze experiment.

Co se týká vakcinace samotné doporučovala bych z hlediska snahy odstranění i vzdálených metastáz vakcinaci systémovou s použitím směsi mrtvých nádorových buněk s

našimi imunomodulátory, nebo kombinací vakcinace systémové zaměřené proti metastázám a vakcinaci intratumorální pro současné odstranění primárního nádoru.

Závěrem bych shrnula, že je možné použít blokaci survivinu s naší imunoterapií, ale je nutné snažit se vyhnout vedlejším účinkům, které jsou spojené s blokací survivinu. Těmto neduhům se dá předejít správným a krátkodobým působením nízkomolekulárních inhibitorů ve správných časových intervalech popsaných výše.

Cílem do budoucna je jistě vytváření dalších nízkomolekulárních inhibitorů, které by měly co nejvyšší specifitu na survivin. Tato výzva je velmi obtížná, neboť je survivin součástí různých komplexů a inhibitory často interferují s jejich molekulami jako je Hsp90, Borealin, INCENP, aurora B kináza a různé kaspázy. Navíc je nutné dále provádět studie, které objasní vedlejší účinky na normální tkáň a složky imunitního systému, které jsou nezbytné pro naši imunoterapii a studie zabývající se kombinací inhibice survivinu s imunoterapií.

12 Závěr

* Survivin je díky svým funkcím velmi slibným kandidátem pro targeting při tvorbě protinádorových mechanismů.

* Nejčastěji je spojován s radioterapií a chemoterapií, které využívají přínosů spojených s inhibicí survivinu a to především zvýšené citlivosti na chemoterapeutika a RT záření.

* Kombinace s nádorovou imunoterapií není příliš známá a především je třeba zvažovat vedlejší účinky, které by vznikly při společném spolupůsobení, neboť survivin svými funkcemi zasahuje nejen do buněčného cyklu, proliferace a regulace nádorových buněk, ale i buněk normálních včetně buněk imunitního systému. Musíme tedy počítat nejen s velmi pozitivními přínosy, ale zároveň možnými negativními vlivy spojenými s blokadou survivinu.

* Kombinace s naší imunoterapií je možná, vedlejším efektům spojených s inhibicí se dá předejít správným načasováním a krátkodobým působením. Tyto dvě metody nemohou působit současně, riziko vzniku negativních efektů u buněk imunitního systému je příliš velké, především proliferace je pro nás klíčová.

* Jako nejvhodnější kandidáti pro naši imunoterapii se mi jeví nízkomolekulární inhibitory s co nejkratší dobou působení, s co největší survivinovou specificitou a o co nejmenší velikostí, díky níž by byly schopny difundovat celým tělem a tak zacílit i ty nejvzdálenější metastázy.

*Vakcinaci, která blokadou survivinu bude buď předcházet, nebo ji následovat, bych doporučovala systémovou, aby co nejlépe působila na likvidaci metastáz. Zde je ale dle mého názoru nutno počítat s větším výskytem nežádoucích účinků postihující i normální tkáň, než u vakcinace intratumorální postihující zejména primární nádor. Možná je i kombinace obou druhů vakcinací.

* Za cíl do budoucna vidím především studie, které by minimalizovaly negativní účinky spojené s inhibicí survivinu v kombinaci s imunoterapií. U nízkomolekulárních inhibitorů survivinu, které se pro tuto kombinaci jeví jako vhodné, je třeba se zaměřit na vývoj látek vysoce specifických a usilovat o dosažení maximální synergie s působením imunitního systému.

13 Seznam zkratek

Ab	protilátky
ADCC	antibody-dependent cellular-cytotoxicity
AFP	alfa-feto-protein
Ag	antigen
AICAR	5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide
AIF	apoptosis-inducing factor
AK	aminokyselina
Ala	alanin
APCs	antigen presenting cells
BAM	biocompatible anchor for cell membrane
BCR	B cell receptor
BIR domain	baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat
C'	komplement
CALLA	common acute lymphoblastoid leukemia antigen
CAR	chimerické antigenní receptory
CD	cluster of differentiation (ozn. molekul na buňkách, které mají stejnou antigenní determinantu)
CD8+	cytotoxické buňky
CD4+	pomocné buňky
CDK	cyklin dependentní kináza
CEA	carcino-embryonic-protein
CNS	centrální nervová soustava
CPC	chromosomal passenger complex
CRPs	C- lektinové receptory
CSFs	colony stimulating factors
CTLs	cytotoxic T lymphocytes
Cys	cystein
DAMPS	damage-associated molecular patterns
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
dATP	deoxyadenosine triphosphate
DCs	dendritic cells
DISC	death inducing signaling komplex

DOPE	Dioleoyl
DTT	dithiothreitol
ECS	endothelial cells
EMT	epitelo-mezenchimální tranzice
EPCAM	epithelial cell adhesion molecule
ESCC	esofageální dlaždicový karcinom jícnu (esophageal squamous cell carcinoma)
Fadd	Fas-associated protein with death domain, také zvaný MORT1
FAK	focal adhesion kinase
FasL	Fas ligand
FcR	imunoglobulinové receptory
Fc_εRII	receptory IgE s nízkou afinitou (také CD23)
f-MLF	N-Formyl-methioninyl-leucyl-phenylalanin
FPR	formylmethionine phagocytic receptor
FRPs	formyl peptidové receptory
G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor
HBXIP	hepatitis B virus X-interacting protein
HLAs	human-leucocyte-antigen
HSC	normal hematopoetic stem cells
Hsp	heat shock protein (např. Hsp90)
IAPs	antiapoptické proteiny
IFN	interferon (např. IFN- γ)
Ig	imunoglobulin (např. IgE)
IL	interleukin (např. IL-1, IL-2 atd.)
INCENP	inner centromere protein
IR	irradiation
IS	imunitní systém
LAG	lymphocyte activation gene (např. LAG-3)
LBP	LPS binding protein
LCSC	stem cells of leukemia
LMP	latent membrane protein
LNA	locked nucleic acid
LPS	lipopolysacharidy
LTA	lipoteich acid

mAb	monoklonální protilátky
MAC	membrane attack complex
MAGE	cancer testis antigen
MBL	manózu vázající lektin
MDSCs	myeloid-derived supressor cells
MHC	major histocompatibility complex
MIP	macrophage inflammantory protein (MIP-1 β)
MM	maligní melanom
MODS	multi-organ dysfunction syndrome
MORT1	Fas-associated protein with death domain
MPLA	monophosphoryl lipid A
MR	mineralocorticoid receptor
NETs	neutrophil extracellular traps
NF	nuclear factor (např. NF- κ B) nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK	natural killer
NLR	NOD like receptors
NOR	národní onkologický registr
Oct	octamer-binding transcription factor (např. Oct-4)
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
PCR	polymerase chain reaction
poly (I:C)	Polyinosinic:polycytidylic acid
PRRs	pathogen-recognition receptors
PTAN	phosphate and tensin homolog
R-837	imiquimod
R-848	resquimod
RA	revmatoidní artritida
Rb	retinoblastoma protein
R0 resekce	úplné odstranění nádoru na konci výkonu
receptor PD	receptor programmed death (např. receptor PD-1)
RING	really interesting new gene
RT	radioterapie
shRNA	short hairpin RNA
SIRS	systemic inflammatory response syndrome

SMAC	second mitochondria-derived activator, též znám jako DIABLO)
SMCC	cyklohexanecarboxilic-acid N-hydroxysuccinimide ester
Sp	specificity protein (např. Sp1)
Src	proto-oncogene tyrosine-kinase
STAT	signal transducer and activator of transcription (Např. STAT3)
TAA s	tumor associated antigens
TAN s	tumor-associated neutrophils
TAP	transporter associated protein
Tc	cytotoxický T lymfocyty
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride
TCF/LEF	T cell factor/lymphoid enhancer factor
TCR	T cell receptor
TGF	transforming growth factor
Thr	threonin
TIM	T-cell immunoglobulin and mucin-domain (např. TIM-3)
TLR s	toll like receptors
TNF	tumor necrosis factor
TREG s	regulatory T cells
TSAs	tumor specific antigens
UVR	UV-radiation
ÚZIS	Ústav zdravotnických informací a statistiky
VEGF	vascular endothelial growth factor
XIAPS	X-linked IAPs

14 Použitá literatura

Aarntzen, E. H. J. G., De Vries, I. J. M., Lesterhuis, W. J., Schuurhuis, D., Jacobs, J. F. M., Bol, K., et al. (2013). Targeting CD4 T-Helper Cells Improves the Induction of Antitumor Responses in Dendritic Cell-Based Vaccination. *Cancer Research*, 73(1), 19-29.

Abbas, A. K., Lichtman, A. H. H., & Pillai, S. (2012). *Cellular and molecular immunology* (7th ed.). Philadelphia: Elsevier/Saunders.

Adams, R. R., Carmena, M., & Earnshaw, W. C. (2001). Chromosomal passengers and the (aurora) ABCs of mitosis. *Trends Cell Biol*, 11(2), 49–54.

Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4), 783-801.

Altzner, F., Martinelli, S., Yousefi, S., Thürig, C., Schmid, I., Conway, E. M., et al. (2004). Inflammation-associated Cell Cycle-independent Block of Apoptosis by Survivin in Terminally Differentiated Neutrophils. *The Journal of Experimental Medicine*, 199(10), 1343-1354.

Ambrosini, G., Adida, C., & Altieri, D. C. (1997). A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nature Medicine*, 3(8), 917-921.

Andersen, M. H., Pedersen, L. O., Becker, J. C., & Straten, P. T. (2001). Identification of a cytotoxic T lymphocyte response to the apoptosis inhibitor protein Survivin in cancer patients. *Cancer Res.*, 61(3), 869–72.

Andersen, M. H., Pedersen, L. O., Capeller, B., Brocker, E. B., Becker, J. C., & Straten, P. (2001). Spontaneous cytotoxic T-cell responses against Survivinderived MHC class I-restricted T-cell epitopes in situ as well as ex vivo in cancer patients. *Cancer Research*, 61(16), 5964–5968.

Anguille, S., Willemen, Y., Lion, E., Smits, E. L., & Berneman, Z. N. (2012). Dendritic cell vaccination in acute myeloid leukemia. *Cytotherapy*, 14(6), 647-656.

Antonacopoulou, A. G., Floratou, K., Bravou, V., Kottorou, A., Dimitrakopoulos, I., Marousi, S., Stavropoulos, M., Koutras, A. K., Scopa, C. D., & Kalofonos, H. P. (2010). The Survivin -31 snp in human colorectal cancer correlates with Survivinsplice variant expression and improved overall survival. *Analytic Cellular Pathology*, 33(5), 177–189.

Araujo-Pires, A. C., Francisconi, C. F., Bigueti, C. C., Cavalla, F., Aranha, A. M. F., Letra, A., et al. (2014). Simultaneous analysis of T helper subsets (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh, Tr1 and Tregs) markers expression in periapical lesions reveals multiple cytokine clusters accountable for lesions activity and inactivity status. *Journal of Applied Oral Science*, 22(4), 336-346.

Arora, R., Anke, C., Gary, O., Stagno, F., Di Raimondo, F., Manzella, L., et al. (2014). Inhibition of NF- κ B Activation by Panepoxydone: A new target for anti-cancer therapy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 9(1), 214-221.

Ashcroft, M., Kubbutat, M. H. G., & Vousden, K. H. (1999). Regulation of p53 Function and Stability by Phosphorylation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation. *Molecular and Cellular Biology*, 19(3), 1751-1758.

Ashley, N. T., Weil, Z. M., & Nelson, R. J. (2012). Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation. *Annual Review Of Ecology, Evolution, and Systematics*, 43(1), 385-406.

Azmi, A. S., Aboukameel, A., Bao, B., Sarkar, F. H., Philip, P. A., Kauffman, M., et al. (2013). Selective Inhibitors of Nuclear Export Block Pancreatic Cancer Cell Proliferation and Reduce Tumor Growth in Mice. *Gastroenterology*, 144(2), 447-456.

Banchereau, J., Steinman, R. M., & Vousden, K. H. (1998). Dendritic cells and the control of immunity: Mechanisms, Costs, and Natural Variation. *Nature*, 392(6673), 245-252.

Banks, D. P., Plescia, J., & Altieri, D. C. (2000). Survivin does not inhibit caspase-3 activity. *Blood*, 96, 4002-4003.

Barry, M., Heibei, J. A., Pinkoski, M. J., Lee, S. F., Moyer, R. W., Green, D. R., & Bleackley, R. Ch (2000). Granzyme B short-circuits the need for caspase-8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid. *Molecular and Cellular Biology*, 22(11), 3781-3794.

Benoit, M., Desnues, B., Mege, J. L., Whittington, R. J., Plain, K. M., Bozza, P., & Erlebacher, A. (2008). Macrophage Polarization in Bacterial Infections. *The Journal of Immunology*, 181(6), 3733-3739.

Berglund, H., Olerenshaw, D., Sankar, A., Federwisch, M., McDonald, N. Q., Driscoll, P. C., et al. (2000). The three-dimensional solution structure and dynamic properties of the human FADD death domain 1 Edited by A. Fersht: Enemies Within. *Science*, 281(5381), 1312-1316.

Beutler, B., Olerenshaw, D., Sankar, A., Federwisch, M., McDonald, N. Q., Driscoll, P. C., & Erlebacher, A. (2004). Innate immunity: an overview. *Molecular Immunology*, 40(12), 845-859.

- Blaisdell, A., Crequer, A., Columbus, D., Daikoku, T., Mittal, K., Dey, S. K., & Erlebacher, A. (2015). Neutrophils Oppose Uterine Epithelial Carcinogenesis via Debridement of Hypoxic Tumor Cells. *Cancer Cell*, 28(6), 785-799.
- Boatright, K. M., Renatus, M., Scott, F. L., Sperandio, S., Shin, H., Pedersen, I. M., et al. (2003). A Unified Model for Apical Caspase Activation: an overview. *Molecular Cell*, 11(2), 529-541.
- Borregaard, N., Renatus, M., Scott, F. L., Sperandio, S., Shin, H., Pedersen, I. M., et al. (2010). Neutrophils, from Marrow to Microbes: an overview. *Immunity*, 33(5), 657-670.
- Brunstein, C. G., & McGlave, P. B. (2001). The biology and treatment of chronic myelogenous leukaemia. *Oncology*, 15(1), 23-32.
- Cai, Q., Brissova, M., Reinert, R. B., Cheng Pan, F., Brahmachary, P., Jeansson, M., et al. (2012). *Developmental Biology*, 367(1).
- Caisová, V., Uher, O., & Nedbalová, P., (2017). Effective cancer immunotherapy based on combination of TLR antagonists with stimulation of phagocytosis. Posláno do *International Immunopharmacology*.
- Caisová, V., Vieru, A., Kumžáková, Z., Glaserová, S., Husníková, H., Vácová, N., et al. (2016). Innate immunity based cancer immunotherapy: B16-F10 murine melanoma model. *BMC Cancer*, 16(1).
- Caldas, H., Honsey, L. E., & Altura, R. A. (2005). Survivin 2alpha: a novel Survivin splice variant expressed in human malignancies. *Molecular Cancer*, 4(1), 1-9.
- Candé, C., Cohen, I., Daugas, E., Ravagnan, L., Larochette, N., Zamzami, N., & Kroemer, G. (2002). Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie*, 84(2-3), 215-222.
- Clark, R., & Kupper, T. (2005). Old meets new: the interaction between innate and adaptive immunity. *Journal of Investigative Dermatology*, 125(4), 629-637.
- Cools, N., Ponsaerts, P., Van Tendeloo, V. F. I., Berneman, Z. N., Larochette, N., Zamzami, N., & Kroemer, G. (2007). Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 82(6), 1365-1374.
- Coulie, P. G., Van den Eynde, B. J., van der Bruggen, P., Boon, T., Larochette, N., Zamzami, N., & Kroemer, G. (2014). Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 14(2), 135-146.

- Coussens, L. M., Tinkle, C. L., Hanahan, D., & Werb, Z. (2000). MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell*, 103(3), 481–490.
- Croci, D. O., Cogno, I. S., Vittar, N. B. R., Salvatierra, E., Trajtenberg, F., Podhajcer, O. L., et al. (2008). Silencing survivin gene expression promotes apoptosis of human breast cancer cells through a caspase-independent pathway. *Journal of Cellular Biochemistry*, 105(2), 381-390.
- Cryns, V., Yuan, J., Vittar, N. B. R., Salvatierra, E., Trajtenberg, F., Podhajcer, O. L., et al. (1998). Proteases to die for. *Journal of Cellular Biochemistry*, 12(11), 1551-1570.
- Curiel, T. J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., et al. (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature Medicine*, 10(9), 942-949.
- Cyster, J. G., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., et al. (1999). Chemokines and Cell Migration in Secondary Lymphoid Organs. *Science*, 286(5447), 2098-2102.
- Davis, M. E., Zuckerman, J. E., Choi, C. H. J., Seligson, D., Tolcher, A., Alabi, C. A., et al. (2010). Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature*, 464(7291), 1067-1070.
- Degli-Esposti, M. A., Smyth, M. J., Choi, C. H. J., Seligson, D., Tolcher, A., Alabi, C. A., et al. (2005). Close encounters of different kinds: Dendritic cells and NK cells take centre stage. *Nature Reviews Immunology*, 5(2), 112-124.
- Delaney, G., Jacob, S., Featherstone, C., Barton, M., Tolcher, A., Alabi, C. A., et al. (2005). The role of radiotherapy in cancer treatment: Dendritic cells and NK cells take centre stage. *Cancer*, 104(6), 1129-1137.
- Delvaeye, M., De Vriese, A., Zwerts, F., Betz, I., Moons, M., Autiero, M., et al. (2009). Role of the 2 zebrafish survivin genes in vasculo-angiogenesis, neurogenesis, cardiogenesis and hematopoiesis: Enemies Within. *BMC Developmental Biology*, 9(1), 25-37.
- Demierre, M. -F., Nathanson, L., Delves, P. J., Roitt, I. M., Moons, M., Autiero, M., et al. (2003). Chemoprevention of Melanoma: An Unexplored Strategy. *Journal of Clinical Oncology*, 21(1), 158-165.
- Diamond, M. S., Kinder, M., Matsushita, H., Mashayekhi, M., Dunn, G. P., Archambault, J. M., et al. (2011). Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors: An Unexplored Strategy. *The Journal of Experimental Medicine*, 208(10), 1989-2003.

Diestelkoetter, P., Ockert, D., Rammensee, H.G., Rieber, E.P., Schmitz, M., Schmachtenberg, F., Stevanovic, S., & Weigle, B. (2000). Generation of survivin-specific CD8⁺ T effector cells by dendritic cells pulsed with protein or selected peptides. *Cancer Research*, 60(17), 4845-9.

Dinarello, C. A., Duan, N., Zhang, C., & Zhang, W. (2000). Proinflammatory Cytokines: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Chest*, 118(2), 503-508.

Dohi, T., Beltrami, E., Wall, N. R., Plescia, J., Altieri, D. C., Archambault, J. M., et al. (2004). Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis: An Unexplored Strategy. *Journal of Clinical Investigation*, 114(8), 1117-1127.

Doucette, T., Latha, K., Yang, Y., Fuller, G. N., Rao, A., Rao, G., et al. (2014). Survivin transcript variant 2 drives angiogenesis and malignant progression in proneural gliomas: Enemies Within. *Neuro-Oncology*, 16(9), 1220-1228.

Dunkelberger, J. R., Song, W. -C., Yang, Y., Fuller, G. N., Rao, A., Rao, G., et al. (2010). Complement and its role in innate and adaptive immune responses: An Unexplored Strategy. *Cell Research*, 20(1), 34-50.

Eckelman, B. P., Salvesen, G. S., Scott, F. L., Fuller, G. N., Rao, A., Rao, G., et al. (2006). Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Reports*, 7(10), 988-994.

Emami, K. H., Nguyen, C., Ma, H., Kim, D. H., Jeong, K. W., Eguchi, M., et al. (2004). A small molecule inhibitor of β -catenin/CREB-binding protein transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(34), 12682-12687.

Erkel, G., Anke, T., Sterner, O., Stagno, F., Di Raimondo, F., Manzella, L., et al. (1996). Inhibition of NF- κ B Activation by Panepoxydone: A new target for anti-cancer therapy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 226(1), 214-221.

Feng, R., Zhou, S., Liu, Y., Song, D., Luan, Z., Dai, X., et al. (2013). Sox2 protects neural stem cells from apoptosis via up-regulating survivin expression. *Biochemical Journal*, 450(3), 459-468.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., et al. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), E359-E386.

Fernández, J. G., Rodríguez, D. A., Valenzuela, M., Calderon, C., Urzúa, U., Munroe, D., et al. (2014). Survivin expression promotes VEGF-induced tumor angiogenesis via PI3K/Akt enhanced β -catenin/Tcf-Lef dependent transcription. *Molecular Cancer*, 13(1), 209-218.

- Fraser, A. G., James, C., Evan, G. I., Hengartner, M. O., So, A., Munroe, D., et al. (1999). Caenorhabditis elegans inhibitor of apoptosis protein (IAP) homologue BIR-1 plays a conserved role in cytokinesis. *Current Biology*, 9(6), 292-302.
- Frasnelli, M. E., Tarussio, D., Chobaz-Péclat, V., Busso, N., & So, A. (2005). Regulation of the Immune Response by Antigen. *Science*, 7(2), R370-R379.
- Fridlender, Z. G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., et al. (2009). Polarization of Tumor-Associated Neutrophil Phenotype by TGF- β : “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell*, 16(3), 183-194.
- Fukuda, S. (2002). The antiapoptosis protein survivin is associated with cell cycle entry of normal cord blood CD34 cells and modulates cell cycle and proliferation of mouse hematopoietic progenitor cells. *Blood*, 100(7), 2463-2471.
- Fukuda, S. (2006). Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(5), 1087-1098.
- Fukuda, S., Abe, M., Onishi, C., Taketani, T., Purevsuren, J., Yamaguchi, S., et al. (2011). Survivin Selectively Modulates Genes Deregulated in Human Leukemia Stem Cells: “N1” versus “N2” TAN. *Journal of Oncology*, 2011(3), 1-14.
- Fukuda, S., Klar, A., & Navara, C. S. (2004). Survivin regulates hematopoietic progenitor cell proliferation through p21WAF1/Cip1-dependent and -independent pathways: note II. *Blood*, 103(1), 120-127.
- Gabrilovich, D., Abe, M., Onishi, C., Taketani, T., Purevsuren, J., Yamaguchi, S., et al. (2004). Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects: “N1” versus “N2” TAN. *Nature Reviews Immunology*, 4(12), 941-952.
- Galdiero, M. R., Garlanda, C., Jaillon, S., , G., & Mantovani, A. (2013). Tumor associated macrophages and neutrophils in tumor progression. *Journal of Cellular Physiology*, 228(7), 1404-1412.
- Garg, H., Suri, P., Gupta, J. C., Talwar, G. P., Dubey, S., Sváčková, D., et al. (2016). Survivin: a unique target for tumor therapy. *Cancer Cell International*, 16(1), 1-14.
- Gasparoto, T. H., de Souza Malaspina, T. S., Benevides, L., de Melo, E. J. F., Costa, M. R. S. N., Damante, J. H., et al. (2010). Patients with oral squamous cell carcinoma are characterized by increased frequency of suppressive regulatory T cells in the blood and tumor microenvironment: a unique target for tumor therapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 59(6), 819-828.

- Giaccone, G., Zatloukal, P., Roubec, J., Floor, K., Musil, J., Kuta, M., et al. (2009). Multicenter Phase II Trial of YM155, a Small-Molecule Suppressor of Survivin, in Patients With Advanced, Refractory, Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 27(27), 4481-4486.
- Gregory, A. D., McGarry Houghton, A., Roubec, J., Floor, K., Musil, J., Kuta, M., et al. (2011). Tumor-Associated Neutrophils: New Targets for Cancer Therapy. *Cancer Research*, 71(7), 2411-2416.
- Gross, A., Yin, X. -M., Wang, K., Wei, M. C., Jockel, J., Milliman, C., et al. (1999). Caspase Cleaved BID Targets Mitochondria and Is Required for Cytochrome c Release, while BCL-X L Prevents This Release but Not Tumor Necrosis Factor-R1/Fas Death: New Targets for Cancer Therapy. *Journal of Biological Chemistry*, 274(2), 1156-1163.
- Gu, X., Lin, H., Shao, J., Zhang, M., & Liang, H. (2005). Analysis of Survivin Expression in the Subtypes of Lymphoma. *The Chinese-German Journal of Clinical Oncology*, 4(4), 238-243.
- Guermónprez, P., Saveanu, L., Kleijmeer, M., Davoust, J., van Endert, P., & Amigorena, S. (2003). ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature*, 425(6956), 397-402.
- Guha, M., Altieri, D., Duffy, M. J., Alnemri, E. S., Litwack, G., Hall, D. J., et al. (2009). Survivin as a global target of intrinsic tumor suppression networks: A new target for anti-cancer therapy. *Cell Cycle*, 8(17), 2708-2710.
- Gurbuxani, S., Xu, Y., Keerthivasan, G., Wickrema, A., Crispino, J. D., Conway, E. M., et al. (2005). Differential requirements for survivin in hematopoietic cell development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(32), 11480-11485.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A., Kleijmeer, M., Davoust, J., van Endert, P., & Amigorena, S. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- Hansen, J. B., Fisker, N., Westergaard, M., Kjaerulff, L. S., Hansen, H. F., Thruø, C. A., et al. (2008). SPC3042: a proapoptotic survivin inhibitor. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(9), 2736-2745.
- Hicklin, D. J., Marincola, F. M., & Ferrone, S. (1999). HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story. *Molecular Medicine Today*, 5(4), 178-186.
- Hlavsa, J., Man, M., Kala, Z., et al. (2008). NÁDORY PANKREATU: MEZIOBOROVÉ PŘEHLEDY. *MEDICÍNA PRO PRAXI*, 5(10), 388-392.

- Hofmann, U. B., Voigt, H., Andersen, M. H., Straten, P. thor, Becker, J. C., Eggert, A. O., et al. (2009). Identification and characterization of survivin-derived H-2Kb-restricted CTL epitopes: T-cell immunotherapy revives an old story. *European Journal of Immunology*, 39(5), 646-674.
- Hollmig, S. T., Ariizumi, K., Cruz, P. D., Straten, P. thor, Becker, J. C., Eggert, A. O., et al. (2009). Recognition of non-self-polysaccharides by C-type lectin receptors dectin-1 and dectin-2: T-cell immunotherapy revives an old story. *Glycobiology*, 19(6), 568-575.
- Holtan, S. G., Creedon, D. J., Haluska, P., Markovic, S. N., Becker, J. C., Eggert, A. O., et al. (2009). Cancer and Pregnancy: Parallels in Growth, Invasion, and Immune Modulation and Implications for Cancer Therapeutic Agents. *Mayo Clinic Proceedings*, 84(11), 985-1000.
- Hong, J. -H., & Cho, S. -B. (2006). The classification of cancer based on DNA microarray data that uses diverse ensemble genetic programming. *Artificial Intelligence in Medicine*, 36(1), 43-58.
- Hořejší, V., & Bartůňková, J. (2009). *Základy imunologie* (4. vyd.). Praha: Triton.
- Hořejší, V. (2015). Antitumor Weapons of the Immune System. *Klinická Onkologie*, 28(4), 4S15-4S22.
- Hsiao, C. -J., Hsiao, G., Chen, W. -L., Wang, S. -W., Chiang, C. -P., Liu, L. -Y., et al. (2014). Cephalochromin Induces G0/G1 Cell Cycle Arrest and Apoptosis in A549 Human Non-Small-Cell Lung Cancer Cells by Inflicting Mitochondrial Disruption. *Journal of Natural Products*, 77(4), 758-765.
- Hwu, J. R., Tseng, W. N., Gnabre, J., Giza, P., Huang, R. C. C., Jiang, T., et al. (1998). Antiviral Activities of Methylated Nordihydroguaiaretic Acids. 1. Synthesis, Structure Identification, and Inhibition of Tat-Regulated HIV Transactivation: Rational Identification of a New Anticancer Lead. *Journal of Medicinal Chemistry*, 41(16), 2994-3000.
- Chabner, B. A., & Chabner Thompson, E. (2013). Overview of Cancer: Introduction to Overview of Cancer [Online]. *Merck Manual*, 1.
- Chain, B. M. (2003). Current issues in antigen presentation—focus on the dendritic cell. *Immunology Letters*, 89(2-3), 237-241.
- Chan, G., Chan, W., & Sze, D. (2009). The effects of β -glucan on human immune and cancer cells. *Immunology Letters*, 2(1), 25-36.

- Chang, C. -C., Heller, J. D., Kuo, J., & Huang, R. C. C. (2004). Tetra-O-methyl nordihydroguaiaretic acid induces growth arrest and cellular apoptosis by inhibiting Cdc2 and survivin expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(36), 13239-13244.
- Chang, H. Y., Yang, X., & Baltimore, D. (1999). Dissecting Fas signaling with an altered-specificity death-domain mutant: Requirement of FADD binding for apoptosis but not Jun N-terminal kinase activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*(4), 1252-1256.
- Chaplin, D. D. (2010). Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *125*(2), S3-S23.
- Chen, X., Duan, N., Zhang, C., & Zhang, W. (2016). Survivin and Tumorigenesis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Journal of Cancer*, *7*(3), 314-323.
- Cheung, C. H., Huang, C. C., Lee, J. Y., Cheng, S. M., Chang, Y. C., Huang, Y. C., et al. (2013). Survivin - biology and potential as a therapeutic target in oncology. *Oncotargets and Therapy*, *16*, 1453-1462.
- Cheung, C., Cheng, L., Chang, K.E., Chen, H., & Chang, J. (2011). Investigations of survivin: the past, present and future. *Frontiers in Bioscience*, *16*, 952-61.
- Cheung, C. H. A., Chen, H. -H., Kuo, C. -C., Chang, C. -Y., Coumar, M. S., Hsieh, H. -P., & Chang, J. -Y. (2009). Survivin counteracts the therapeutic effect of microtubule destabilizers by stabilizing tubulin polymers: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Molecular Cancer*, *8*(1), 43-58.
- Cheung, C., Cheng, S.M., Chang, Y., Chen, S., Chang, J., Huang, C., Huang, Y., Lee, J., & Tsai, F. (2013). Survivin – biology and potential as a therapeutic target in oncology. *OncoTargets and Therapy*.
- Chowdhury, S., Howell, G. M., Rajput, A., Teggart, C. A., Brattain, L. E., Weber, H. R., et al. (2011). Identification of a Novel TGFβ/PKA Signaling Transduceome in Mediating Control of Cell Survival and Metastasis in Colon Cancer. *Plos One*, *6*(5), 1-14.
- Chung, V., McDonough, S., Philip, P. A., Cardin, D., Wang-Gillam, A., Hui, L., et al. (2017). Effect of Selumetinib and MK-2206 vs Oxaliplatin and Fluorouracil in Patients With Metastatic Pancreatic Cancer After Prior Therapy. *JAMA Oncology*, *3*(4), 516-522.
- Iizuka, D., Ogura, A., Kuwabara, M., Inanami, O., Anderson, S., Gianella-Borradori, A., et al. (2008). Purvalanol A induces apoptosis and downregulation of antiapoptotic proteins through abrogation of phosphorylation of JAK2/STAT3 and RNA polymerase II: A new target for anti-cancer therapy. *Anti-Cancer Drugs*, *19*(6), 565-572.

- Ikeguchi, M., Liu, J., & Kaibara, N. (2002). Expression of survivin mRNA and protein in gastric cancer cell line (MKN-45) during cisplatin treatment. *Apoptosis*, 7(1), 23-29.
- Ikeguchi, M., Ueda, T., Sakatani, T., Hirooka, Y., & Kaibara, N. (2002). Expression of survivin messenger RNA correlates with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Diagnostic Molecular Pathology*, 11(1), 33-40.
- Italiani, P., Boraschi, D., & Kaibara, N. (2014). From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Frontiers in Immunology*, 5(1), 1-22.
- Jaffer, U., Wade, R. G., & Gourlay, T. (2010). Cytokines in the systemic inflammatory response syndrome: a review. *HSR Proceedings in Intensive Care and Cardiovascular Anesthesia*, 2(3), 161-175.
- Janeway, C. A., Medzhitov, R., & Kaibara, N. (2002). IMMUNE RECOGNITION: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Annual Review of Immunology*, 20(1), 197-216.
- Janotová, T., Jalovecká, M., Auerová, M., Švecová, I., Bruzlová, P., Maierová, V., et al. (2014). IMMUNE RECOGNITION: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Plos One*, 9(1), 197-216.
- Jemal, A., Murray, T., Samuels, A., Ghafoor, A., Ward, E., & Thun, M. J. (2003). Cancer statistics, 2003. *A Cancer Journal for Clinicians*, 53(1), 5-26.
- Jiang, Y., Murray, T., Samuels, A., Ghafoor, A., Ward, E., & Thun, M. J. (2005). Essential Role for Survivin in Early Brain Development. *Journal of Neuroscience*, 25(30), 6962-6970.
- Johnsen, A. K., Templeton, D. J., Sy, M. -S., & Harding, C. V. (1999). Deficiency of Transporter for Antigen Presentation (TAP) in Tumor Cells Allows Evasion of Immune Surveillance and Increases Tumorigenesis. *The Journal of Immunology*, 163(18), 4224-4231.
- Johnson, M. E., Howerth, E. W., Sy, M. -S., & Harding, C. V. (2004). Survivin: A Bifunctional Inhibitor of Apoptosis Protein. *Veterinary Pathology*, 41(6), 599-607.
- Kajiwara, Y., Yamasaki, F., Hama, S., Yahara, K., Yoshioka, H., Sugiyama, K., et al. (2003). Expression of survivin in astrocytic tumors. *Cancer*, 97(4), 1077-1083.
- Kang, J. J., Schaber, M. D., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Litwack, G., Hall, D. J., et al. (1999). Cascades of Mammalian Caspase Activation in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 274(5), 3189-3198.
- Karásek, P. (2017). Nádory gastrointestinálního traktu-karcinom slinivky břišní. *Masarykův onkologický ústav: Standard*, 207(NLPP 3.3), 1-7.

Kawasaki, H., Toyoda, M., Shinohara, H., Okuda, J., Watanabe, I., Yamamoto, T., et al. (2001). Expression of survivin correlates with apoptosis, proliferation, and angiogenesis during human colorectal tumorigenesis. *Cancer*, *91*(11), 2026-2032.

Kennedy, A. D., DeLeo, F. R., Shinohara, H., Okuda, J., Watanabe, I., Yamamoto, T., et al. (2009). Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. *Immunologic Research*, *43*(1-3), 25-61.

Khan, S., Aspe, J. R., Asumen, M. G., Almaguel, F., Odumosu, O., Acevedo-Martinez, S., et al. (2009). Extracellular, cell-permeable survivin inhibits apoptosis while promoting proliferative and metastatic potential. *British Journal of Cancer*, *100*(7), 1073-1086.

Khan, S., Ferguson Bennit, H., & Wall, N. R. (2015). The emerging role of exosomes in survivin secretion. *Cellular and Molecular Biology: Histology and Histopathology*, *15*(30), 43-50.

Khosravi-Far, R., & White, E. (2008). *Programmed cell death in cancer progression and therapy* [Online]. Berlin: Springer.

Kitagawa, M., & Lee, S. H. (2015). The chromosomal passenger complex (CPC) as a key orchestrator of orderly mitotic exit and cytokinesis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *3*(14), 1-14.

Kluck, R. M. (1997). The Release of Cytochrome c from Mitochondria: A Primary Site for Bcl-2 Regulation of Apoptosis. *Science*, *275*(5303), 1132-1136.

Kojima, H., Iida, M., Yaguchi, Y., Suzuki, R., Hayashi, N., Moriyama, H., & Manome, Y. (2006). Enhancement of Cisplatin Sensitivity in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck Transfected With a Survivin Antisense Gene: A Primary Site for Bcl-2 Regulation of Apoptosis. *Science*, *132*(6), 682-685.

Krejsek, J., & Kopecký, O. (2004). *Klinická imunologie*. Hradec Králové: Nucleus HK.

Kretschmer, K., Apostolou, I., Jaeckel, E., Khazaie, K., & von Boehmer, H. (2006). Making regulatory T cells with defined antigen specificity: role in autoimmunity and cancer. *Immunological Reviews*, *212*(1), 163-169.

Kulik, G., Carson, J. P., Vomastek, T., Overman, K., Gooch, B. D., Srinivasula, S., et al. (2001). Tumor Necrosis Factor α Induces BID Cleavage and Bypasses Antiapoptotic Signals in Prostate Cancer LNCaP Cells. *Cancer Research*, *61*(16), 2713-2719.

Kuwabara, T., Ishikawa, F., Kondo, M., & Kakiuchi, T. (2017). The Role of IL-17 and Related Cytokines in Inflammatory Autoimmune Diseases. *Mediators of Inflammation*, *17*, 1-11.

- Lakomý, R. (2017). Maligní melanom. *Masarykův onkologický ústav: Standard.(NLPP 9)*, 1-15.
- Le, Y., Murphy, P. M., & Wang, J. M. (2002). Formyl-peptide receptors revisited. *Trends in Immunology*, 23(11), 541-548.
- Lens, S. M. A., Vader, G., Medema, R. H., Khazaie, K., & von Boehmer, H. (2006). The case for Survivin as mitotic regulator: role in autoimmunity and cancer. *Current Opinion in Cell Biology*, 18(6), 616-622.
- Li, C., Yan, Y., Ji, W., Bao, L., Qian, H., Chen, L., et al. (2012). OCT4 Positively Regulates Survivin Expression to Promote Cancer Cell Proliferation and Leads to Poor Prognosis in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Plos One*, 7(11).
- Li, F., Ackermann, E. J., Bennett, C. F., Rothermel, A. L., Plescia, J., Tognin, S., et al. (1999). Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with survivin function. *Nature Cell Biology*, 1(8), 461-466.
- Li, F., Ambrosini, G., Chu, E. Y., Plescia, J., Tognin, S., Marchisio, P. C., & Altieri, D. C. (2000). Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin: What is the significance?. *Journal of Biological Chemistry*, 275(10), 6707-6711.
- Li, F., Flanary, P. L., Altieri, D. C., Dohlman, H. G., Plescia, J., Tognin, S., et al. (2000). Cell Division Regulation by BIR1, a Member of the Inhibitor of Apoptosis Family in Yeast: role in autoimmunity and cancer. *Journal of Biological Chemistry*, 275(10), 6707-6711.
- Li, F., Latha, K., Yang, Y., Fuller, G. N., Rao, A., Rao, G., et al. (2005). Role of survivin and its splice variants in tumorigenesis: Enemies Within. *British Journal of Cancer*, 92(2), 212-216.
- Li, F., Yang, J., Ramnath, N., Javle, M. M., Tan, D., Rao, G., et al. (2005). Nuclear or cytoplasmic expression of survivin: What is the significance?. *International Journal of Cancer*, 114(4), 509-512.
- Lin, A., & Dibling, B. (2002). The true face of JNK activation in apoptosis. *Aging Cell*, 1(2), 112-116.
- Lin, C. -Y., Hung, H. -C., Kuo, R. -C., Chiang, C. -P., & Kuo, M. Y. -P. (2005). Survivin expression predicts poorer prognosis in patients with areca quid chewing-related oral squamous cell carcinoma in Taiwan. *Oral Oncology*, 41(6), 645-654.
- Ling, X., Cao, S., Cheng, Q., Keefe, J. T., Rustum, Y. M., Li, F., et al. (2012). A Novel Small Molecule FL118 That Selectively Inhibits Survivin, Mcl-1, XIAP and cIAP2 in a p53-Independent Manner, Shows Superior Antitumor Activity. *Plos One*, 7(9), 1-18.

- Liu, D., Vader, G., Vromans, M. J. M., Lampson, M. A., & Lens, S. M. A. (2009). Sensing Chromosome Bi-Orientation by Spatial Separation of Aurora B Kinase from Kinetochore Substrates. *Science*, 323(5919), 1350-1353.
- Liu, R., Liu, D., & Xing, M. (2012). The Akt Inhibitor MK2206 Synergizes, but Perifosine Antagonizes, the BRAF V600E Inhibitor PLX4032 and the MEK1/2 Inhibitor AZD6244 in the Inhibition of Thyroid Cancer Cells, 97(2), E173-E182.
- Liu, T., Brouha, B., Grossman, D., Kim, D. H., Jeong, K. W., Eguchi, M., et al. (2004). Rapid induction of mitochondrial events and caspase-independent apoptosis in Survivin-targeted melanoma cells. *Oncogene*, 23(1), 39-48.
- Lowenfels, A. B., Brouha, B., Grossman, D., Lampson, M. A., Lens, S. M. A., Marchisio, P. C., & Altieri, D. C. (2000). Epidemiology and Prevention of Pancreatic Cancer: What is the significance?. *Journal of Biological Chemistry*, 275(10), 6707-6711.
- Lu, Y. -C., & Robbins, P. F. (2016). Cancer immunotherapy targeting neoantigens. *Seminars in Immunology*, 28(1), 22-27.
- Mackay, I. R., Rosen, F. S., Delves, P. J., Roitt, I. M., Moons, M., Autiero, M., et al. (2000). The Immune System (First of Two Parts): Dendritic cells and NK cells take centre stage. *New England Journal of Medicine*, 343(15), 1132-1132.
- Mackay, I. R., Rosen, F. S., von Andrian, U. H., Mackay, C. R., Kovářová, M., Sváčková, D., et al. (2000). T-Cell Function and Migration — Two Sides of the Same Coin: B16-F10 murine melanoma model. *New England Journal Of Medicine*, 343(14), 1020-1034.
- Maeda, H., & Akaike, T. (1998). Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer. *Biochemistry (Moscow)*, 63(7), 854-865.
- Maeurer, M. J., Gollin, S. M., Martin, D., Swaney, W., Bryant, J., Castelli, C., et al. (1996). Tumor escape from immune recognition: lethal recurrent melanoma in a patient associated with downregulation of the peptide transporter protein TAP-1 and loss of expression of the immunodominant MART-1/Melan-A antigen. *Journal of Clinical Investigation*, 98(7), 1633-1641.
- Mahotka, C., Liebmann, J., Wenzel, M., Suschek, C. V., Schmitt, M., Gabbert, H. E., & Gerharz, C. D. (2002). Differential subcellular localization of functionally divergent survivin splice variants, 9(12), 1334-1342.
- Mannino, M. H., Zhu, Z., Xiao, H., Bai, Q., Wakefield, M. R., Fang, Y., & Gerharz, C. D. (2015). The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. *Cancer Letters*, 367(2), 103-107.

- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., & Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature*, *454*(7203), 436-444.
- Mantovani, A., Cassatella, M. A., Costantini, C., & Jaillon, S. (2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity: balance, tolerance, and diversity. *Nature Reviews Immunology*, *11*(8), 519-531.
- Mantovani, A., & Sica, A. (2010). Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Current Opinion in Immunology*, *22*(2), 231-237.
- Marusawa, H., Cassatella, M. A., Costantini, C., Jaillon, S., Wakefield, M. R., Fang, Y., & Gerharz, C. D. (2003). HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression: balance, tolerance, and diversity. *The EMBO Journal*, *22*(11), 2729-2740.
- Maruyama, K., Selmani, Z., Ishii, H., & Yamaguchi, K. (2010). Innate immunity and cancer therapy. *International Immunopharmacology*, *11*(3), 350-357.
- Massagué, J. (2008). TGF β in Cancer. *Cell*, *134*(2), 215-230.
- Matsuda, K. (1994). ACAT inhibitors as antiatherosclerotic agents: Compounds and mechanisms. *Medicinal Research Reviews*, *14*(3), 271-305.
- McCourt, C., Dolan, O., & Gormley, G. (2014). Malignant melanoma: a pictorial review. *Ulster Medical Journal*, *83*(2), 103-110.
- McKenzie, J. A., & Grossman, D. (2012). Role of the Apoptotic and Mitotic Regulator Survivin in Melanoma. *Anticancer Research*, *32*(2), 397-404.
- McKenzie, J. A., Liu, T., Jung, J. Y., Jones, B. B., Ekiz, H. A., Welm, A. L., & Grossman, D. (2013). Survivin promotion of melanoma metastasis requires upregulation of α 5 integrin. *Carcinogenesis*, *34*(9), 2137-2144.
- Medzhitov, R., Cassatella, M. A., Costantini, C., Jaillon, S., Wakefield, M. R., Fang, Y., & Gerharz, C. D. (2008). Origin and physiological roles of inflammation: balance, tolerance, and diversity. *Nature*, *454*(7203), 428-435.
- Mehrotra, S., Languino, L. R., Raskett, C. M., Mercurio, A. M., Dohi, T., Altieri, D. C., & Gerharz, C. D. (2010). IAP Regulation of Metastasis: balance, tolerance, and diversity. *Cancer Cell*, *17*(1), 53-64.
- Meiliana, A., Dewi, N. M., & Wijaya, A. (2016). Cancer Immunotherapy: A Review. *The Indonesian Biomedical Journal*, *8*(1), 1-21.

Meli, M., Pennati, M., Curto, M., Daidone, M. G., Plescia, J., Toba, S., et al. (2006). Small-Molecule Targeting of Heat Shock Protein 90 Chaperone Function: Rational Identification of a New Anticancer Lead. *Journal of Medicinal Chemistry*, 103(26), 120-127.

Melichar, B., Burger, M., Lakomý, R., et al. (2015). *Mapování epidemiologické situace zhoubného melanomu a obraz léčebné péče v ČR s důrazem na léčbu pokročilého melanomu v letech 2007–2014*. 1-17.

Mesri, M., Morales-Ruiz, M., Ackermann, E. J., Bennett, C. F., Pober, J. S., Sessa, W. C., et al. (2001). Suppression of Vascular Endothelial Growth Factor-Mediated Endothelial Cell Protection by Survivin Targeting. *The American Journal of Pathology*, 158(5), 1757-1765.

Minai-Fleminger, Y., & Levi-Schaffer, F. (2009). Mast cells and eosinophils: the two key effector cells in allergic inflammation. *Inflammation Research*, 58(10), 631-638.

Miyachi, K., Sasaki, K., Onodera, S., Taguchi, T., Nagamachi, M., Kaneko, H., & Sunagawa, M. (2003). Correlation between survivin mRNA expression and lymph node metastasis in gastric cancer. *Gastric Cancer*, 6(4), 217-224.

Mobahat, M., Narendran, A., Riabowol, K., Taguchi, T., Nagamachi, M., Kaneko, H., & Sunagawa, M. (2014). Survivin as a Preferential Target for Cancer Therapy: the two key effector cells in allergic inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(2), 2494-2516.

Molina, H., Holers, V. M., Li, B., Fung, Y., Mariathasan, S., Goellner, J., et al. (1996). Markedly impaired humoral immune response in mice deficient in complement receptors 1 and 2: the two key effector cells in allergic inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, 93(8), 3357-3361.

Moretta, L., Ferlazzo, G., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Mingari, M. C., et al. (2006). Effector and regulatory events during natural killer-dendritic cell interactions: the two key effector cells in allergic inflammation. *Immunological Reviews*, 214(1), 219-228.

Moriai, R., Tsuji, N., Moriai, M., Kobayashi, D., & Watanabe, N. (2009). Survivin plays as a resistant factor against tamoxifen-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 117(2), 261-271.

Mull, A. N., Klar, A., & Navara, C. S. (2014). Differential localization and high expression of SURVIVIN splice variants in human embryonic stem cells but not in differentiated cells implicate a role for SURVIVIN in pluripotency: note II. *Stem Cell Research*, 12(2), 539-549.

Murdoch, C., Muthana, M., Coffelt, S. B., & Lewis, C. E. (2008). The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis: balance, tolerance, and diversity. *Nature Reviews Cancer*, 8(8), 618-631.

- Muzio, L. L., Pannone, G., Staibano, S., Mignogna, M. D., Rubini, C., Marigliò, M. A., et al. (2003). Survivin expression in oral squamous cell carcinoma. *British Journal of Cancer*, 89(12), 2244-2248.
- Na, Y. -S., Yang, S. -J., Kim, S. -M., Jung, K. -A., Moon, J. -H., Shin, J. -S., et al. (2012). YM155 Induces EGFR Suppression in Pancreatic Cancer Cells. *Plos One*, 7(6).
- Nakahara, T., Takeuchi, M., Kinoyama, I., Minematsu, T., Shirasuna, K., Matsuhisa, A., et al. (2007). YM155, a Novel Small-Molecule Survivin Suppressant, Induces Regression of Established Human Hormone-Refractory Prostate Tumor Xenografts. *Cancer Research*, 67(17), 8014-8021.
- Nakaya, T., Ogawa, S., Manabe, I., Tanaka, M., Sanada, M., Sato, T., et al. (2014). KLF5 Regulates the Integrity and Oncogenicity of Intestinal Stem Cells. *Cancer Research*, 74(10), 2882-2891.
- Nathan, C. (2003). Specificity of a third kind: reactive oxygen and nitrogen intermediates in cell signaling. *Journal of Clinical Investigation*, 111(6), 769-778.
- Nathan, C. (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Journal of Clinical Investigation*, 6(3), 173-182.
- Nathan, C., Takeuchi, M., Kinoyama, I., Minematsu, T., Shirasuna, K., Matsuhisa, A., et al. (2002). Points of control in inflammation. *Nature*, 420(6917), 846-852.
- Necochea-Campion, R. de, Chen, C. -S., Mirshahidi, S., Howard, F. D., & Wall, N. R. (2013). Clinico-pathologic relevance of Survivin splice variant expression in cancer. *Cancer Letters*, 339(2), 167-174.
- Nomura, T., Yamasaki, M., Nomura, Y., & Mimata, H. (2005). Expression of the inhibitors of apoptosis proteins in cisplatin-resistant prostate cancer cells. *Oncology Reports*, 14(4), 993-997.
- O'Connor, D. S., Grossman, D., Plescia, J., Li, F., Zhang, H., Villa, A., et al. (2000). Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(24), 13103-13107.
- Ohtake, J., Ohkuri, T., Togashi, Y., Kitamura, H., Okuno, K., & Nishimura, T. (2014). Identification of novel helper epitope peptides of Survivin cancer-associated antigen applicable to developing helper/killer-hybrid epitope long peptide cancer vaccine. *Immunology Letters*, 161(1), 20-30.

- Okuya, M., Kurosawa, H., Kikuchi, J., Furukawa, Y., Matsui, H., Aki, D., et al. (2010). Up-regulation of Survivin by the E2A-HLF Chimera Is Indispensable for the Survival of t(17;19)-positive Leukemia Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 285(3), 1850-1860.
- Oliveira, L. R., Oliveira-Costa, J. P., Araujo, I. M., Soave, D. F., Zanetti, J. S., Soares, F. A., et al. (2011). Cancer stem cell immunophenotypes in oral squamous cell carcinoma, 40(2), 135-142.
- Papayannopoulos, V., & Zychlinsky, A. (2009). NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends in Immunology*, 30(11), 513-521.
- Parker, K. H., Beury, D. W., & Ostrand-Rosenberg, S. (2015). Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Immunotherapy of Cancer*, 95-139.
- Parkin, J., Cohen, B., Ostrand-Rosenberg, S., Li, F., Zhang, H., Villa, A., et al. (2001). An overview of the immune system. *The Lancet*, 357(9270), 1777-1789.
- Pavlík, T., Májek, O., Büchler, T., Vyzula, R., Petera, J., Ryska, M., et al. (2014). Trends in stage-specific population-based survival of cancer patients in the Czech Republic in the period 2000–2008. *Cancer Epidemiology*, 38(1), 28-34.
- Pennati, M., Folini, M., Zaffaroni, N., Ravagnan, L., Larochette, N., Zamzami, N., & Kroemer, G. (2007). Targeting survivin in cancer therapy: fulfilled promises and open questions. *Carcinogenesis*, 28(6), 1133-1139.
- Pennati, M., Bentley, J., Arris, C. E., Boyle, F. T., Curtin, N. J., Endicott, J. A., et al. (2005). Potentiation of paclitaxel-induced apoptosis by the novel cyclin-dependent kinase inhibitor NU6140: a possible role for survivin down-regulation. *Nature Structural Biology*, 9(10), 745-749.
- Pennati, M., Folini, M., & Zaffaroni, N. (2008). Targeting survivin in cancer therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 12(4), 463-476.
- Pennati, M., Folini, M., & Zaffaroni, N. (2007). Targeting survivin in cancer therapy: fulfilled promises and open questions. *Carcinogenesis*, 28(6), 1133-1139.
- Perez-Gracia, J. L., Labiano, S., Rodriguez-Ruiz, M. E., Sanmamed, M. F., Melero, I., Ryska, M., et al. (2014). Orchestrating immune check-point blockade for cancer immunotherapy in combinations. *Cancer Epidemiology*, 38(1), 28-34.
- Plescia, J., Salz, W., Xia, F., Pennati, M., Zaffaroni, N., Daidone, M. G., et al. (2005). Rational design of shepherdin, a novel anticancer agent: A new target for anti-cancer therapy. *Cancer Cell*, 7(5), 457-468.

- PrabhuDas, M., Bowdish, D., Drickamer, K., Febbraio, M., Herz, J., Kobzik, L., et al. (2014). Standardizing Scavenger Receptor Nomenclature. *Cancer Epidemiology*, 38(1), 28-34.
- Qu, H., Ricklin, D., Lambris, J. D., & Jaillon, S. (2009). Recent developments in low molecular weight complement inhibitors: balance, tolerance, and diversity. *Molecular Immunology*, 47(2-3), 185-195.
- Rédei, G. P. (2008). U. *Encyclopedia Of Genetics, Genomics, Proteomics And Informatics*, 2057-2072.
- Reis e Sousa, C., Folini, M., & Zaffaroni, N. (2006). Dendritic cells in a mature age: fulfilled promises and open questions. *Nature Reviews Immunology*, 6(6), 476-483.
- Reker, S., Meier, A., Holten-Andersen, L., Svane, I. M., Becker, J. C., Thor Straten, P., & Andersen, M. H. (2004). Identification of novel survivin-derived CTL epitopes. *Cancer Biology and Therapy*, 3(2), 173-9.
- Rescigno, M., Martino, M., Sutherland, C. L., Gold, M. R., & Ricciardi-Castagnoli, P. (1998). Dendritic Cell Survival and Maturation Are Regulated by Different Signaling Pathways. *Journal of Experimental Medicine*, 188(11), 2175-2180.
- Restifo, N. P., Esquivel, F., Kawakami, Y., Yewdell, J. W., Mulé, J. J., Rosenberg, S. A., & Bennink, J. R. (1993). Identification of human cancers deficient in antigen processing. *Journal of Experimental Medicine*, 177(2), 265-272.
- Rosenberg, S. A., Restifo, N. P., Soza, A., Kloetzel, P. M., & Ehrlich, R. (2015). Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science*, 348(6230), 62-68.
- Rotem-Yehudar, R. (1996). LMP-associated proteolytic activities and TAP-dependent peptide transport for class 1 MHC molecules are suppressed in cell lines transformed by the highly oncogenic adenovirus 12. *Journal of Experimental Medicine*, 183(2), 499-514.
- Ruchaud, S., Carmena, M., Earnshaw, W. C., Fishel, R., Alnemri, E. S., Hwang, J. -I., et al. (2007). The Chromosomal Passenger Complex: One for All and All for One. *Cell*, 131(2), 230-231.
- Ruchaud, S., Carmena, M., Earnshaw, W. C., Fishel, R., Alnemri, E. S., Hwang, J. -I., et al. (2007). Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(10), 798-812.
- Ryan, B. M., O'Donovan, N., & Duffy, M. J. (2009). Survivin: A new target for anti-cancer therapy. *Cancer Treatment Reviews*, 35(7), 553-562.

Sahasrabuddhe, A. A., Nayak, R. C., Gupta, C. M., Fishel, R., Alnemri, E. S., Hwang, J. -I., et al. (2009). Ancient Leishmania coronin (CRN12) is involved in microtubule remodeling during cytokinesis: Intracellular Signaling by Proteolysis. *Journal of Cell Science*, 122(10), 1691-1699.

Saleh, A., Srinivasula, S. M., Acharya, S., Fishel, R., & Alnemri, E. S., (1999). Cytochrome c and dATP-mediated Oligomerization of Apaf-1 Is a Prerequisite for Procaspase-9 Activation: Intracellular Signaling by Proteolysis. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(25), 17941-17945.

Salvesen, G. S., Dixit, V. M., Ferrone, S., Shirwan, H., Unutmaz, D., Hwang, J. -I., et al. (1997). Caspases: Intracellular Signaling by Proteolysis. *Cell*, 91(4), 443-446.

Sampath, J., Pelus, L., Ferrone, S., Shirwan, H., Unutmaz, D., Hwang, J. -I., et al. (2007). Alternative Splice Variants of Survivin as Potential Targets in Cancer: Translating Basic Knowledge into Clinical Practice. *Current Drug Discovery Technologies*, 4(3), 174-191.

Sarela, A. I., Verbeke, C. S., Ramsdale, J., Davies, C. L., Markham, A. F., & Guillou, P. J. (2002). Expression of survivin, a novel inhibitor of apoptosis and cell cycle regulatory protein, in pancreatic adenocarcinoma. *British Journal of Cancer*, 86(6), 886-892.

Sarma, J. V., Ward, P. A., Lambris, J. D., & Jaillon, S. (2011). The complement system: balance, tolerance, and diversity. *Cell and Tissue Research*, 343(1), 227-235.

Seliger, B., Maeurer, M. J., Ferrone, S., Shirwan, H., Unutmaz, D., Hwang, J. -I., et al. (1997). TAP off — tumors on: Translating Basic Knowledge into Clinical Practice. *Immunology Today*, 18(6), 292-299.

Sharma, R. K., Yolcu, E. S., Srivastava, A. K., Shirwan, H., Unutmaz, D., Hwang, J. -I., et al. (2013). CD4 T Cells Play a Critical Role in the Generation of Primary and Memory Antitumor Immune Responses Elicited by SA-4-1BBL and TAA-Based Vaccines in Mouse Tumor Models: Translating Basic Knowledge into Clinical Practice. *Plos One*, 8(9), 73145-73153.

Shin, S., Sung, B. -J., Cho, Y. -S., Kim, H. -J., Ha, N. -C., Hwang, J. -I., et al. (2001). An Anti-apoptotic Protein Human Survivin Is a Direct Inhibitor of Caspase-3 and -7 †: Translating Basic Knowledge into Clinical Practice. *Biochemistry*, 40(4), 1117-1123.

Schimmer, A. D., Diestelkoetter, P., Weigle, B., Schmachtenberg, F., Stevanovic, S., Ockert, D., et al. (2004). Inhibitor of Apoptosis Proteins: Translating Basic Knowledge into Clinical Practice. *Cancer Research*, 64(20), 7183-7190.

Schroeder, J. T., Kiemeney, L. A., Witjes, J. A., Schalken, J. A., Willems, J. L., Swinkels, D. W., & de Kok, J. B. (2009). Chapter 4 Basophils. *Radboud Repository*, 23(4), 123-161.

- Schultz, I. J., Kiemeny, L. A., Witjes, J. A., Schalken, J. A., Willems, J. L., Swinkels, D. W., & de Kok, J. B. (2003). Survivin mRNA expression is elevated in malignant urothelial cell carcinomas and predicts time to recurrence. *Anticancer Research*, 23(4), 3327-3331.
- Sica, A., Larghi, P., Mancino, A., Rubino, L., Porta, C., Totaro, M. G., et al. (2008). Macrophage polarization in tumour progression: Phenotype, Function and the Role of Lymphokines in Regulating their Development. *Seminars in Cancer Biology*, 18(5), 349-355.
- Smith, S. D., Sullivan, L. C., Brooks, A. G., Andrews, D. M., Petrosky, N., Yang, X., et al. (2001). Urine Detection of Survivin and Diagnosis of Bladder Cancer: Phenotype, Function and the Role of Lymphokines in Regulating their Development. *Jama*, 285(3), 324-328.
- Smyth, M. J., Sullivan, L. C., Brooks, A. G., & Andrews, D. M. (2013). Non-classical MHC Class I molecules regulating natural killer cell function. *Oncoimmunology*, 2(3), e23336.
- Soehnlein, O., Lindbom, L., Silva, D., Correcha, M., Petrosky, N., Yang, X., et al. (2010). Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation: Phenotype, Function and the Role of Lymphokines in Regulating their Development. *Nature Reviews Immunology*, 10(6), 427-439.
- Socha, L. A., Gowardman, J., Silva, D., Correcha, M., Petrosky, N., Yang, X., et al. (2006). Elevation in interleukin 13 levels in patients diagnosed with systemic inflammatory response syndrome: Phenotype, Function and the Role of Lymphokines in Regulating their Development. *Intensive Care Medicine*, 32(2), 244-250.
- Song, J., So, T., Cheng, M., Tang, X., Croft, M., Rosenberg, S. A., & Bennink, J. R. (2005). Sustained Survivin Expression from OX40 Costimulatory Signals Drives T Cell Clonal Expansion. *Immunity*, 22(5), 621-631.
- Spriggs, D. R., Sherman, M. L., Frei, E., Kufe, D. W., Wolf, B. B., Yang, X., et al. (1987). Clinical Studies with Tumour Necrosis Factor: Phenotype, Function and the Role of Lymphokines in Regulating their Development. *Ciba Foundation Symposium 131 - Tumour Necrosis Factor And Related Cytotoxins*, 273(42), 206-227.
- Stauber, R. H., Mann, W., & Knauer, S. K. (2007). Nuclear and Cytoplasmic Survivin: Molecular Mechanism, Prognostic, and Therapeutic Potential. *Cancer Research*, 67(13), 5999-6002.
- Stella, S., Tirro, E., Conte, E., Stagno, F., Di Raimondo, F., Manzella, L., et al. (2013). Suppression of Survivin Induced by a BCR-ABL/JAK2/STAT3 Pathway Sensitizes Imatinib-Resistant CML Cells to Different Cytotoxic Drugs: A new target for anti-cancer therapy. *Molecular Cancer Therapeutics*, 12(6), 1085-1098.

Stennicke, H. R., Jürgensmeier, J. M., Shin, H., Deveraux, Q., Wolf, B. B., Yang, X., et al. (1998). Pro-caspase-3 Is a Major Physiologic Target of Caspase-8: Phenotype, Function and the Role of Lymphokines in Regulating their Development. *Journal of Biological Chemistry*, 273(42), 27084-27090.

Suga, K., Yamamoto, T., Yamada, Y., Miyatake, S. -I., Nakagawa, T., Tanigawa, N., et al. (2005). Correlation between transcriptional expression of survivin isoforms and clinicopathological findings in human colorectal carcinomas: Phenotype, Function and the Role of Lymphokines in Regulating their Development. *Oncology Reports*, 28(4), 831-897.

Swain, S. L., Bradley, L. M., Croft, M., Tonkonogy, S., Atkins, G., Weinberg, A. D., et al. (1991). Helper T-Cell Subsets: Phenotype, Function and the Role of Lymphokines in Regulating their Development. *Immunological Reviews*, 123(1), 115-144.

Šťastný, M., Falconi, M., Bassi, C., Sartori, N., Salvia, R., Caldiron, E., et al. (2015). Escape Strategies of Tumors from Immune Surveillance. *Klinická Onkologie*, 28(Suppl 4), 4S28-4S37.

Takeda, K., & Akira, S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*, 17(1), 1-14.

Talamini, G., Falconi, M., Bassi, C., Sartori, N., Salvia, R., Caldiron, E., et al. (1999). Incidence of cancer in the course of chronic pancreatitis. *The American Journal of Gastroenterology*, 94(5), 1253-1260.

Tamm, I., Wang, Y., Sausville, E., Scudiero, D. A., Vigna, N., Oltersdorf, T., & Reed, J. C. (1998). IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Research*, 58(23), 5315-5320.

Tanaka, M., Butler, M. O., Ansén, S., Imataki, O., Berezovskaya, A., Nadler, L. M., & Hirano, N. (2011). Induction of HLA-DP4–Restricted Anti-Survivin Th1 and Th2 Responses Using an Artificial Antigen-Presenting Cell. *Clinical Cancer Research*, 17(16), 5392-5401.

Tang, D., Lahti, J. M., Kidd, V. J., Federwisch, M., McDonald, N. Q., Driscoll, P. C., et al. (2000). Caspase-8 Activation and Bid Cleavage Contribute to MCF7 Cellular Execution in a Caspase-3-dependent Manner during Staurosporine-mediated Apoptosis: Enemies Within. *Science*, 281(5381), 1312-1316.

Tecchio, C., Scapini, P., Pizzolo, G., & Cassatella, M. A. (2013). On the cytokines produced by human neutrophils in tumors: a new strategy for using old weapons. *Seminars in Cancer Biology*, 23(3), 159-170.

Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell*, 139(5), 871-890.

Thornberry, N. A., Wong, L., Pakusch, M., Fowler, K. J., Burrows, F. J., Vaux, D. L., et al. (1998). Caspases: Enemies Within. *Science*, 281(5381), 1312-1316.

Tran, J., Master, Z., Yu, J. L., Rak, J., Dumont, D. J., & Kerbel, R. S. (2002). A role for survivin in chemoresistance of endothelial cells mediated by VEGF. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(7), 4349-4354.

Treffers, L. W., Hiemstra, I. H., Kuijpers, T. W., van den Berg, T. K., & Matlung, H. L. (2016). Neutrophils in cancer. *Immunological Reviews*, 273(1), 312-328.

Turvey, S. E., & Broide, D. H. (2010). Innate immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2).

Underhill, D. M., & Gantner, B., (2004). Integration of Toll-like receptor and phagocytic signaling for tailored immunity. *Microbes and Infection*, 6(15), 1368-1373.

Uren, A. G., Wong, L., Pakusch, M., Fowler, K. J., Burrows, F. J., Vaux, D. L., et al. (2000). Survivin and the inner centromere protein INCENP show similar cell-cycle localization and gene knockout phenotype: a unique target for tumor therapy. *Current Biology*, 10(21), 1319-1328.

Uribe-Querol, E., Rosales, C., Balart, J., Villanueva, A., Vinals, F., Capella, G., et al. (2015). Neutrophils in Cancer: Two Sides of the Same Coin. *Journal of Immunology Research*, 2015(1), 1-21.

Urruticoechea, A., Alemany, R., Balart, J., Villanueva, A., Vinals, F., Capella, G., et al. (2010). Recent Advances in Cancer Therapy: An Overview. *Current Pharmaceutical Design*, 16(1), 3-10.

Vader, G., Medema, R. H., Lens, S. M. A., Rothermel, A. L., Plescia, J., Tognin, S., et al. (2006). The chromosomal passenger complex: guiding Aurora-B through mitosis. *The Journal of Cell Biology*, 173(6), 833-837.

Vetvicka, V., Ryan, E. P., Pawelec, G., Talib, W. H., Stagg, J., Elkord, E., et al. (2011). Glucan-immunostimulant, adjuvant, potential drug: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *World Journal of Clinical Oncology*, 2(2), 115-119.

Vigneron, N., Ryan, E. P., Pawelec, G., Talib, W. H., Stagg, J., Elkord, E., et al. (2015). Human Tumor Antigens and Cancer Immunotherapy: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Biomed Research International*, 2015(14), 1-17.

Vinay, D. S., Ryan, E. P., Pawelec, G., Talib, W. H., Stagg, J., Elkord, E., et al. (2015). Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Seminars in Cancer Biology*, 35(4), S185-S198.

- Virrey, J. J., Guan, S., Li, W., Schönthal, A. H., Chen, T. C., & Hofman, F. M. (2008). Increased Survivin Expression Confers Chemoresistance to Tumor-Associated Endothelial Cells. *The American Journal of Pathology*, *173*(2), 575-585.
- Wagner, E., Frank, M. M., Reid, D. M., Taylor, P. R., Williams, D. L., Wong, S. Y. C., et al. (2010). Therapeutic potential of complement modulation: Releasing the brakes. *Nature Reviews Drug Discovery*, *9*(1), 43-56.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K., Scheurich, P., Sváčková, P., Kovářová, M., Sváčková, D., et al. (2003). Tumor necrosis factor signaling: B16-F10 murine melanoma model. *Molecular Carcinogenesis*, *51*(7), 586-595.
- Waldmannová, E., Caisová, V., Fáberová, J., Sváčková, P., Kovářová, M., Sváčková, D., et al. (2016). The use of Zymosan A and bacteria anchored to tumor cells for effective cancer immunotherapy: B16-F10 murine melanoma model. *International Immunopharmacology*, *39*(2), 295-306.
- Wall, N., Aspe, H., Zhang, J., Zhang, W., Zhang, R., Cheng, X., et al. (2012). Survivin-T34A: molecular mechanism and therapeutic potential. *Molecular Carcinogenesis*, *51*(7), 586-595.
- Wang, H. -qin, Jin, J. -jun, Wang, J., Wang, S. -W., Chiang, C. -P., Liu, L. -Y., et al. (2014). Arctigenin Enhances Chemosensitivity to Cisplatin in Human Nonsmall Lung Cancer H460 Cells through Downregulation of Survivin Expression. *Journal of Natural Products*, *77*(4), 758-765.
- Wang, J., Li, W., Duffy, M. J., Alnemri, E. S., Litwack, G., Hall, D. J., et al. (2014). Discovery of Novel Second Mitochondria-Derived Activator of Caspase Mimetics as Selective Inhibitor of Apoptosis Protein Inhibitors: A new target for anti-cancer therapy. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *349*(2), 319-329.
- Wang, P., Zhen, H., Zhang, J., Zhang, W., Zhang, R., Cheng, X., et al. (2012). Survivin promotes glioma angiogenesis through vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in vitro and in vivo: Releasing the brakes. *Molecular Carcinogenesis*, *51*(7), 586-595.
- Wang, S., Han, X., Wang, J., Yao, J., Shi, Y., Xie, J., et al. (2014). Antitumor Effects of a Novel Chromosome Region Maintenance 1 (CRM1) Inhibitor on Non-Small Cell Lung Cancer Cells In Vitro and in Mouse Tumor Xenografts. *Plos One*, *9*(3), 1-9.
- Wang, X., Cohen, I., Daugas, E., Ravagnan, L., Larochette, N., Zamzami, N., & Kroemer, G. (2002). Mechanisms of AIF-Mediated Apoptotic DNA Degradation in *Caenorhabditis elegans*: a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Science*, *298*(5598), 1587-1592.

- Waugh, D. J. J., & Wilson, C. (2008). The Interleukin-8 Pathway in Cancer. *Clinical Cancer Research*, 14(21), 6735-6741.
- Weintraub, K. (2013). Drug development: Releasing the brakes. *Nature*, 504(7480), S6-S8.
- Wheatley, S. P., Lin, H. -H., Reid, D. M., Taylor, P. R., Williams, D. L., Wong, S. Y. C., et al. (2015). The Functional Repertoire of Survivin's Tails: Molecules, Functions and Pathophysiological Aspects. *Cell Cycle*, 14(2), 261-268.
- Willment, J. A., Lin, H. -H., Reid, D. M., Taylor, P. R., Williams, D. L., Wong, S. Y. C., et al. (2003). Dectin-1 Expression and Function Are Enhanced on Alternatively Activated and GM-CSF-Treated Macrophages and Are Negatively Regulated by IL-10, Dexamethasone, and Lipopolysaccharide: Molecules, Functions and Pathophysiological Aspects. *The Journal of Immunology*, 171(9), 4569-4573.
- Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Descamps-Latscha, B., Lesavre, P., Halbwachs-Mecarelli, L., Zhang, B., et al. (2000). Neutrophils: Molecules, Functions and Pathophysiological Aspects. *Laboratory Investigation*, 80(5), 617-653.
- Xiao, M., & Li, W. (2015). Recent Advances on Small-Molecule Survivin Inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*, 22(9), 1136-1146.
- Xing, Z., Conway, E. M., Kang, C., Winoto, A., Schmid, I., Schöni, M. H., et al. (2004). Essential Role of Survivin, an Inhibitor of Apoptosis Protein, in T Cell Development, Maturation, and Homeostasis. *The Journal of Experimental Medicine*, 199(1), 69-80.
- Xu, J. -H., Wang, A. -xun, Huang, H. -Z., Wang, J. -G., Pan, C. -B., Zhang, B., & Kroemer, G. (2010). Survivin shRNA Induces Caspase-3-Dependent Apoptosis and Enhances Cisplatin Sensitivity in Squamous Cell Carcinoma of the Tongue: fulfilled promises and open questions. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, 18(8), 377-385.
- Yokokawa, J., Cereda, V., Remondo, C., Gulley, J. L., Arlen, P. M., Schlom, J., et al. (2008). Enhanced Functionality of CD4⁺ CD25^{high} FoxP3⁺ Regulatory T Cells in the Peripheral Blood of Patients with Prostate Cancer: the origin, evolution, and impact of doi moi. *Clinical Cancer Research*, 14(4), 1032-1040.
- Zaffaroni, N., Pennati, M., Colella, G., Perego, P., Supino, R., Gatti, L., et al. (2002). Expression of the anti-apoptotic gene survivin correlates with taxol resistance in human ovarian cancer: the origin, evolution, and impact of doi moi. *Cellular and Molecular Life Sciences (Cmls)*, 59(8), 1406-1412.

Zapata, J. M., Takahashi, R., Salvesen, G. S., Reed, J. C., Delaney, M. A., Zietman, A. L., et al. (1998). Granzyme Release and Caspase Activation in Activated Human T-Lymphocytes: the origin, evolution, and impact of doi moi. *Journal of Biological Chemistry*, 273(12), 6916-6920.

Zhang, J. -M., & An, J. (2007). Cytokines, Inflammation, and Pain: the origin, evolution, and impact of doi moi. *International Anesthesiology Clinics*, 45(2), 27-37.

Zhang, M., Mukherjee, N., Bermudez, R. S., Latham, D. E., Delaney, M. A., Zietman, A. L., et al. (2005). Adenovirus-mediated inhibition of survivin expression sensitizes human prostate cancer cells to paclitaxel in vitro and in vivo: the origin, evolution, and impact of doi moi. *The Prostate*, 64(3), 293-302.

Zhao, J., Ling, X., Cao, S., Liu, X., Wan, S., Jiang, T., & Li, F. (2014). Antitumor Activity of FL118, a Survivin, Mcl-1, XIAP, and cIAP2 Selective Inhibitor, Is Highly Dependent on Its Primary Structure and Steric Configuration. *Molecular Pharmaceutics*, 11(2), 457-467.

Zinkernagel, R. M., Selmani, Z., Ishii, H., & Yamaguchi, K. (2011). Regulation of the Immune Response by Antigen. *Science*, 293(5528), 251-253.

Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A., & Wang, X. (1997). Apaf-1, a Human Protein Homologous to *C. elegans* CED-4, Participates in Cytochrome c-Dependent Activation of Caspase-3. *Cell*, 90(3), 405-413.

Žaloudík, J. (2010). Chirurgické aspekty léčby sarkomů měkkých tkání. *Onkologie*, 4(5), 297-301.