

Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Imunologie



Mgr. Karolína Lhotáková

Příprava a charakterizace myších nádorových linií s ireverzibilně sníženou expresí molekul

MHCI

Establishment and characterization of mouse tumor cell line with irreversible downregulation  
of MHC class I molecules

Rigorózní práce

Vedoucí práce: RNDr. Ingrid Poláková, Ph.D.

Praha, 2020



## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala vedoucí mé rigorózní práce RNDr. Ingrid Polákové, Ph.D. a vedoucímu laboratoře RNDr. Michalu Šmahelovi, Ph.D. za spolupráci a cenné rady a připomínky, které umožnily vznik této práce.

## **Prohlášení**

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

V Brně, 28. 9. 2020

Podpis: .....

Karolína Lhotáková

## Abstrakt

Maligní onemocnění jsou celosvětově jednou z hlavních příčin úmrtí. Za vysokou agresivitu nemoci může schopnost nádorů uniknout imunitní odpovědi. Jedním z důležitých mechanismů, které k tomu nádory využívají, je snížení povrchové exprese glykoproteinů MHCI.

V této práci je popsána příprava nádorové linie TC-1/dB2m s ireverzibilně sníženou expresí B2m odvozené od myší nádorové linie TC-1. Průtokovou cytometrií byla prokázána inaktivace B2m, nicméně po stimulaci  $\text{IFN}\gamma$  se na povrch dostávaly ve snížené míře těžké řetězce MHCI, především tedy molekuly H2-D<sup>b</sup>. *In vitro* došlo ke snížení proliferace nádorových buněk, *in vivo* pak ke snížení rychlosti vzniku nádorů, za což byly zodpovědné zejména NK buňky, které hrály úlohu hlavních efektorových buněk v imunitě vedené proti nádorům ustanoveným buňkami TC-1/dB2m. Po deaktivaci B2m nedošlo k ovlivnění metastatické aktivity těchto buněk. Tyto buňky nejsou citlivé k samostatné DNA imunizaci, nicméně při kombinaci DNA vakcinace s adjuvans ODN1826 došlo k opakovanému mírnému zpomalení nádorového růstu. Nádory ustanovené buňkami TC-1/dB2m obsahovaly více CD4<sup>+</sup> T lymfocytů, Treg,  $\gamma\delta$  T lymfocytů a plazmacytoidních dendritických buněk a méně NK buněk a makrofágů v porovnání s nádory ustanovenými původními TC-1 buňkami. Navíc kombinovaná imunoterapie nezvyšovala infiltraci nádorů TC-1/dB2m buňkami imunitního systému.

Nádorová linie TC-1/dB2m představuje klinicky relevantní model pro výzkum nádorové imunoterapie.

**Klíčová slova:** MHCI, B2m, CRISPR/Cas9, nádorová imunoterapie

## Abstract

Malignant diseases are one of the major causes of death worldwide and the most common reason is the ability of tumor cells to escape the immune system. One of the main mechanisms used by tumors to avoid the immune response is downregulation of MHCI expression.

In this thesis, the preparation of tumor cell line with irreversible downregulation of B2m is described. Inactivation of B2m was confirmed by flow cytometry. However, MHCI heavy chain H2-D<sup>b</sup> were expressed at the cell surface in a small amount after stimulation with IFN $\gamma$ . *In vitro* proliferation of this clone was decreased. The tumor formation was delayed, and this effect was mediated by NK cells that played the major role in antitumor immunity. Metastatic activity of these cells was not affected after inactivation of B2m. TC-1/dB2m cells are not sensitive to DNA immunization. In combined immunotherapy experiments with DNA vaccination and ODN1826 adjuvant, a weak deceleration of tumor growth was achieved repeatedly. TC-1/dB2m induced tumors contained more CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, Treg,  $\gamma\delta$  T lymphocytes and plasmacytoid dendritic cells, and fewer NK cells and macrophages than tumors induced by original TC-1 cells. Moreover, combined immunotherapy did not increase the infiltration of the TC-1/dB2m tumors with immune cells.

The TC-1/dB2m tumor cell line represents a clinically relevant tumor model for further tumor immunotherapy research.

Key words: MHCI, B2m, CRISPR/Cas9, cancer immunotherapy

# Obsah

Úvod.....	9
1. MHCI v nádorové imunitě .....	9
2. Nádorová imunoterapie .....	11
3. CRISPR/Cas9 .....	13
Cíle práce.....	14
Závěr.....	15
Seznam použité literatury .....	17
Příloha 1 .....	21

## Seznam zkratek

B2m	$\beta$ 2-microglobulin	$\beta$ 2-mikroglobulin
CD	cluster of differentiation	diferenciační skupina
CpG ODN	CpG oligodeoxynucleotides	syntetické oligodeoxynukleotidy obsahující nemetylované CpG
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeats	system segmentů nahromaděných pravidelně rozmístěných krátkých palindromických sekvencí
crRNA	CRISPR RNA	CRISPR RNA
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4	antigen 4 asociovaný s cytotoxickými T lymfocyty
Fhit	fragile histidine triad diadenosine triphosphatase	diadenosin trifosfatáza křehké histidinové triády
HLA	human leukocyte antigen	lidský leukocytární antigen
HPV16	human papillomavirus 16	lidský papilomavirus 16
IFN	interferon	interferon
LMP	low molecular weight protein	proteiny s nízkou molekulární hmotností
MHCI	major histocompatibility complex I	hlavní histokompatibilní komplex I. třídy
NF $\kappa$ B	nuclear Factor $\kappa$ B	nukleární faktor $\kappa$ B
NK	natural killer	přirozený zabíječ
PD-1	programmed cell death protein 1	protein programované buněčné smrti 1
PD-L1	PD-1 ligand	ligand PD-1
STAT	signal transducer and activator of transcription	přenašeč signálu a aktivátor transkripce
TAP	transporter associated with antigen processing	přenašeč asociovaný se zpracováním antigenu
Tim-3	T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing 3	T-buněčný imunoglobulin obsahující mucinovou doménu 3
TLR	Toll-like receptor	Toll-like receptor
TNF	tumor necrosis factor	faktor nádorové nekrózy
tracrRNA	trans-activating crRNA	transaktivační crRNA
Treg	regulatory T cells	regulační T lymfocyty
ULBP	UL-16 binding protein	vazebný protein molekuly UL16
Wnt	wingless related integration site	integrační oblast genu wingless



## Úvod

Hlavním nebezpečím nádorových onemocnění je jejich schopnost vyhnout se imunitní odpovědi. Toho dosahují pomocí různých mechanismů, např. snížením produkce nádorových antigenů (Tsui *et al.*, 2004), produkcí ligandů způsobujících utlumení či apoptózu aktivovaných lymfocytů jakožto ligandu proteinu programované buněčné smrti 1 (PD-L1) či ligandu receptoru Fas (FasL) (Meng *et al.*, 2004; Blank, Gajewski and Mackensen, 2005), produkcí molekul vedoucích k ustanovení imunosupresivního nádorového mikroprostředí (Kobayashi *et al.*, 2008) či snížení povrchové exprese molekul hlavního histokompatibilního komplexu I. třídy (MHCI). Právě ke snížení exprese MHCI dochází až u 90 % lidských nádorů (Cabrera *et al.*, 1996; Nie *et al.*, 2001; Angell *et al.*, 2014).

### 1. MHCI v nádorové imunitě

Komplexy MHCI, u lidí zvané lidské leukocytární antigeny (HLA), jsou transmembránové glykoproteiny. Dělí se na klasické izotypy HLA-A, HLA-B a HLA-C a neklasické izotypy HLA-E, HLA-F, HLA-G, vazebný protein molekuly UL16 (ULBP), proteiny diferenciacní skupiny 1 (CD1) a další. Samotný HLA se skládá z těžkého řetězce  $\alpha$  a lehkého řetězce  $\beta$ 2-mikroglobulinu (B2m). Jeho úlohou je prezentovat peptidy cytotoxickým  $CD8^+$  T lymfocytům, které pak mohou zahájit řízenou imunitní odpověď. Jelikož  $CD8^+$  T lymfocyty jsou hlavními efektorovými buňkami v protinádorové imunitě, je snížení exprese MHCI efektivním nástrojem, jak se této imunitní odpovědi vyhnout. Většina nádorů je zpočátku MHCI pozitivní a negativními se stávají postupem času převážně kvůli působení  $CD8^+$  T lymfocytů, které cytotoxicky ničí nádorové buňky s normální expresí MHCI. Tím dochází k T buněčné imunoselekcí negativních variant (Garrido *et al.*, 2016; Giannakis *et al.*, 2016). T buněčná imunoselekcce ovšem není jediným mechanismem vedoucím k postupné ztrátě exprese MHCI, jak ukazuje studie vedená Garrido *et al.* (2009), ve které byla postupná ztráta MHCI detekována po injikaci nádorových buněk do imunodeficientních myší, což bylo způsobeno epigenetickými změnami (viz níže).

Snížení exprese MHCI může být reverzibilního či ireverzibilního charakteru. Reverzibilní snížení většinou nevede k úplné ztrátě povrchové exprese MHCI. K opětovnému navýšení exprese MHCI dochází působením různých cytokinů, např. interferonu  $\gamma$  ( $IFN\gamma$ ) či faktoru nádorové nekrózy  $\alpha$  ( $TNF\alpha$ ) (Pereira *et al.*, 2017). Toto snížení bývá často epigenetického charakteru (hypermetylace, deacetylace) a postihuje kromě podjednotek samotného MHCI

i komponenty mašinérie zpracovávající antigeny (APM) (Nie 2001; Vlková *et al.*, 2014). Co se týká samotných genů kódujících alely MHCI, více jsou mutovány geny kódující izotypy HLA-A a HLA-B, než geny kódující izotyp HLA-C (Nie 2001; Rooney *et al.*, 2015). Mezi komponenty APM, jejichž exprese může být u nádorů snižená, se řadí proteiny s nízkou molekulární hmotností (LMP) 2 a 7, přenašeče asociované se zpracováním antigenů (TAP) 1 a 2, kalretikulín či tapasin (Shen *et al.*, 2007; Vlková *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2017).

U gliomů byla prokázána souvislost snížení exprese MHCI s aktivací signální dráhy nazvané integrační oblast genu wingless (Wnt dráha) (Yang *et al.*, 2019). Toto tvrzení zároveň podporuje fakt, že zvýšená exprese transkripčního faktoru c-Myc je spojena se sníženou expresí MHCI, přičemž c-Myc je gen, který je přímo ovlivňován signalizační dráhou Wnt/ $\beta$  catenin. Zvrácení tohoto snížení bylo dosaženo použitím inhibitoru histonových deacetyláz (Peltenburg and Schrier, 1994; Yang *et al.*, 2019). Mechanismus účinku inhibitorů histonových deacetyláz je spojen s inhibicí deacetylace u tumor supresorového genu, jehož produktem je protein diadenosin trifosfatáza křehké histidinové triády (*Fhit*). Transkripční umlčení genu *Fhit* deacetylací je zodpovědné za koordinované snížení exprese genů kódujících komponenty APM a genů pro těžký řetězec MHCI (Romero *et al.*, 2012).

Reverzibilní snížení exprese MHCI je indikátorem špatné prognózy onemocnění. Hlavní nebezpečí tkví v tom, že díky snížení povrchové exprese MHCI nejsou CD8<sup>+</sup> T lymfocyty schopné rozpoznat nádorové buňky, ale jelikož snížení není úplné, neaktivují tyto buňky ani přirozené zabijáky (NK buňky), které rozpoznávají právě buňky neexprimující MHCI. Nicméně nádory s reverzibilním snížením exprese MHCI většinou dobře odpovídají na imunoterapii, a to především zvýšením infiltrace nádorů CD8<sup>+</sup> T lymfocyty (Watson, N.F.S. *et al.*, 2006; Grzelak A. *et al.*, 2018).

Ireverzibilní snížení exprese MHCI je způsobeno strukturálními změnami v oblastech genů kódujících řetězec  $\alpha$  MHCI, B2m či komponenty APM. Může docházet ke ztrátám celých chromozomů, jejich částí či bodovým mutacím v oblastech kódujících důležité geny pro prezentaci antigenů. Často dochází ke ztrátě heterozygoty (Bernal *et al.*, 2011; Reichel *et al.*, 2015). U některých nádorů značí ireverzibilní snížení exprese MHCI dobrou prognózu onemocnění, za což jsou pravděpodobně zodpovědné NK buňky cílící na buňky bez MHCI. Nicméně ne u všech nádorů je ireverzibilní snížení exprese MHCI spojeno s lepší prognózou (Campo *et al.*, 2014). Je tomu tak proto, že proces T buněčné imunoselekcce vedoucí k selekci MHCI negativních variant je postupný a v mezičase dochází k ustanovení imunopresivního

prostředí a pro NK buňky je tudíž obtížné tyto nádory infiltrovat (Garrido *et al.*, 2017). NK buňky obecně infiltrují nádory v nízké míře. Zároveň nebyla prokázána pozitivní korelace mezi snížením exprese MHCI a zvýšenou infiltrací CD56<sup>+</sup> NK buňkami (Kikuchi *et al.* 2007; Bernal *et al.* 2011). Nádory mohou také pozměňovat expresi ligandů pro receptory NKG2D na NK buňkách, čímž zabraňují jejich aktivaci (Li *et al.*, 2013).

Dle výzkumu Romero *et al.* (2018) mají nádory bez MHCI, na rozdíl od nádorů s vysokou expresí MHCI, nízkou metastatickou aktivitu. To odpovídá tomu, že *in vitro* byla prokázána spojitost inaktivace B2m se snížením invazivity nádorových buněk (Sun *et al.*, 2016). U myšičího modelu bylo prokázáno, že nádorové buňky s reverzibilně sníženou povrchovou expresí MHCI jsou však schopny tvořit dormantní mikrometastáze. Tyto mikrometastáze jsou většinou MHCI pozitivní a dokážou přežít v jedinci po dlouhou dobu. K jejich reaktivaci dochází v případě imunosupresivního stavu organismu (Romero *et al.* 2014; Romero *et al.*, 2018).

Změny exprese MHCI ovlivňují typy buněk infiltrujících nádory. U nádorů s vysokou expresí MHCI byl postupem času detekován pokles imunitních buněk schopných vést imunitní odpověď, konkrétně CD8<sup>+</sup> a CD4<sup>+</sup> T lymfocytů. Tento pokles byl spojen s nárůstem počtu regulačních T lymfocytů. Po imunoterapii bylo dosaženo jejich opětovného navýšení a zabránění vzniku metastáz (Romero *et al.*, 2018), což odpovídá výzkumu Carretero *et al.* (2008), kdy u regresivního melanomového nádoru s vysokou povrchovou expresí MHCI detekovali obrovskou infiltraci nádorových lézí CD8<sup>+</sup> a CD4<sup>+</sup> T lymfocyty. Progresivní nádory s nízkou expresí MHCI naopak vykazovaly nízkou infiltraci lymfocyty.

Vzhledem ke své přímé účasti na onkogenitě, vzniku metastáz, růstu nádorů atd. mohou být molekuly MHCI připodobňovány tumor supresorovým genům (Garrido *et al.*, 2012).

## **2. Nádorová imunoterapie**

V léčbě nádorů se čím dál častěji využívá kombinace konvenční léčby (chemoterapie, radioterapie) s imunoterapeutickými přístupy. Mezi ty se řadí například adoptivní přenos buněk, cytokinová léčba, protilátková léčba, využití imunostimulačních látek a jiné (Hughes *et al.*, 2015; Rosenberg and Restifo, 2015; Swain *et al.*, 2015; Gasser *et al.* 2018).

Mezi nejznámější imunoterapeutika se řadí protilátky proti PD-1, PD-L1 a antigenu 4 asociovanému s cytotoxickými T lymfocyty (CTLA-4). Všechny zmíněné molekuly jsou součástí kontrolních bodů imunitního systému. Vazba PD-1 k PD-L1 působí imunosupresivně

a jednou z jejích hlavních funkcí je inhibice proliferace aktivovaných T lymfocytů. PD-1 je exprimován na aktivovaných T a B lymfocytech. PD-L1 je exprimován na mnoha buňkách imunitního systému, a to především po stimulaci cytokiny. Nádorové buňky produkují ve zvýšené míře PD-L1, čímž inhibují protinádorovou odpověď vedenou cytotoxickými T lymfocyty (Blank, Gajewski and Mackensen, 2005). Při použití protilátek proti PD-1 může docházet ke zvýšené expresi jiných imunitních kontrolních bodů, např. T-buněčného imunoglobulinu obsahujícího mucinovou doménu 3 (Tim-3) (Koyama *et al.*, 2016 Shayan *et al.*, 2017), čímž dochází ke snížení efektu samotné léčby. Řešením je kombinace protilátky proti PD-1 s protilátkou proti Tim-3. Existuje také spojitost exprese PD-1 s expresí molekul MHC I. Erdogdu (2019) detekoval nesignifikantní inverzní korelaci exprese MHC I a PD-1, kdy u primárních nádorů byla povrchová exprese MHC I vysoká a exprese PD-1 nízká a u metastáz naopak došlo ke zvýšení exprese PD-1 a snížení exprese MHC I.

Příkladem imunostimulačních látek využitelných pro léčbu nádorů jsou syntetické oligonukleotidy obsahující nemetylované imunostimulační CpG motivy (CpG ODN). CpG ODN aktivují imunitní buňky, například B lymfocyty a plazmacytoidní dendritické buňky, exprimující Toll like receptory 9 (TLR9). Skrze ně dochází k aktivaci nukleárního faktoru  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) a k produkci prozánětlivých cytokinů (Klinman, 2004). Experimentálně byla prokázána účinnost CpG ODN1826 proti nádorům s vysokou i reverzibilně sníženou expresí MHC I (Reiniš, Šimová and Bubeník, 2006).

K aktivaci NKT buněk se v nádorové terapii využívá glykolipid  $\alpha$ -galaktosyl-ceramid. NKT buňky jsou přemostujícím článkem mezi přirozenou a adaptivní imunitou, jelikož dokáží aktivovat jak NK buňky, tak i T a B lymfocyty. Mimo jiné přispívají i k aktivaci a maturaci dendritických buněk. Produkují velké množství cytokinů a dokáží směřovat imunitní odpověď jak Th1, tak Th2 či Th17 směrem. Kromě atrakce dalších imunitních buněk je jejich funkcí také přímá lytická aktivita zprostředkovaná perforinem a granzymem B (Robertson, Berzofsky and Terabe, 2014). V kombinované imunoterapii nádorů byla prokázána účinnost kombinace DNA vakcinace s  $\alpha$ -galaktosyl-ceramidem proti nádorům s reverzibilně sníženou expresí MHC I (Grzelak *et al.*, 2018).

Dalším imunoterapeutickým přístupem je využití DNA vakcinace. Při té je do těla vpravena antigenní část DNA v podobě plazmidu. Jednou z možných cest podání je intradermální vakcinace například pomocí genové pistole, kdy je DNA transfekována do nematurovaných dendritických buněk, tzv. Langerhansových buněk, či do keratinocytů. Langerhansovy buňky

poté prezentují peptid na MHCI CD8<sup>+</sup> T lymfocytům. Intracelulární DNA zároveň aktivuje DNA senzory, což má za následek produkci cytokinů a atrakci dalších buněk imunitního systému (Yang *et al.* 2014). Kombinace DNA vakcinace s adjuvans ODN1826 se ukázala jako účinná imunoterapie proti nádorům s reverzibilně sníženou expresí MHCI (Grzelak *et al.*, 2018).

### 3. CRISPR/Cas9

Pro editaci genů se dnes hojně užívá systém adaptivní imunity izolovaný z bakterie *Streptococcus pyogenes* zvaný systém pravidelně rozmístěných krátkých palindromických sekvencí neboli CRISPR/Cas9.

CRISPR/Cas9 se používá k editaci genů zahrnující jejich modifikace, inaktivace či korekce. Využívá tzv. CRISPR RNA, která v komplexu s trans-aktivační RNA navede pomocí komplementarity bází nukleázu Cas9 k místu, které má být modifikováno. Po přestřížení vláken DNA proteinem Cas9 může dojít buď k nehomolognímu spojení konců, které má za následek mutace, jež mohou vést k inaktivaci daného genu, nebo k homologní rekombinaci, čehož se využívá například při opravách konkrétních mutací (Komor, Badran and Liu, 2017).

V této práci byl systém CRISPR/Cas9 využit pro vytvoření myší nádorové linie TC-1 s inaktivovaným genem pro B2m. Podobného mechanismu využili v nedávné době Das *et al.*, (2017) pro vytvoření myšího modelu nádoru prsu a melanomu s inaktivovaným B2m.

## **Cíle práce**

1. Inaktivace genu B2m v myší nádorové linii TC-1
2. Charakterizace vytvořených klonů *in vitro*
3. Charakterizace vytvořených klonů *in vivo*
4. Testování kombinované imunoterapie u nádorů ustanovených vybraným klonem TC-1/dB2m

## Závěr

Pomocí systému CRISPR/Cas9 byl v myší nádorové linii TC-1 inaktivován gen pro B2m. Touto inaktivací ztratily buňky TC-1/dB2m povrchovou expresi B2m i MHCI, což bylo prokázáno průtokovou cytometrií. Po stimulaci IFN $\gamma$  došlo ke slabému zvýšení povrchové exprese MHCI, především molekul H2-D<sup>b</sup>, které se na povrch buňky dostávaly bez B2m. B2m se může vázat i s neklasickou molekulou MHCI – CD1d, nicméně u CD1d nebyla zaznamenána změna povrchové exprese po inaktivaci B2m.

*In vitro* došlo u buněk TC-1/dB2m k signifikantnímu prodloužení doby zdvojení, a to jak ve srovnání s původními TC-1 buňkami, tak s buňkami TC-1/A9 s reverzibilně sníženou expresí MHCI.

*In vivo* došlo po inokulaci nádorových buněk TC-1/dB2m do syngenních myší C57BL/6 k oddálení vzniku nádorů v porovnání s růstem nádorů vyvolaných buňkami TC-1, a to i při desetinásobném zvýšení dávky inokulovaných buněk. Za to jsou pravděpodobně zodpovědné NK1.1+ buňky, které jsou hlavními efektorovými buňkami v imunitě vedené proti nádorům vytvořeným buňkami TC-1/dB2m. Metastatická aktivita nádorových buněk nebyla inaktivací B2m ovlivněna.

Nádorová linie TC-1/dB2m není, na rozdíl od původních buněk TC-1, citlivá na imunizaci DNA vakcínou pBSC/PADRE.E7GGG vyvolávající specifickou imunitní odpověď proti onkoproteinu E7 lidského papilomaviru 16 (HPV16), který je nádorovými buňkami produkován. Při použití imunostimulačních látek došlo k opakované inhibici růstu nádorů při kombinaci DNA vakcinace s adjuvans ODN1826.

Průtokovou cytometrií byla sledována infiltrace nádorů různými imunitními buňkami. Z těchto pokusů vyplývá, že nádory vytvořené buňkami TC1/dB2m obsahují více plazmacytoidních dendritických buněk, CD4+ T lymfocytů, regulačních T buněk a  $\gamma\delta$  T lymfocytů v porovnání s nádory vytvořenými původními buňkami TC-1 a buňkami TC-1/A9 s reverzibilně sníženou expresí MHCI. Zároveň obsahují méně NK buněk a makrofágů asociovaných s nádory. Po imunoterapii nedošlo ke zvýšení žádné z pozorovaných skupin imunitních buněk, zatímco nádory TC-1/A9 jsou imunitními buňkami infiltrovány ve zvýšené míře.

Nádorová linie TC-1/dB2m představuje klinicky relevantní model nádorů indukovaných buňkami bez povrchové exprese MHCI a bude dále využíván pro testování imunoterapeutických přístupů.

## Seznam použité literatury

Angell, T. E. *et al.* (2014) 'MHC Class I Loss Is a Frequent Mechanism of Immune Escape in Papillary Thyroid Cancer That Is Reversed by Interferon and Selumetinib Treatment In Vitro', *Clinical Cancer Research*, 20(23), 6034–6044. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0879.

Bernal, M. *et al.* (2011) 'Leukocyte infiltrate in gastrointestinal adenocarcinomas is strongly associated with tumor microsatellite instability but not with tumor immunogenicity', *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 60(6), 869–882. doi: 10.1007/s00262-011-0999-1.

Blank, C., Gajewski, T. F. and Mackensen, A. (2005) 'Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy', *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 54(4), 307–314. doi: 10.1007/s00262-004-0593-x.

Cabrera, T. *et al.* 1996. 'High Frequency of Altered HLA Class I Phenotypes in Invasive Breast Carcinomas', *Human Immunology* 50 (2), 127–34. doi: 10.1016/0198-8859(96)00145-0.

del Campo, A. B. *et al.* (2014) 'Immune escape of cancer cells with beta2-microglobulin loss over the course of metastatic melanoma', *International Journal of Cancer*, 134(1), 102–113. doi: 10.1002/ijc.28338.

Carretero, R. *et al.* (2008) 'Analysis of HLA class I expression in progressing and regressing metastatic melanoma lesions after immunotherapy', *Immunogenetics*, 60(8), 439-447. doi:10.1007/s00251-008-0303-5.

Das, K. *et al.* (2017) 'Generation of murine tumor cell lines deficient in MHC molecule surface expression using the CRISPR/Cas9 system', *Plos One*, 12(3). doi:10.1371/journal.pone.0174077.

Erdogdu, I. H. (2019) 'MHC Class 1 and PDL-1 Status of Primary Tumor and Lymph Node Metastatic Tumor Tissue in Gastric Cancers', *Gastroenterology Research and Practice*, 2019, 1-7. doi:10.1155/2019/4785098.

Garrido, C. *et al.* (2009) 'Alterations of HLA class I expression in human melanoma xenografts in immunodeficient mice occur frequently and are associated with higher tumorigenicity', *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 59(1), 13-26. doi:10.1007/s00262-009-0716-5.

Garrido, C. *et al.* (2012) 'MHC class I molecules act as tumor suppressor genes regulating the cell cycle gene expression, invasion and intrinsic tumorigenicity of melanoma cells', *Carcinogenesis*, 33(3), 687-693. doi:10.1093/carcin/bgr318.

Garrido, F. *et al.* (2016) 'The urgent need to recover MHC class I in cancers for effective immunotherapy', *Current Opinion in Immunology*, 39, 44-51. doi:10.1016/j.coi.2015.12.007.

Garrido, F. *et al.* (2017) 'The Escape of Cancer from T Cell-Mediated Immune Surveillance: HLA Class I Loss and Tumor Tissue Architecture', *Vaccines*, 5(1), 7. doi:10.3390/vaccines5010007.

Gasser, O. *et al.* (2018) 'A phase I vaccination study with dendritic cells loaded with NY-ESO-1 and  $\alpha$ -galactosylceramide: induction of polyfunctional T cells in high-risk melanoma patients', *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 67(2), 285–298. doi: 10.1007/s00262-017-2085-9.

Giannakis, M. *et al.* (2016) 'Genomic Correlates of Immune-Cell Infiltrates in Colorectal Carcinoma', *Cell Reports*, 15(4), 857-865. doi:10.1016/j.celrep.2016.03.075.

Grzelak, A. *et al.* (2018) 'Experimental Combined Immunotherapy of Tumours with Major Histocompatibility Complex Class I Downregulation', *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 3693. doi:10.3390/ijms19113693.

Hughes, T. *et al.* (2015) 'The prognostic significance of stable disease following high-dose interleukin-2 (IL-2) treatment in patients with metastatic melanoma and renal cell carcinoma', *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 64(4), 459–465. doi: 10.1007/s00262-014-1652-6.

Kikuchi, E. *et al.* (2007) 'HLA class I antigen expression is associated with a favorable prognosis in early stage non-small cell lung cancer', *Cancer Science*, 98(9), 1424–1430. doi: 10.1111/j.1349-7006.2007.00558.x.

Klinman, D. M. (2004) 'Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides', *Nature Reviews Immunology*, 4(4), 249–259. doi: 10.1038/nri1329.

Kobayashi, A. *et al.* (2008) 'Evolving immunosuppressive microenvironment during human cervical carcinogenesis', *Mucosal Immunology*, 1(5), 412–420. doi: 10.1038/mi.2008.33.

Komor, A. C., Badran, A. H. and Liu, D. R. (2017) 'CRISPR-Based Technologies for the Manipulation of Eukaryotic Genomes', *Cell*, 168(1–2), 20–36. doi: 10.1016/J.CELL.2016.10.044.

Koyama, S. *et al.* (2016) 'Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune checkpoints', *Nature Communications*, 7, 10501. doi: 10.1038/ncomms10501.

Li, J.-J. *et al.* (2013) 'Prognostic value of soluble MICA levels in the serum of patients with advanced hepatocellular carcinoma.', *Chinese journal of cancer*, 32(3), 141–8. doi: 10.5732/cjc.012.10025.

Meng, Y. *et al.* (2004) 'Upregulation of FasL by LPA on ovarian cancer cell surface leads to apoptosis of activated lymphocytes', *Gynecologic Oncology*, 95(3), 488-495. doi:10.1016/j.ygyno.2004.07.052.

Nie, Y. *et al.* (2001) 'DNA Hypermethylation Is a Mechanism for Loss of Expression of the HLA Class I Genes in Human Esophageal Squamous Cell Carcinomas', *Carcinogenesis* 22 (10), 1615–23. doi: 10.1093/carcin/22.10.1615.

Peltenburg, L. T. C. and Schrier, P. I. (1994) 'Transcriptional suppression of HLA-B expression by c-Myc is mediated through the core promoter elements', *Immunogenetics*, 40(1), 54–61. doi: 10.1007/BF00163964.

Pereira, C. *et al.* (2017) 'Genomic Profiling of Patient-Derived Xenografts for Lung Cancer Identifies *B2M* Inactivation Impairing Immunorecognition', *Clinical Cancer Research*, 23(12), 3203–3213. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1946.

Reichel, J. *et al.* (2015) 'Flow sorting and exome sequencing reveal the oncogenome of primary Hodgkin and Reed-Sternberg cells', *Blood*, 125(7), 1061–1072. doi: 10.1182/blood-2014-11-610436.

Reiniš, M., Šimová, J. and Bubeník, J. (2006) 'Inhibitory effects of unmethylated CpG oligodeoxynucleotides on MHC class I-deficient and -proficient HPV16-associated tumours', *International Journal of Cancer*, 118(7), 1836–1842. doi: 10.1002/ijc.21546.

Robertson, F. C., Berzofsky, J. A. and Terabe, M. (2014) 'NKT Cell Networks in the Regulation of Tumor Immunity', *Frontiers in Immunology*, 5, 543. doi: 10.3389/fimmu.2014.00543.

Romero, I. *et al.* (2012) 'The tumour suppressor Fhit positively regulates MHC class I expression on cancer cells', *The Journal of Pathology*, 227(3), 367-379. doi:10.1002/path.4029.

Romero, I. *et al.* (2014) 'T Lymphocytes Restrain Spontaneous Metastases in Permanent Dormancy', *Cancer Research*, 74(7), 1958-1968. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-2084

Romero, I. *et al.* (2018) 'MHC Intratumoral Heterogeneity May Predict Cancer Progression and Response to Immunotherapy', *Frontiers in Immunology*, 9. doi:10.3389/fimmu.2018.00102.

Rooney, M. *et al.* (2015) 'Molecular and Genetic Properties of Tumors Associated with Local Immune Cytolytic Activity', *Cell*, 160(1-2), 48-61. doi:10.1016/j.cell.2014.12.033.

Rosenberg, S.A. and Restifo, N.P. (2015) 'Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer.', *Science (New York, N.Y.)*, 348(6230), 62–8. doi: 10.1126/science.aaa4967.

Shayan, G. *et al.* (2017) 'Adaptive resistance to anti-PD1 therapy by Tim-3 upregulation is

mediated by the PI3K-Akt pathway in head and neck cancer’, *OncoImmunology*, (1), p. e1261779. doi: 10.1080/2162402X.2016.1261779.

Shen, Y.-Q. *et al.* (2007) ‘Low-molecular-weight protein (LMP)2/LMP7 abnormality underlies the downregulation of human leukocyte antigen class I antigen in a hepatocellular carcinoma cell line.’, *Journal of gastroenterology and hepatology*, 22(7), 1155–61. doi: 10.1111/j.1440-1746.2006.04421.x.

Sun, W. *et al.* (2016) ‘Human epithelial-type ovarian tumour marker beta-2-microglobulin is regulated by the TGF- $\beta$  signaling pathway.’, *Journal of translational medicine*, 14, 75. doi: 10.1186/s12967-016-0832-x.

Swain, S. M. *et al.* (2015) ‘Pertuzumab, Trastuzumab, and Docetaxel in HER2-Positive Metastatic Breast Cancer’, *New England Journal of Medicine*, 372(8), pp. 724–734. doi: 10.1056/NEJMoa1413513.

Tsui, K *et al.* (2004) ‘Downregulation of the prostate specific antigen promoter by p53 in human prostate cancer cells’, *Journal of Urology*, 172(5), 2035-2039. doi:10.1097/01.ju.0000138053.78518.b2.

Yang, B. *et al.* (2014) ‘DNA vaccine for cancer immunotherapy’, *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 10(11), 3153–3164. doi: 10.4161/21645515.2014.980686.

Yang, W. *et al.* (2019) ‘MHC class I dysfunction of glioma stem cells escapes from CTL-mediated immune response via activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway’, *Oncogene*, 39(5), 1098-1111. doi:10.1038/s41388-019-1045-6.

Vlková *et al.* (2014) ‘Epigenetic Regulations in the IFN $\gamma$  Signalling Pathway: IFN $\gamma$ -Mediated MHC Class I Upregulation on Tumour Cells Is Associated with DNA Demethylation of Antigen-Presenting Machinery Genes’, *Oncotarget* 5 (16), 6923–35. doi: 10.18632/oncotarget.2222.

Watson, N.F.S. *et al.* (2006) ‘Immunosurveillance is active in colorectal cancer as downregulation but not complete loss of MHC class I expression correlates with a poor prognosis.’, *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 118(1), 6–10. doi: 10.1002/ijc.21303.

## **Příloha 1**

### **Publikovaný článek**

**Establishment and characterization of a mouse tumor cell line with irreversible  
downregulation of MHC class I molecules**

Karolína Lhotáková, Adrianna Grzelak, Ingrid Poláková

Julie Vacková and Michal Šmahel