

**UNIVERZITA KARLOVA**

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



**Bc. Marie Kroutilová**

Nový chimérický antigenní receptor (CAR)  
pro terapii infekce lidským cytomegalovirem (HCMV)

New chimeric antigen receptor (CAR)  
for therapy of human cytomegalovirus (HCMV) infection

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Šárka Němečková, DrSc.

Praha 2018



**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 Praze, 30. dubna 2018

Podpis: .....

Marie Kroutilová

## **Poděkování:**

Ráda bych poděkovala především svému kolegovi z laboratoře, „Jedi masterovi“ RNDr. Janu Musilovi, PhD. Od počátku mého pobytu v laboratoři na ÚHKT mi předával své praktické zkušenosti, plánoval se mnou experimenty a věnoval mi velké množství svého času. Mimo to mi jeho neutuchající pozitivní přístup k věci, vypravěčský um a hudební vkus pomáhaly ve chvílích rozčarování nad nepovedenými experimenty i nad sebou samou.

Dále jsem velmi vděčná své školitelce RNDr. Šárce Němečkové, DrSc., za její laskavé, trpělivé a velkorysé vedení a také za to, že několikrát pročetla text práce a poskytla mi k němu řadu rad a doporučení.

Mgr. Petru Hainzovi děkuji za izolace PBMC z periferní krve, přípravu virových inokul a pomoc s expanzemi T lymfocytů. Mgr. Pavlíně Ptáčkové a MUDr. Pavlu Otáhalovi, PhD., vděčím za rady ohledně vnášení CAR do T lymfocytů a poskytnuté plazmidové vektory. Mgr. Vojtěchu Šrollerovi, PhD., rovněž děkuji za poskytnuté vektory a doporučení ohledně klonování a MUDr. Pavlu Gabrielovi, PhD., za rady ohledně metody ELISA.

V neposlední řadě děkuji všem zbývajícím kolegům „Jediům“ z laboratoře za vytvoření velmi přátelského a příjemného pracovního prostředí.

Mé velké díky patří také rodině a přátelům za jejich podporu během studia a psaní diplomové práce.

Tato práce vznikla v letech 2015-2018 za finanční podpory grantu 15-34498A Ministerstva zdravotnictví České republiky.

## Abstrakt

Lidský cytomegalovirus (HCMV, *Herpesviridae*) může způsobit vážné komplikace infikovaným pacientům podstupujícím transplantaci krvetvorných buněk. V současné době jsou pacienti léčeni antivirotiky nebo jsou využívány HCMV-specifické T lymfocyty seropozitivního dárce štěpu. V této práci byla zkoumána možnost zacílení HCMV-nespecifických T lymfocytů seronegativního dárce na HCMV-infikované buňky pomocí chimérického antigenního receptoru (CAR), tj. uměle zkonstruovaného receptoru pro T lymfocyt.

Jako cíl pro tento receptor byl vybrán virový glykoprotein B (gB). Pro konstrukci CAR proti gB (gBCAR) byla použita publikovaná sekvence jednořetězcového variabilního fragmentu lidské protilátky. Po ověření produkce a povrchové lokalizace v buněčných liniích byl gBCAR vnášen do lidských T lymfocytů pomocí lentivirových vektorů. Jako cílové buňky byly použity lidské embryonální fibroblasty (LEP) infikované HCMV, u kterých byla prokázána povrchová exprese gB. Funkčnost gBCAR byla ověřena inkubací modifikovaných T lymfocytů s infikovanými buňkami a následnou analýzou média pro zjištění koncentrace IFN $\gamma$ , která byla signifikantně vyšší u gBCAR T lymfocytů inkubovaných s HCMV-LEP oproti kontrolám.

Dosažené výsledky ukazují specifitu gBCAR vůči HCMV-infikovaným buňkám a poskytují základ k dalšímu funkčnímu testování a vývoji tohoto a podobných CAR proti HCMV. Zároveň odhalují prostor pro optimalizaci vnášení konstruktů do T lymfocytů a jejich následné expanze.

**Klíčová slova:** chimérický antigenní receptor (CAR), lidský cytomegalovirus (HCMV), glykoprotein B (gB), T lymfocyty, lentivirové vektory, interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ )

## Abstract

Human cytomegalovirus (HCMV, *Herpesviridae*) can cause severe complications in the infected individuals undergoing hematopoietic stem cell transplantation. Nowadays, these patients are treated using antivirals or HCMV-specific T cells derived from the seropositive graft donor. This study explored the possibility of redirecting HCMV-non-specific T cells from a seronegative donor towards HCMV-infected cells via chimeric antigen receptor (CAR), i.e. artificially designed T cell receptor.

Viral glycoprotein B (gB) has been selected as a target for this receptor. Published sequence of a single chain variable fragment of a human antibody was used for the design of the CAR against gB (gBCAR). After the verification of production and surface localization in cell lines, gBCAR was being introduced into human T cells via lentiviral vectors. Human fetal lung fibroblasts (LEP) infected with HCMV were used as target cells after the expression of gB at their surface was demonstrated. gBCAR functionality was evaluated by the incubation of modified T cells with infected cells and subsequent analysis of media for IFN $\gamma$  concentration, which was significantly higher in the setting of gBCAR T cells incubated with HCMV-LEP than in the control incubations.

The results obtained show the specificity of gBCAR against HCMV-infected cells and provide a basis for further functional testing and development of this and similar CARs against HCMV. Simultaneously, they reveal a room for optimization of the gBCAR introduction into T cells and of their following expansion.

**Keywords:** chimeric antigen receptor (CAR), human cytomegalovirus (HCMV), glycoprotein B (gB), T cells, lentiviral vectors, interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ )

# Obsah

1	Úvod.....	12
2	Cíle práce .....	14
3	Přehled literatury .....	15
3.1	Lidský cytomegalovirus (HCMV) a jeho vliv na zdraví člověka .....	15
3.1.1	HCMV a transplantace krvetvorných buněk (HSCT) .....	16
3.2	Chimérické antigenní receptory (CAR).....	18
3.2.1	Struktura CAR.....	18
3.2.2	Příprava CAR T lymfocytů.....	19
3.2.3	Terapie pomocí CAR T lymfocytů .....	21
3.2.4	Protivirové CAR .....	22
3.3	Glykoprotein B (gB).....	24
3.3.1	Funkce gB a jeho výskyt v buňce.....	24
3.3.2	Struktura gB a protilátky proti němu.....	24
3.3.3	CAR proti gB HCMV .....	26
4	Materiál a metody .....	28
4.1	Materiál.....	28
4.1.1	Lidské buňky .....	28
4.1.2	Bakteriální kmeny.....	28
4.1.3	Viry .....	29
4.1.4	Standardy molekulových hmotností .....	29
4.1.5	Plazmidové vektory .....	29
4.1.6	Protilátky .....	30
4.1.7	Antibiotika.....	31
4.1.8	Cytokiny .....	31
4.1.9	Kultivační média.....	32
4.1.10	Enzymy .....	33
4.1.11	Často používané roztoky.....	33
4.1.12	Pufry pro nanášení DNA a proteinových vzorků na gel .....	34
4.1.13	Komerční soupravy a reagentie .....	34
4.1.14	Chemikálie.....	34
4.1.15	Použité přístroje .....	36
4.1.16	Software .....	37
4.2	Metody.....	37
4.2.1	Sterilizace a likvidace infekčního odpadu .....	37

4.2.2	Práce s lidskými tkáňovými kulturami.....	38
4.2.3	Práce s bakteriemi .....	41
4.2.4	Klonování a práce s DNA.....	42
4.2.5	Konstrukce gBCAR.....	46
4.2.6	Transfekce lidských buněk .....	47
4.2.7	Western blot.....	50
4.2.8	Příprava lentivirů.....	52
4.2.9	Transdukce lentivirů do buněk – spinofekce .....	52
4.2.10	Barvení buněk pro průtokovou cytometrii .....	53
4.2.11	Měření na průtokovém cytometru BD LSRFortessa™ .....	54
4.2.12	Infekce buněk LEP virem HCMV kmene Ad169 .....	55
4.2.13	ELISA pro detekci IFN $\gamma$ .....	55
4.2.14	Metody prováděné jinou osobou.....	56
4.2.15	Příprava materiálu pro pokusy.....	58
5	Výsledky.....	60
5.1	Konstrukce gBCAR a lentivirového vektoru obsahujícího gBCAR.....	60
5.1.1	Konstrukce gBCAR v plazmidu pUC18 .....	60
5.1.2	Konstrukce plazmidu pBK-CMV-gBCAR.....	62
5.1.3	Exprese gBCAR z plazmidu pBK-CMV-gBCAR v buňkách 293T .....	64
5.1.4	Konstrukce lentivirového plazmidu pWPXLd-gBCAR.....	65
5.1.5	Exprese gBCAR z plazmidu pWPXLd-gBCAR v buňkách 293T .....	68
5.2	Identifikace vhodné protilátky pro detekci gBCAR na povrchu buněk pomocí průtokové cytometrie.....	70
5.2.1	Protilátky proti epitopu FLAG .....	70
5.2.2	Protilátky proti lidskému IgG .....	71
5.3	Exprese gBCAR v buňkách Jurkat po transdukci lentiviry .....	76
5.4	Exprese gBCAR v dárcovských T lymfocytech po transdukci lentiviry.....	77
5.5	Příprava gBCAR T lymfocytů pomocí transpozonového systému piggyBac .....	82
5.5.1	Konstrukce piggyBac vektoru obsahujícího gBCAR .....	82
5.5.2	Vnesení vektorů piggyBac do T lymfocytů pomocí elektroporace .....	84
5.6	Příprava cílových buněk exprimujících gB .....	86
5.6.1	Příprava cílových buněk pomocí elektroporace .....	86
5.6.2	Příprava cílových buněk pomocí lentivirové transdukce .....	86
5.7	Infekce buněk LEP virem HCMV kmene Ad169.....	92
5.8	Příprava gBCAR a CD19-CAR T lymfocytů pro funkční test .....	94
5.9	Funkční test T lymfocytů nesoucích gBCAR .....	96
5.9.1	Inkubace gBCAR T lymfocytů s buňkami LEP infikovanými HCMV Ad169.....	96

5.9.2	Určení koncentrace IFN $\gamma$ v médiích z inkubací pomocí metody ELISA .....	98
6	Diskuze .....	99
6.1	Konstrukce a detekce gBCAR .....	99
6.2	Vnášení gBCAR do T lymfocytů .....	100
6.2.1	Příprava lentivirů a transdukce .....	100
6.2.2	System piggyBac .....	101
6.3	Expanze gBCAR T lymfocytů .....	102
6.4	Cílové buňky .....	103
6.5	Funkční testy .....	104
6.6	Srovnání s předchozími studiemi CAR proti gB HCMV .....	105
6.7	Závěr a plány do budoucna .....	106
7	Souhrn .....	108
8	Použitá literatura .....	109
9	Přílohy .....	i
9.1	Profily standardů molekulových hmotností DNA .....	i
9.2	Profil standardu molekulové hmotnosti proteinů .....	i
9.3	Mapy plazmidových vektorů .....	ii
9.3.1	Lentivirové vektory .....	ii
9.3.2	Plazmidy piggyBac transpozonového systému .....	iv
9.3.3	pBK-CMV .....	v
9.4	Konfigurace průtokového cytometru BD LSRFortessa™ .....	vi
9.5	Proteinové sekvence a predikované molekulové hmotnosti .....	vii
9.5.1	gBCAR .....	vii
9.5.2	CD19-CAR .....	vii

## Seznam často používaných zkratk

Zkratka	Český význam	Anglický význam
+	pozitivní	positive
$\alpha$	proti	anti
ATB	směs antibiotik pro lidské buňky	antibiotic mixture for human cells
b/ml	počet buněk na mililitr	number of cells per millilitre
CAR	chimérický antigenní receptor	chimeric antigenic receptor
CD19-CAR	CAR proti lidské molekule CD19	CAR against human CD19 molecule
ELISA	imunologická metoda pro detekci antigenu nebo protilátky využívající barevné enzymatické reakce	enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	fetální bovinní sérum	fetal bovine serum
gB	glykoprotein B	glycoprotein B
gBCAR	chimérický antigenní receptor proti gB HCMV	chimeric antigenic receptor against gB of HCMV
gB-cIR	chimérický imunoreceptor proti gB HCMV vyvinutý ve studii autorů Full <i>et al.</i> (2010)	chimeric immunoreceptor against gB of HCMV developed by Full <i>et al.</i> , (2010)
GFP	zelený fluorescenční protein	green fluorescent protein
GvHD	reakce štěpu proti hostiteli	graft-versus-host disease
h.p.i.	hodiny po infekci	hours post infection
HCMV	lidský cytomegalovirus	human cytomegalovirus
HRP	křenuvová peroxidáza	horseradish peroxidase
IFN $\gamma$	interferon $\gamma$	interferon $\gamma$
IgG	imunoglobulin G	immunoglobulin G
IL	interleukin	interleukin
kDa	kilodaltony	kilodaltons
L&D	fluorescenční barvivo pro rozlišení živých a mrtvých buněk	LIVE/DEAD™ Fixable Blue Dead Stain Cell Kit
MHC	hlavní histokompatibilní komplex	major histocompatibility complex
NK	negativní kontrola	negative control
OD	optická denzita	optical density
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok	phosphate buffered saline
PBMC	mononukleární buňky z periferní krve	peripheral blood mononuclear cells
PK	pozitivní kontrola	positive control
scFv	jednořetězcový variabilní fragment	single-chain variable fragment
TCR	T receptorový komplex	T cell receptor
TNF	faktor nádorové nekrózy	tumor necrosis factor

**T<sub>SCM</sub>**

kmenové paměťové buňky

memory stem cells

**ÚHKT**

Ústav hematologie a krevní transfuze

Institute of Hematology and Blood  
Transfusion

# 1 Úvod

Lidský cytomegalovirus (HCMV) z čeledi *Herpesviridae* způsobuje vážné komplikace u infikovaných pacientů podstupujících transplantaci krvetvorných buněk (HSCT). Vzhledem k silné imunosupresi před i po samotné transplantaci může dojít k reaktivaci viru z latence a jeho pomnožení v tělních orgánech, které může vést až k úmrtí pacienta. V současnosti je u těchto pacientů využívána terapie antivirotiky, která s sebou nese řadu vedlejších účinků a riziko rozvoje rezistencí. U pacientů přijímajících štěp od seropozitivního dárce lze v kritické fázi před obnovením imunitního systému využít rovněž adoptivní T buněčné terapie HCMV-specifickými T lymfocyty dárce. Toto ovšem není možné v případě příjmu štěpu od dárce seronegativního.

Na Ústavu hematologie a krevní transfuze (ÚHKT) jsou léčeni pacienti s leukémiemi a dalšími onemocněními krve, pro něž je často jedinou nadějí právě podstoupení HSCT. V době nefunkčního imunitního systému tyto pacienty ohrožuje řada infekcí včetně těch způsobených reaktivovanými latentními viry. Proto je těmto virům a zejména HCMV na výzkumném úseku ÚHKT věnována pozornost. Dlouhodobě jsou na ÚHKT studovány HCMV-specifické T lymfocyty a rekonstituce T buněčné odpovědi po HSCT (Nemeckova *et al.*, 2016a). Zároveň byl u dárců krvetvorných buněk na ÚHKT pozorován stoupající počet nepříbuzných seronegativních dárců a tedy nárůst rizikové kombinace seronegativní dárce / seropozitivní příjemce (Nemeckova *et al.*, 2016b).

Chimérický antigenní receptor (CAR) je uměle zkonstruovaný receptor pro T lymfocyt, který dokáže rozpoznat nativní povrchový antigen nezávisle na molekulách hlavního histokompatibilního komplexu (MHC), přičemž aktivuje efektorové mechanismy T lymfocytu a způsobí destrukci cílových buněk. Jako antigen-vazebná část CAR je nejčastěji využíván jednořetězcový variabilní fragment (scFv) protilátky proti danému antigenu. CAR jsou vyvíjeny převážně pro terapie nádorů, doposud se osvědčily především v léčbě hematologických malignit, kde již v některých případech dospěly do stadia schváleného léčiva. Vývoj CAR proti národovým onemocněním probíhá i na ÚHKT díky MUDr. Pavlu Otáhalovi, PhD., a jeho týmu (Otáhal *et al.*, 2016; Ptáčková *et al.*, 2018).

Vzhledem k potřebám pacientů a zkušenostem s vývojem CAR na ÚHKT bylo tedy rozhodnuto vyzkoušet možnost zacílení nespecifických T lymfocytů seronegativních dárců na HCMV-infikované buňky pomocí CAR.

V této práci byl jako cíl pro CAR receptor vybrán obalový glykoprotein B (gB) HCMV vyskytující se na povrchu infikovaných buněk. gB je významným imunogenem HCMV a protilátky proti němu jsou dlouhodobě studovány, v literatuře byla navíc publikována sekvence scFv lidské protilátky proti gB, které lze využít bez nutnosti připravovat protilátku

vlastní. V roce 2010 byla také publikována studie, ve které byl na základě myší protilátky připraven CAR proti gB, který se v testech jevil jako funkční (Full *et al.*, 2010). gB byl tedy vybrán jako ideální první kandidát pro testování vývoje CAR proti HCMV.

## 2 Cíle práce

Cílem práce bylo zkonstruovat lidský chimérický antigenní receptor (CAR) cílený na glykoprotein B (gB) lidského cytomegaloviru (HCMV) a ověřit jeho funkčnost *in vitro*.

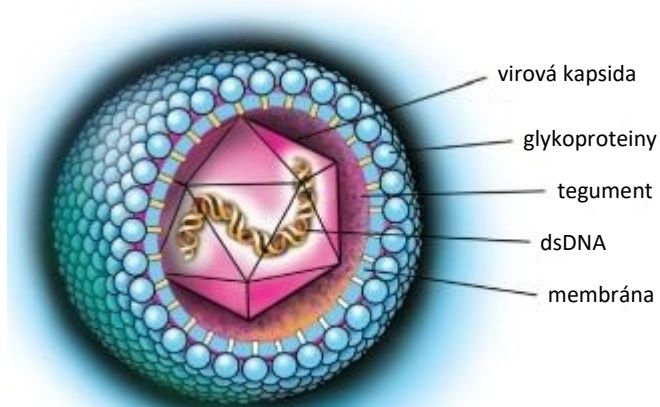
Tento cíl zahrnoval:

- konstrukci gBCAR molekulárním klonováním,
- ověření obecné exprese a následně specificky povrchové exprese gBCAR v transfekovaných buněčných liniích,
- zavedení postupu přípravy lentivirů a transdukce T lymfocytů,
- ověření povrchové exprese gBCAR v transdukovaných T lymfocytech,
- přípravu cílových buněk pro testování funkčnosti gBCAR,
- ověření schopnosti gBCAR stimulovat modifikované T lymfocyty k produkci cytokinů v přítomnosti cílových buněk.

## 3 Přehled literatury

### 3.1 Lidský cytomegalovirus (HCMV) a jeho vliv na zdraví člověka

Lidský cytomegalovirus (HCMV) je obalený dsDNA  $\beta$ -herpesvirus (čeleď *Herpesviridae*) (viz Obrázek č. 1). Virus kóduje přibližně 200 proteinů (Murphy *et al.*, 2003a, 2003b), z nichž je mnoho vyčleněno pro manipulaci imunitního systému hostitele (přehledně Jackson *et al.*, 2011). HCMV je v lidské populaci silně prevalentní (přehled studií seroprevalence viz Cannon *et al.*, 2010) a způsobuje u imunokompetentních osob celoživotní latentní infekci bez klinických příznaků. U osob s oslabeným imunitním systémem, jako jsou pacienti po transplantacích nebo pacienti s AIDS, však může dojít k reaktivaci viru a s tím souvisejícím zánětům řady orgánů (plic, gastrointestinálního traktu, sítnice atd.), které mohou vést až k orgánovým selháním a ke smrti pacienta. HCMV je rovněž nejčastější příčinou kongenitálních infekcí, které mohou způsobit špatný vývoj plodu nebo dokonce jeho potracení, u narozených dětí potom mohou vyústit ve ztrátu sluchu, zraku nebo neurologická poškození (van Zuylen *et al.*, 2014). Navíc se v posledních letech objevují studie o dlouhodobém vlivu HCMV na vyčerpání imunitního systému, které je charakterizované velkým podílem pozdních diferenciačních stadií CD8+ T lymfocytů specifických na HCMV, a naopak nízkou frekvencí naivních T lymfocytů v periferní krvi (Müller *et al.*, 2017). Polemizuje se také o vlivu HCMV na etiologii kardiovaskulárních chorob nebo glioblastomů (Müller *et al.*, 2017). Přestože tedy HCMV u většiny zdravé populace nezpůsobuje vážné klinicky manifestované onemocnění, jedná se o významný lidský patogen.



**Obrázek č. 1: Struktura virionu HCMV**

Obrázek byl upraven podle: <https://pedclerk.bsd.uchicago.edu/page/cytomegalovirus-cmv> [18. 4. 2018]

### 3.1.1 HCMV a transplantace krvetvorných buněk (HSCT)

Transplantace krvetvorných buněk (případně kostní dřeně; HSCT) je velmi složitý a rizikový léčebný proces. Je však zároveň často jedinou nadějí pro pacienty trpící leukémiemi nebo jinými vážnými onemocněními krve. Pacienti jsou během transplantačního procesu silně imunosuprimováni z důvodu destrukce jejich vlastní kostní dřeně (chemoterapií či ozařováním) a následného podávání imunosupresiv pro prevenci reakce štěpu proti hostiteli (GvHD). Kvůli této imunosupresi jsou pacienti ohrožováni infekcemi z prostředí a reaktivacemi latentních virů, jako je právě HCMV. HCMV u pacientů po HSCT kromě výše popsaných komplikací (zanícení a selhání orgánů) způsobuje také zvýšenou pravděpodobnost akutní GvHD, zvýšení mortality nesouvisějící s relapsem onemocnění a snížení celkového přežívání (komplikace po HSCT způsobené HCMV přehledně Chan & Logan, 2017). Virus může pravděpodobně také zabraňovat efektivní rekonstituci imunitního systému infekcí stromálních buněk kostní dřeně (Reddehase, 2016).

#### 3.1.1.1 Současná terapie HCMV u pacientů po HSCT

V současnosti jsou pro prevenci a terapii HCMV infekce/reaktivace u pacientů po HSCT standardně používána antivirotika zacílená na virovou DNA polymerázu. Mezi tato antivirotika patří ganciclovir (+ jeho derivát vanganciclovir), foscarnet a cidofovir (Biron, 2006), která však způsobují řadu vedlejších účinků, především nefrotoxicitu a myelosupresi. Při jejich dlouhodobém používání navíc dochází k selekci rezistentních variant viru, vzácně může dojít i ke vzniku mutantního viru rezistentního vůči všem těmto antivirotikům najednou, což vede k život ohrožujícím stavům (Göhring *et al.*, 2015). Nová antivirotika s minimem vedlejších účinků (maribavir, brincidofovir a letermovir) jsou v současnosti ve stádiích klinických studií (Frange & Leruez-Ville, 2018).

Předmětem zájmu je také řada slibných terapeutických vakcín, jejichž bezpečnost a účinnost je zkoumána v klinických studiích (Schleiss, 2016). Význam těchto vakcín pro pacienty po HSCT je však obtížné odhadnout vzhledem ke špatnému stavu jejich imunitního systému. Terapeutické vakcíny tedy budou mít zřejmě větší význam u pacientů po solidních orgánových transplantacích.

##### 3.1.1.1.1 Adoptivní transfer T lymfocytů

Pro adekvátní imunitní odpověď vůči HCMV je zásadní expanze a perzistence HCMV-specifických T lymfocytů (Quinnan *et al.*, 1982; Reddehase *et al.*, 1985; Koszinowski *et al.*, 1987; Reusser *et al.*, 1991). T lymfocyty zabraňují replikaci viru a projevům onemocnění a udržují virus v latenci. V době časně po transplantaci pocházejí HCMV-specifické T lymfocyty z dárce. Jejich nedostatek je hlavním faktorem pro rozvoj infekce u pacientů, z čehož je odvozován

význam adoptivní T-buněčné terapie (tj. podání T lymfocytů pacientovi). Ta může pacientům pomoci překlenout nebezpečnou fázi nedostatečné protivirové odpovědi během silné imunosuprese do doby, než se rozvine vlastní imunitní systém z transplantovaných krvetvorných buněk (Nicholson & Peggs, 2015).

Pokud se dárce někdy setkal s HCMV infekcí a má HCMV-specifické paměťové T lymfocyty, je možné tyto dárce lymfocyty z periferní krve stimulovat a expandovat *in vitro* a následně podat infuzí příjemci. První úspěšný adoptivní transfer protivirových T lymfocytů u člověka byl proveden s HCMV-specifickými T lymfocyty již v roce 1992 (Riddell *et al.*, 1992). Od té doby bylo provedeno mnoho studií, které potvrdily bezpečnost a pozitivní vliv adoptivní T buněčné terapie na rekonstrukci anti-HCMV odpovědi u pacientů po HSCT (Walter *et al.*, 1995; Einsele *et al.*, 2002). Adoptivní terapie je využívána také např. u viru Epstein-Barr (EBV) (Heslop *et al.*, 1996).

Obtížnější je ovšem situace v případě naivního seronegativního dárce, který se s HCMV nikdy nesešel. Takový dárce má HCMV-specifické T lymfocyty jen ve velmi nízké frekvenci, která většinou není dostatečná pro expanzi. Stejný problém nastává u transplantací, kde je zdrojem kmenových buněk pupečnická krev. V několika studiích byla popsána úspěšná příprava antigen-specifických T lymfocytů z naivních dárců a pupečnické krve (Hanley *et al.*, 2015) nebo použití multivirově-specifických T lymfocytů třetích osob (Leen *et al.*, 2013), ale výzkum na tomto poli je teprve v počátcích. Podle studie provedené na ÚHKT (Nemeckova *et al.*, 2016b) stoupá počet nepříbuzných seronegativních dárců kmenových buněk, což může zřejmě souviset se zvyšujícími se hygienickými standardy a obvykle vyšším socioekonomickým statusem dobrovolných nepříbuzných dárců. Riziková kombinace seronegativní dárce / sepopozitivní příjemce se tedy bude pravděpodobně objevovat častěji. Jedním z možných řešení pro tyto pacienty by mohla být *in vitro* genetická úprava dárcovských T lymfocytů pomocí chimérických antigenních receptorů (CAR) tak, aby T lymfocyty následně dokázaly rozpoznat a potlačit akutní infekci HCMV.

## 3.2 Chimérické antigenní receptory (CAR)

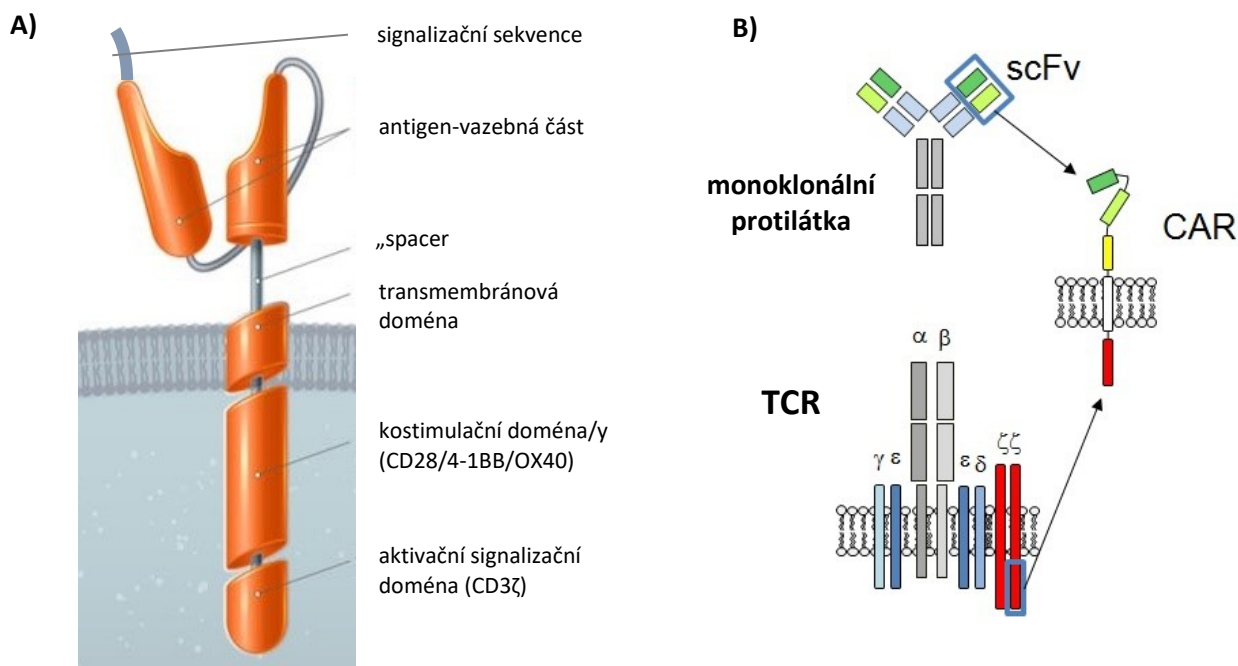
Chimérický antigenní receptor (CAR) je uměle zkonstruovaný receptor pro T lymfocyt cílený na antigen zájmu. CAR rozpoznává povrchový antigen v nativní podobě nezávisle na molekulách MHC. Po rozpoznání antigenu pomocí CAR dochází k aktivaci T lymfocytu a jeho efektorových funkcí, tj. k produkci cytokinů, cytotoxické aktivitě vůči rozpoznané buňce apod., čehož lze využít pro terapii řady onemocnění.

Nezávislost na třídě MHC, na kterých běžně T lymfocyty rozpoznávají antigenní peptidy pomocí T receptorového komplexu (TCR), představuje výhodu CAR jako terapeutického agens, protože je možné je použít u širokého spektra pacientů. Pro rozpoznání antigenu rovněž není nutná jeho úprava na antigenní peptid a jeho vystavení na MHC molekulách. CAR lze potenciálně zacílit na řadu antigenů (protein, glykoprotein, glykolipid), ovšem pouze pokud se vyskytují na povrchu buňky. Intracelulární nádorové nebo infekční antigeny jsou pro CAR nedostupné.

### 3.2.1 Struktura CAR

První funkční konstrukt podobný CAR byl navržen již v roce 1989, kdy byly využity variabilní domény těžkého ( $V_H$ ) a lehkého řetězce ( $V_L$ ) myší protilátky rozpoznávající antigen 2,4,6-trinitrofenyl, které byly jednotlivě fúzovány s  $\alpha$  nebo  $\beta$  konstantními doménami TCR. Po transfekci do myšího cytotoxického T buněčného hybridomu bylo dosaženo exprese funkčního TCR, produkce IL-2 a antigen-specifické cytotoxicity vůči buňkám nesoucím antigen (Gross *et al.*, 1989).

Současné CAR již nepotřebují být zakomponovány do TCR a fungují samostatně mimo tento receptorový komplex (Annenkov & Chernajovsky, 2000). Skládají se z několika nezávislých modulů (viz Obrázek č. 2). Extracelulární antigen-vazebnou část tvoří většinou jednořetězcový variabilní fragment (scFv) pocházející z monoklonální protilátky. scFv představuje spojení variabilních částí těžkého ( $V_H$ ) a lehkého řetězce ( $V_L$ ) flexibilním peptidovým řetězcem. Prakticky tak dochází k přenesení protilátkové specifity na T lymfocyt. Místo scFv je však také možné použít jiný ligand vážící se na cílovou molekulu zájmu, např. cytokin (Kong *et al.*, 2012) nebo peptid (Davies *et al.*, 2012). Dále CAR obsahuje transmembránovou doménu pro ukotvení v membráně, kostimulační doménu/y (nejčastěji odvozené z molekul CD28/4-1BB/OX-40) a aktivační doménu CD3 $\zeta$  odvozenou z TCR, která spouští signalizaci v T lymfocytech. Na N-konci CAR se dále nachází signální sekvence směřující konstrukt do cytoplazmatické membrány buňky a mezi scFv a transmembránovou doménu se většinou vkládá tzv. „spacer“ neboli „hinge“ doména, tj. krátký peptidový řetězec pro zajištění vhodné délky CAR pro vazbu antigenu.



**Obrázek č. 2: Obecná struktura chimérického antigenního receptoru (CAR).**

A) modulární struktura CAR; B) znázornění původu antigen-vazebné části CAR a CD3ζ domény. Obrázky byly upraveny podle:

A) <https://294305267s7hqfks2cfh08ip-wpengine.netdna-ssl.com/wp-content/uploads/2016/09/cart.jpg> [31. 12. 2017]; B) Heczey & Louis, 2013.

Aktivační doména CD3ζ dokáže cytotoxicky aktivovat T lymfocyty (Gross *et al.*, 1989), ale nedokáže zajistit dlouhodobou produkci cytokinů a proliferaci T lymfocytů (Brocker, 2000). Proto se do CAR vkládá kostimulační doména, která podporuje proliferaci modifikovaných T lymfocytů, jejich dlouhodobé přežívání a aktivaci (Finney *et al.*, 1998; Pulè *et al.*, 2005; Milone *et al.*, 2009; Savoldo *et al.*, 2011). Podle počtu kostimulačních molekul můžeme rozlišit tři generace CAR. První generace obsahovala pouze scFv a doménu CD3ζ. Druhá vylepšená generace obsahuje navíc právě jednu kostimulační doménu a třetí generace dvě nebo více těchto domén.

### 3.2.2 Příprava CAR T lymfocytů

Proces přípravy CAR T lymfocytů (viz Obrázek č. 3) obecně zahrnuje izolaci T lymfocytů z dárce, jejich *in vitro* modifikaci, *ex vivo* expanzi, a konečné podání T lymfocytů příjemci (příjemce a dárce mohou být v některých případech jedna osoba).

T lymfocyty, do kterých je vnášen CAR, jsou získávány z periferních mononukleárních buněk (PBMC) z periferní krve. K vnášení CAR do T lymfocytů jsou nejčastěji využívány gammaretrovirové nebo lentivirové vektory, které působí stabilní integraci DNA do genomu buňky, jež je pro dlouhodobý terapeutický efekt CAR T lymfocytů žádoucí. Lentivirové vektory jsou výhodnější než gammaretrovirové, protože mají větší kódující kapacitu genomu, integrují se

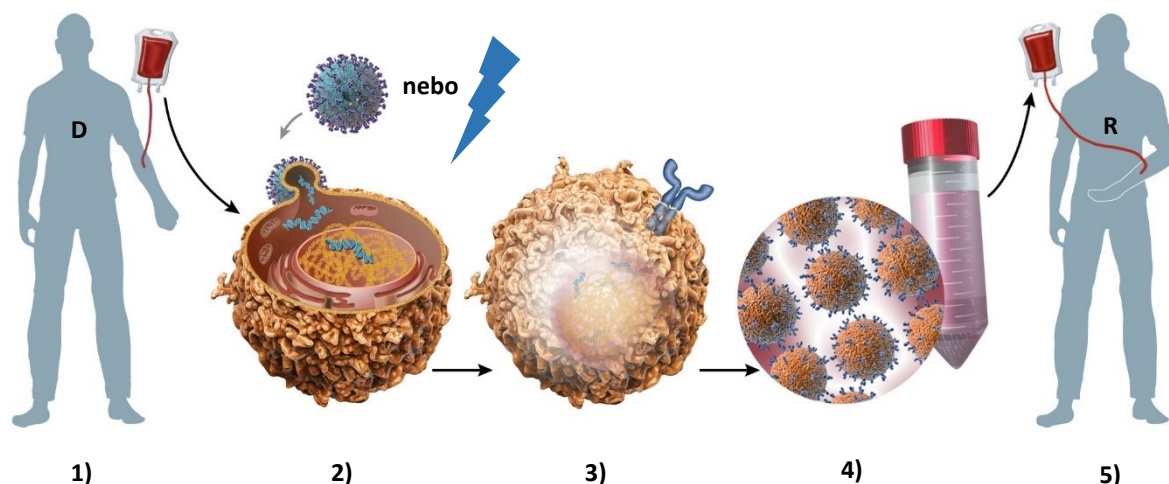
i do nedělicích se buněk a jsou méně citlivé k hostitelským restriční faktorům (Gill *et al.*, 2016).

Nově studovanou možností vnášení CAR do buněk je využití transpozonových systémů jako je piggyBac, které fungují na principu náhodné integrace genu zájmu (vloženého do transpozonu) do genomu pomocí enzymu transpozázy (Nakazawa *et al.*, 2011; Woodard & Wilson, 2015; Ptáčková *et al.*, 2018). Tyto plazmidové systémy jsou obecně považovány za bezpečnější než systémy virové, u kterých je vždy minimální riziko vzniku replikačně kompetentního viru.

CAR je do buněk možné vnést také elektroporací mRNA (Zhao *et al.*, 2006). Ta však působí jen transientní transfekci, a tedy jen krátkodobou expresi konstruktů, zatímco cílem především protinádorové terapie je dlouhodobé přetrvání modifikovaných T lymfocytů v těle pro prevenci relapsu onemocnění a trvalý imunitní dohled.

Pro expanzi CAR T lymfocytů *in vitro* se nejčastěji používá stimulace pomocí  $\alpha$ -CD3 protilátky v kombinaci s  $\alpha$ -CD28 protilátkou a dále pěstování v cytokinu IL-2 (Gill *et al.*, 2016). Může být využito také stimulace pomocí umělých antigen-prezentujících buněk (Gill *et al.*, 2016). Způsoby pěstování CAR T lymfocytů se však mezi jednotlivými výzkumnými skupinami velmi liší.

CAR T lymfocyty po expanzi jsou následně podány pacientovi infuzí. Pro efektivní a dlouhodobé působení by měly být vnášené T lymfocyty ve vhodném raném stadiu vývoje s nesenescentním fenotypem. Jako nejlepší se jeví nedávno objevené tzv. kmenové paměťové buňky (memory stem cells, T<sub>SCM</sub>). Jedná se o nejčasnější stadium ve vývoji paměťových buněk, které vykazuje vysokou proliferační kapacitu, přežití, protinádorové působení a schopnost dát vzniknout celému spektru paměťových a efektorových subpopulací T lymfocytů (Gattinoni *et al.*, 2011, 2017). Přípravu T<sub>SCM</sub> by měla zajistit expanze naivních T lymfocytů v IL-7 a IL-15 (Gattinoni *et al.*, 2017).



**Obrázek č. 3: Proces přípravy adoptivní terapie pomocí CAR T lymfocytů.**

1) Dárci (D) jsou odebrány T lymfocyty z periferní krve. 2) Do T lymfocytů je pomocí virového vektoru nebo elektroporace DNA/RNA vnesen gen pro CAR. 3) Úspěšně modifikované T lymfocyty začnou exprimovat CAR. 4) CAR T lymfocyty jsou v laboratoři expandovány. 5) Expandovaná populace CAR T lymfocytů je podána příjemci (R) krevní transfuzí.

Obrázek upraven podle: <http://www.haemalogix.com/kcfinder/upload/images/immunotherapy-virus.jpg> [31. 12. 2017]

### 3.2.3 Terapie pomocí CAR T lymfocytů

CAR modifikované T lymfocyty jsou používány především v boji s nádorovými onemocněními jako adoptivní buněčná protinádorová imunoterapie (Geyer & Brentjens, 2016). Prozatím nejúspěšnější jsou CAR v terapii hematologických malignit odvozených od B lymfocytů (Gill *et al.*, 2016). Léčba těchto onemocnění pomocí CAR je poměrně snadná, protože většina B buněčných malignit exprimuje na svém povrchu molekulu CD19, na kterou mohou CAR cílit, a pacient navíc může bez B buněk (s B buněčnou aplazií) určitou dobu přežít (Kochenderfer & Rosenberg, 2013). Modifikované T lymfocyty také v krevním/lymfatickém řečišti nemají problém s průnikem do mikroprostředí nádoru. S CAR proti CD19 (CD19-CAR) bylo provedeno nespočet úspěšných experimentálních a klinických studií (Gill *et al.*, 2016) a dva různé CD19-CAR již byly v USA schváleny pro rutinní terapeutické použití (Yescarta, Kymriah; FDA 2017a, 2017b).

CAR T lymfocyty ovšem nejsou zdaleka tak úspěšné v léčbě solidních nádorů. U solidních nádorů často nastává problém s nalezením vhodného nádorově-specifického povrchového antigenu (Gill *et al.*, 2016). Další komplikace nastávají s průnikem CAR T lymfocytů do nádorového stromatu a silně imunosupresivním mikroprostředím nádoru (Gill *et al.*, 2016).

Zajímavým přístupem k tvorbě CAR T lymfocytů je modifikace T lymfocytů specifických na některý latentní virus (např. EBV) pomocí CAR zacíleného na nádorový antigen. Vzniklé T lymfocyty s dvojitou specifitou poté přežívají v těle seropozitivních jedinců déle díky stálé stimulaci virovými antigeny (Rossig *et al.*, 2002; Savoldo *et al.*, 2007; Pule *et al.*, 2008).

Je možné také vytvořit CAR, který je specifický vůči dvěma antigenům současně, což vede v případě nádorů k lepšímu zacílení CAR a také k udržení funkce CAR T lymfocytů i v případě, že nádor potlačí expresi jednoho z antigenů (Grada *et al.*, 2013). Pro modulaci mikroprostředí nádoru mohou být využity také tzv. TRUCKs, tj. T lymfocyty modifikované CAR a nesoucí gen pro IL-12, který je pod kontrolou CAR-inducibilního promotoru (Chmielewski *et al.*, 2014).

Nežádoucím jevem spojeným s terapií pomocí CAR T lymfocytů je tzv. syndrom cytokinové bouře, kdy dochází k masivní systémové produkci zánětlivých cytokinů (IFN $\gamma$ , IL-6, TNF) (Kochenderfer *et al.*, 2012; Frey, 2017). Tento stav je spojen s horečkami, nevolnostmi, bolestmi kloubů a svalů a může vyústit v životu nebezpečnou hypotenzi a hypoxii. Syndrom je poměrně úspěšně léčitelný protilátkou proti IL-6 receptoru (tocilizumab) (Frey, 2017).

### 3.2.4 Protivirové CAR

Přestože jsou CAR nejvíce využívány v boji proti nádorům, CAR zacílené na protivirové proteiny jsou vyvíjeny stejně dlouho jako CAR protinádorové a vůbec první klinické testování CAR-modifikovaných T lymfocytů u člověka bylo provedeno s CAR proti HIV (viz dále). CAR jsou vyvíjeny především proti virům působícím dlouhodobé chronické nebo latentní infekce, které jsou běžnými metodami vyléčitelné jen obtížně anebo vůbec, a proti kterým má tedy největší význam vyvíjet finančně i metodicky náročnou buněčnou imunoterapii. Navíc je u těchto virů působících dlouhotrvající infekce na aplikaci buněčné imunoterapie časový prostor.

Doposud byly zkonstruovány CAR proti virům hepatitidy B (HBV) (Bohne *et al.*, 2008; Krebs *et al.*, 2013), hepatitidy C (HCV) (Sautto *et al.*, 2016), HCMV (viz kapitola 3.3.3), HIV (viz dále) nebo chřipky A (Talbot *et al.*, 2013). Všechny prokázaly účinnost *in vitro* na transfekovaných anebo infikovaných buňkách (stimulace T lymfocytů k produkci prozánětlivých a protivirových cytokinů, lyze cílových buněk). CAR proti HBV a chřipce byly také testovány *in vivo* na myších modelech, kde mírně potlačily replikaci viru nebo alespoň zpomalily nárůst virového titru (Krebs *et al.*, 2013; Talbot *et al.*, 2013).

Největší pozornost je věnována CAR proti HIV, mezi které patří také vůbec první vyvinuté protivirové CAR (Romeo & Seed, 1991). CAR proti HIV jsou cíleny na různé oblasti *env* komplexu obalových glykoproteinů gp120/gp41, antigen-vazebná část bývá tvořena scFv fragmentem protilátky (Roberts *et al.*, 1994; Masiero *et al.*, 2005; Ali *et al.*, 2016) nebo molekulou CD4 (Romeo & Seed, 1991; Roberts *et al.*, 1994). S CAR proti HIV využívajícím CD4 molekulu byly také provedeny první klinické studie (Walker *et al.*, 2000; Mitsuyasu *et al.*, 2000; Deeks *et al.*, 2002), které ukázaly dobrou snášenlivost a bezpečnost CAR T lymfocytů i jejich dlouhodobé přetrvání v pacientech (Scholler *et al.*, 2012), i když nebyl pozorován téměř žádný klinický efekt. Vylepšená verze CD4-CAR s kostimulačními molekulami byla vyzkoušena na myším modelu a dokázala vést k snížení množství virové RNA a naopak navýšení počtu CD4+ buněk (Leibman

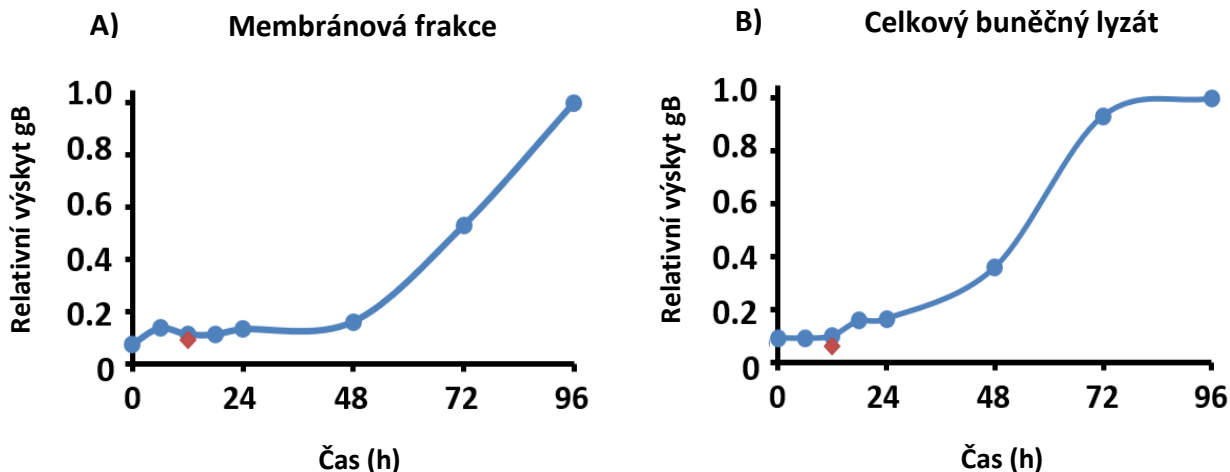
*et al.*, 2017). Nově je zkoumána také zajímavá strategie modifikace hematopoetických progenitorových buněk pomocí CD4-CAR a antivirových malých RNA molekul. Bylo prokázáno, že takto modifikované buňky v humanizované myši diferencují do T i NK progenitorových buněk, potlačují replikaci HIV a samy jsou odolné vůči infekci HIV (Zhen *et al.*, 2015).

### 3.3 Glykoprotein B (gB)

#### 3.3.1 Funkce gB a jeho výskyt v buňce

Glykoprotein B (gB, dříve nazýván také gp58, gp55/116 nebo gpUL55) se nachází v obalu viru a je společně s glykoproteinem gH/gL nezbytný pro vstup HCMV do buněk (Isaacson & Compton, 2009; Vanarsdall & Johnson, 2012). Role jednotlivých glykoproteinů byla dlouho nejasná, podle posledních studií se však zdá, že glykoprotein gH/gL nebo jeho pentamerní komplex (gH/gL/UL128/UL130/UL131) váže buněčný receptor a gB následně zprostředkovává samotnou fúzi virové a buněčné membrány (Isaacson & Compton, 2009; Wille *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2013). Tento model podporuje i silná strukturní homologie gB HCMV s fúzními glykoproteiny B příbuzných virů EBV a HSV-1 (Sharma *et al.*, 2013; Burke & Heldwein, 2015; Chandramouli *et al.*, 2015).

gB je jedním z virových proteinů, které se nacházejí na povrchu infikovaných buněk, což je zásadní požadavek na cílovou molekulu CAR. Podle proteomické studie autorů Weekes *et al.* (2014) se gB vyskytuje na povrchu buněk v malém množství od počátku infekce, přičemž toto množství začíná strmě stoupat 48 h.p.i. s tím, jak postupuje replikační cyklus HCMV, a svého maxima dosahuje 96 h.p.i. (viz Obrázek č. 4).



Obrázek č. 4: Časová křivka exprese gB v infikovaných buňkách HFFF (lidské embryonální předkožkové fibroblasty).

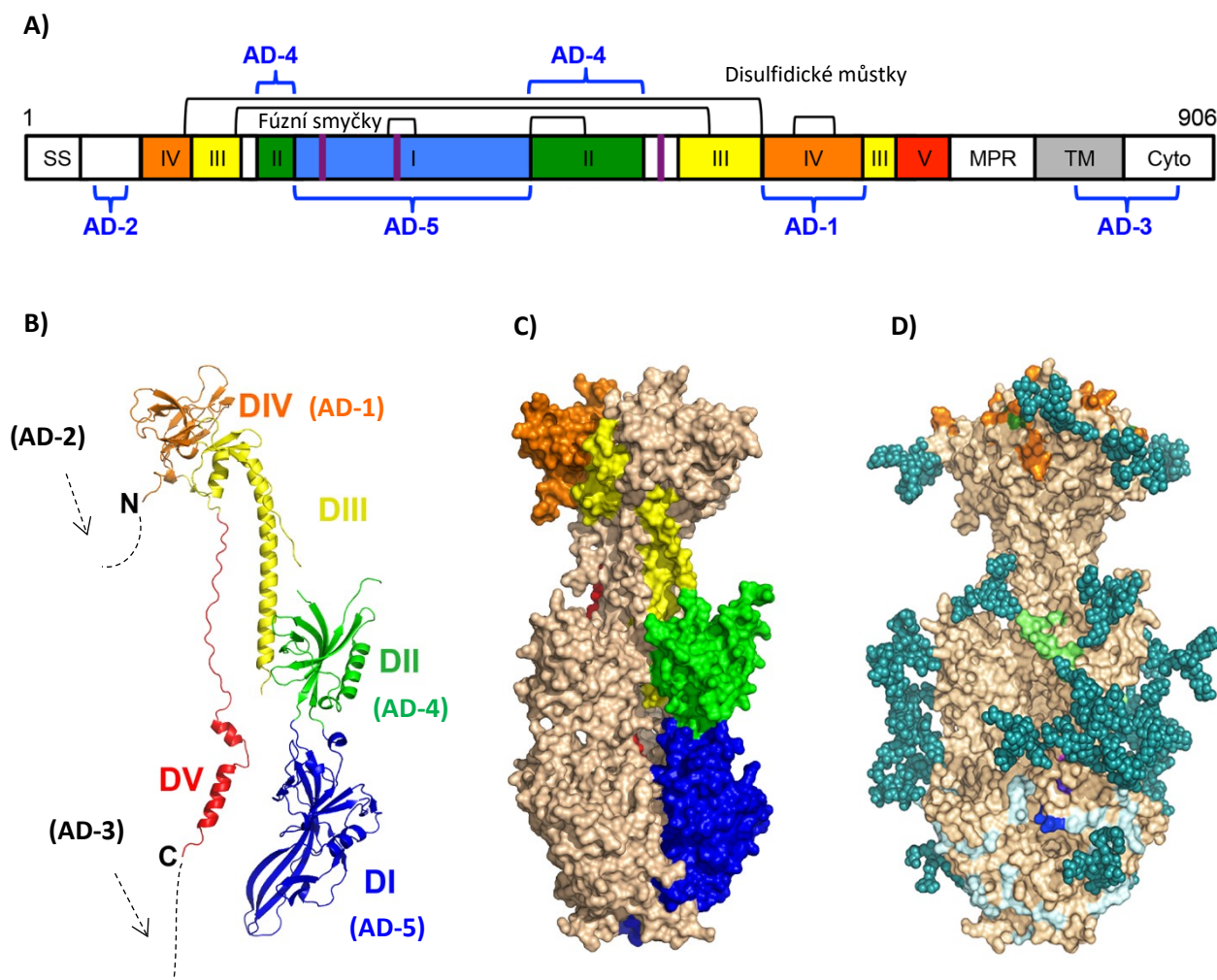
A) relativní výskyt gB na povrchu infikovaných buněk; B) relativní výskyt gB v celkovém buněčném lyzátu. Upraveno podle Weekes *et al.* (2014).

#### 3.3.2 Struktura gB a protilátky proti němu

Maturovaný gB vzniká z glykosylovaného prekurzoru o hmotnosti 150-160 kDa proteolytickým štěpením pomocí buněčné endoproteázy furinu (Vey *et al.*, 1995) a je pak složen ze dvou

molekul o přibližných molekulových hmotnostech 55 kDa a 116 kDa kovalentně spojených disulfidickými můstky (Britt, 1984; Britt & Auger, 1986).

gB je transmembránový glykoprotein s krátkou cytoplazmatickou (intravirionovou) a rozsáhlou extracelulární (extravirionovou) částí. Extracelulární část gB se skládá z pěti strukturálních domén (DI-V; viz Obrázek č. 5A a B) (Burke & Heldwein, 2015; Chandramouli *et al.*, 2015). Glykoprotein se v membránách nachází v trimerní formě (viz Obrázek č. 5C) (Sharma *et al.*, 2013).



**Obrázek č. 5: Struktura glykoproteinu B lidského cytomegaloviru.**

A) Schematické znázornění gB s vyznačenými strukturálními a antigenními doménami. Strukturální domény jsou vyznačeny barevně: DI = modrá, DII = zelená, DIII = žlutá, DIV = oranžová, DV = červená. Antigenní domény jsou naznačeny modrými závorkami, disulfidické můstky černými závorkami, fialově jsou vyznačeny fúzní smyčky. SS = signální sekvence, MPR = region blízko membrány, membrane proximal region, TM = transmembránová doména, Cyto = cytoplazmatická doména. B) Znázornění monomeru gB s vyznačenými strukturálními i antigenními doménami. Antigenní domény 2 a 3 nebyly krystalizovány a jsou naznačeny přerušovanými čarami. C) Trimer gB. D) Model glykosylace gB v savčích buňkách podle glykosylace pozorované v hmyzích buňkách Sf9. Tyrkysově jsou vyznačeny cukerné zbytky, oranžově a zeleně místa důležitá pro vazbu některých  $\alpha$ -gB protilátek. Rozlišení struktury: 3,6 Å. Upraveno podle Burke & Heldwein (2015).

gB je hlavním imunogenem HCMV a je cílem pro řadu protilátek, více než 90 % z nich však postrádá neutralizační aktivitu (Pötzsch *et al.*, 2011). Důvodem může být silná glykosylace gB (viz Obrázek č. 5D), kterou HCMV zřejmě „brání“ své neutralizační epitopy – většina neutralizačních protilátek cílí na glykosylované oblasti, proti snadno dostupným oblastem bez glykosylace vznikají majoritně protilátky bez neutralizační aktivity (Burke & Heldwein, 2015).

Glykoprotein lze rozdělit do pěti různých antigenních domén (AD-1 až AD-5), které se neshodují se strukturními doménami (viz Obrázek č. 5A a B) (Burke & Heldwein, 2015; Ohlin & Söderberg-Nauclér, 2015). Imunodominantní oblastí gB je málo glykosylovaná AD-1 (AMK 552-635), mnoho protilátek zacílených na ni je však bez neutralizační aktivity (Kniess *et al.*, 1991; Speckner *et al.*, 1999). Antigenní oblast AD-3 se nachází v cytoplazmatické doméně gB a nemůže tedy vyvolávat tvorbu neutralizačních protilátek (Ohlin & Söderberg-Nauclér, 2015). Antigenní domény AD-4 (AMK 121-132 a 344-438) a 5 (AMK 133-343) byly určeny teprve nedávno (Pötzsch *et al.*, 2011). Jsou konzervované a silně imunogenní a tvoří se proti nim převážně neutralizační protilátky (Pötzsch *et al.*, 2011).

Antigenní doména AD-2 se nachází na N-konci proteinu, který je nestrukturovaný a v krystalizovaných strukturách gB se nenachází (Burke & Heldwein, 2015; Chandramouli *et al.*, 2015). AD-2 obsahuje dvě antigenní subdomény, subdoménu I (AMK 68-77) a subdoménu II (AMK 50-54) (Meyer *et al.*, 1992). Subdoména II je mezi různými izoláty HCMV silně variabilní a tvoří se proti ní protilátky bez neutralizační aktivity (Meyer *et al.*, 1992). Naproti tomu subdoména I je vysoce konzervovaná mezi různými klinickými a laboratorními izoláty HCMV (srovnání 60 sekvencí viz suplement Burke & Heldwein, 2015) a jsou proti ní tvořeny protilátky silně neutralizační (Meyer *et al.*, 1992). Je však slabě imunogenní a protilátky proti ní byly nalezeny jen u ~50 % HCMV+ jedinců (Meyer *et al.*, 1992).

scFv AE11F (Lantto *et al.*, 2002) vybraný pro konstrukci našeho CAR byl odvozen z lidské neutralizační protilátky ITC88 (Ohlin *et al.*, 1993) obsahující těžký řetězec  $\gamma$ 1 a lehký řetězec  $\kappa$ . Tato protilátka cílí právě na konzervovanou subdoménu I antigenní domény AD-2. Konkrétní vazebný epitop se nachází mezi aminokyselinami 67-86 (Ohlin *et al.*, 1993), z čehož nejdůležitější pro vazbu protilátky jsou AMK zbytky Y72, T75, L76 a Y78 (Lantto *et al.*, 2003).

### 3.3.3 CAR proti gB HCMV

HCMV je virus specializovaný na únik před hostitelským imunitním systémem, především před odpovědí T lymfocytů. Blokuje vystavení MHC třídy I i II na povrchu a vytváří molekuly mimikující MHC, které ovšem nevystavují peptidy (Kroutilová, 2015). Vzhledem k tomu, že CAR cílí na nativní antigen nevázaný na MHC, mohlo by být jejich použití pro terapii HCMV velmi vhodné.

V roce 2010 byla publikována studie, ve které byl zkonstruován první CAR proti HCMV, konkrétně zacílený na gB (ve studii nazýván gB-cIR, tj. gB-specifický chimérický imunoreceptor) (Full *et al.*, 2010). Konstrukt byl složen z scFv fragmentu myší protilátky 27-287 cílené na imunodominantní epitop AD-1, dále z CD28 transmembránové a kostimulační domény a z CD3 $\zeta$  aktivační domény. Konstrukt byl do T lymfocytů vnášen nejprve lentivirovou transdukcí a poté elektroporací mRNA. cIR byl ve velkém množství produkován na povrchu modifikovaných T lymfocytů seronegativního dárce a stimuloval je k produkci IFN $\gamma$  a TNF $\alpha$  a k degranulaci v přítomnosti lidských předkožkových fibroblastů (HFF) infikovaných HCMV kmene Ad169. gB-cIR T lymfocyty také specificky zabíjely 293T buňky transfekované gB.

V roce 2016 však vyšla navazující studie téhož týmu se stejným konstruktem (Proff *et al.*, 2016), jejímž závěrem bylo, že HCMV-infikované buňky jsou rezistentní k lyzi gB-cIR T lymfocyty (v předchozí studii byla schopnost cytotoxicity zkoumána pouze vůči gB-transfekované buněčné linii). gB-cIR T lymfocyty sice v přítomnosti infikovaných buněk produkovaly cytokiny a degranulovaly, ale nedokázaly infikované buňky zabít. Stejný blok cytotoxicity byl ovšem pozorován i při použití HCMV-specifických T lymfocytů a kmenů HCMV deficientních na inhibitory antigenní prezentace. Proff *et al.* (2016) tedy předpokládali, že HCMV jako další mechanismus úniku před imunitní kontrolou vyvinulo faktory, které blokuje cytotoxicitu T lymfocytů. Jako tyto faktory identifikovali proteiny UL37x1 a UL36, když jimi transfekované fibroblasty odolávaly cytotoxické lyzi. Polemice s tímto článkem je věnována část kapitoly Diskuze.

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Lidské buňky

- **293T (HEK293T):** linie epiteliálních embryonálních ledvinných buněk produkující velký T antigen viru SV40 (ATCC® CRL-3216™)
- **HeLa:** linie epiteliálních buněk odvozená z adenokarcinomu děložního čípku (banka ÚHKT)
- **K562:** linie nediferencovaných buněk odvozená z chronické myeloidní leukémie (ATCC® CCL-243™)
- **Jurkat:** linie T lymfocytů odvozená z akutní T buněčné leukémie (ATCC® TIB-152™)
- **LEP:** primární linie embryonálních fibroblastů (Ústav sér a očkovacích látek Praha – banka ÚHKT)
- **zamražené mononukleární buňky z periferní krve (PBMC) HCMV seronegativních zdravých dárců** (banka ÚHKT) – BC 48, ZV 34/2
- **čerstvě připravené PBMC** (interní dárci ÚHKT) – D 56 a 58

PBMC typicky obsahují cca. 80 % lymfocytů, z čehož je asi 75 % CD3+ T lymfocytů (Kleiveland, 2015). S PBMC bylo tedy zacházeno jako s T lymfocyty a byly pěstovány tak, aby byla podpořena expanze T lymfocytů (viz dále).

#### 4.1.2 Bakteriální kmeny

- *Escherichia coli*
  - **XL-1 Blue** (Agilent) – kmen pro rutinní klonování umožňující modro-bílou selekci  
genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacIqZΔM15* Tn10 (Tetr)]
  - **Stbl3™** (Thermo Fisher Scientific) – odvozeny z kmene HB101, určené pro produkci a klonování plazmidů obsahujících přímé repetice (lentivirové vektory) – redukce frekvence homologní rekombinace  
genotyp: *F-mcrB mrrhsdS20*(r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>) *recA13 supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20*(Str<sup>R</sup>) *xyl-5 λ-leumtl-1*

### 4.1.3 Viry

- **lidský cytomegalovirus** (HCMV, HHV-5; čeleď *Herpesviridae*), kmen **Ad169** (poskytla RNDr. Kateřina Roubalová, CSc., VIDIA spol. s.r.o.) – kmen uzpůsobený pro množení na tkáňových kulturách, v genomu delece 929 bp zasahující do genů UL42 a UL43 (Dargan *et al.*, 1997)

### 4.1.4 Standardy molekulových hmotností

- **DNA**
  - MassRuler High Range DNA Ladder, ready-to-use (Thermo Fisher Scientific)
  - MassRuler Low Range DNA Ladder, ready-to-use (Thermo Fisher Scientific)
- **proteiny**
  - Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific)

Profily standardů viz Přílohy.

### 4.1.5 Plazmidové vektory

- **lentivirové vektory**
  - **pWPXLd** – vektor pro zaklonování genu zájmu obsahující gen pro GFP; při transfekcích (plazmid) a transdukcích (lentiviry) používán pro kontrolu úspěšnosti (poskytl MUDr. Pavel Otáhal, Ph.D.; Addgene plazmid #12258)
  - **pMD2.G** – vektor kódující obalový glykoprotein viru vezikulární stomatitidy (poskytl MUDr. Pavel Otáhal, Ph.D.; Addgene plasmid #12259)
  - **psPAX2** – vektor kódující polyproteiny gag a pol HIV-1 (poskytl MUDr. Pavel Otáhal, Ph.D.; Addgene plasmid #12260)
- **piggyBac transpozonový systém**
  - **pPBEF** – vektor pro zaklonování genu zájmu (poskytl MUDr. Pavel Otáhal, Ph.D.)
  - **pBASE** – vektor kódující transpozázu zajišťující integraci genu zájmu do genomu buňky (poskytl MUDr. Pavel Otáhal, Ph.D.)
- **pBK-CMV** (Stratagene) – duální prokaryotický a eukaryotický fagemidový expresní vektor
- **pUC19** (Invitrogen) – prokaryotický klonovací vektor, používán pro ověření přípravy kompetentních bakterií (Addgene plasmid #50005)
- **pMA-T- $\alpha$ -gB-scFv** (GeneArt) – vektor se syntetickou sekvencí  $\alpha$ -gB-scFv (Lantto *et al.*, 2002)
- **pUC18-CD19-CAR, pWPXLd-CD19-CAR, pPBEF-CD19-CAR** – vektory obsahující CAR proti CD19 (CD19-CAR) (poskytli Mgr. Vojtěch Šroller, PhD., a Mgr. Pavlína Ptáčková)

- **pBK-CMV-gB** – vektor obsahující gB (poskytl RNDr. Jan Musil, PhD.)

Mapy originálních vektorů viz Přílohy, mapy vytvořených konstruktů vizualizované v programu SnapGene viz kapitola Výsledky.

#### 4.1.6 Protilátky

- **nekonjugované**
  - **α-CD3**: CD3 Pure – Functional Grade, Human (Clone OKT3) (Miltenyi Biotec) – myší monoklonální IgG2aκ protilátka proti lidské molekule CD3; 100 µg/ml
  - **α-CD3ζ**: CD3-ζ Antibody (6B10.2) (Santa Cruz Biotechnology) – myší monoklonální IgG1 protilátka proti lidskému CD3ζ řetězci; 200 µg/ml
  - **α-CD28**: CD28 Pure – Functional Grade, Human (Clone 15E8) (Miltenyi Biotec) – myší monoklonální IgG1 protilátka proti lidské molekule CD28; 100 µg/ml
  - **α-CD28-BD**: CD28 (L293) Pure (BD Biosciences) – myší monoklonální IgG1κ protilátka pro lidské molekule CD28; 1 mg/ml
  - **α-CD49d**: CD49d (L25) Pure (BD Biosciences) – myší monoklonální IgG2bκ protilátka proti lidské molekule CD49d; 1 mg/ml
  - **α-FLAG-ReadyTag**: ReadyTag anti-DDDDK, clone AP1501 (BioXCell) – myší monoklonální IgG2b protilátka proti epitopu FLAG (DDDDK); 3,22 mg/ml
  - **α-FLAG-M2**: Monoclonal ANTI-FLAG® M2 antibody produced in mouse, clone M2 (Sigma-Aldrich) – myší monoklonální IgG1 protilátka proti epitopu FLAG; 5 mg/ml
  - **α-gB**: CMV gB (1-M-12) (Santa Cruz Biotechnology) – myší monoklonální IgG1 protilátka proti gB HCMV; 100 µg/ml
- **konjugované**
  - **α-CD3-APC/Cy7**: APC/Cy7 anti-human CD3 Antibody, Clone UCHT1 (BioLegend) – myší monoklonální IgG1 protilátka proti lidské molekule CD3 konjugovaná s fluorochromem APC/Cy7; 200 µg/ml
  - **α-CD3-BV786**: BD Horizon™ BV786 Mouse Anti-Human CD3, Clone UCHT1 (BD Biosciences) – myší monoklonální IgG1 protilátka proti lidské molekule CD3 konjugovaná s fluorochromem Brilliant™ Violet 786
  - **α-hu-IgG-AF488**: Goat anti-Human IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (Invitrogen) – kozí polyklonální protilátka proti těžkému a lehkému řetězci lidského IgG konjugovaná s fluorochromem Alexa Fluor® 488; 2 mg/ml
  - **α-hu-IgG-AF647**: Alexa Fluor® 647 AffiniPure Donkey Anti-Human IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch) – oslí polyklonální protilátka proti těžkému a lehkému řetězci lidského IgG konjugovaná s fluorochromem Alexa Fluor® 647; 625 µg/ml

- **α-hu-IgG-HRP**: Peroxidase AffiniPure Donkey Anti-Human IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch) – oslí polyklonální protilátka proti těžkému a lehkému řetězci lidského IgG konjugovaná s křenovou peroxidázou (HRP)
- **α-mo-AF488**: F(ab')<sub>2</sub>-Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (Invitrogen) – kozí polyklonální F(ab')<sub>2</sub> fragment proti těžkému a lehkému řetězci myšního IgG konjugovaný s fluorochromem Alexa Fluor® 488; 2 mg/ml
- **α-mo-AF647**: Alexa Fluor® 647 AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> Fragment Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch) – kozí polyklonální F(ab')<sub>2</sub> fragment proti těžkému a lehkému řetězci myšního IgG konjugovaný s fluorochromem Alexa Fluor® 647
- **α-mo-HRP**: Amersham ECL™ anti-mouse IgG, HRP-linked whole antibody (from sheep) (GE Healthcare) – ovčí protilátka proti myšímu IgG konjugovaná s HRP
- **Anti-Hu Kappa** Light Chains, PE, TB28-2 (Exbio) – myšší monoklonální IgG1 protilátka proti kappa řetězcům lidských imunoglobulinů konjugovaná s fluorochromem PE

#### 4.1.7 Antibiotika

- **pro selekci bakterií**
  - ampicilin – koncentrace v médiu 50 µg/ml (Ampicilin 0,5 Biotika)
  - kanamycin – koncentrace v médiu 30 µg/ml (kanamycin sulfát; USB Corporation)
- **do kultivačních médií pro lidské buňky**
  - směs L-glutaminu, penicilinu a streptomycinu (dále v textu uváděna jako ATB) – do médií ředěna 100×, tj. koncentrace v médiu 100 µg/ml streptomycinu, 100 U/ml penicilinu a 292,28 µg/ml L-glutaminu (2mM) [L-glutamine (200mM) with Pen/Strep (100×); PAA – The Cell Culture Company]
  - gentamicin – koncentrace v médiu 18 µg/ml (Gentamicin solution, 10 mg/ml, BioReagent; Sigma-Aldrich)

#### 4.1.8 Cytokiny

- lidský IL-2 (Proleukin®, human recombinant IL-2; 10<sup>6</sup> U/ml; Novartis)
- lidský IL-4 (Human IL-4, research grade; 100 µg/ml; Miltenyi Biotec)
- lidský IL-7 (Human IL-7, premium grade; 100 µg/ml; Miltenyi Biotec)

## 4.1.9 Kultivační média

### 4.1.9.1 Pro lidské buňky

- **CellGro® GMP Dendritic Cell (DC) Medium** (CellGenix)
  - médium bylo používáno s 10 % (v/v) fetálního bovinního séra (FBS) a 1 % (v/v) ATB
- **DMEM High Glucose w/L-Glutamine w/Sodium pyruvate** (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Biosera)
  - médium bylo používáno v čisté formě, dále s 10 % (v/v) FBS nebo s 10 % (v/v) FBS a 1 % (v/v) ATB
- **MEM** (Minimum Essential Medium)
  - složení: 10 % (v/v) MEM 10×, no glutamine, Earle's Salts (Gibco); 10 % (v/v) FBS; 1 % (v/v) MEM Vitamins (100×); 2 mg/ml NaHCO<sub>3</sub> a 1 % (v/v) ATB v ddH<sub>2</sub>O
- **Opti-MEM™ I (1×) Reduced Serum Medium, no phenol red** (Gibco)
- **RPMI** (Roswell Park Memorial Institute Medium)
  - složení: 10 % (v/v) RPMI-1640 Medium, 10×, without L-glutamine, folic acid and sodium bicarbonate (Sigma-Aldrich); 10 % (v/v) FBS; 0,33 % (v/v) merkaptoetanolu; 1 µg/ml folátu; 20 mM HEPES; 2 mg/ml NaHCO<sub>3</sub>; 1 % (v/v) ATB v ddH<sub>2</sub>O
- **médium CTL**
  - složení: 50 % (v/v) RPMI-1640; 45 % (v/v) Click's Medium, With sodium bicarbonate, without mercaptoethanol and L-glutamine (Sigma-Aldrich); 5 % (v/v) lidského AB séra; 0,45 % (v/v) ATB; 2,7 mM glutaminu; 18 µg/ml gentamicinu v ddH<sub>2</sub>O

Média CellGro, RPMI a CTL byla dále používána pro kultivaci T lymfocytů s cytokiny:

- IL-2 (koncentrace v médiu 1000-2000 U/ml)
- IL-4 (koncentrace v médiu 16,67 ng/ml) a IL-7 (koncentrace v médiu 10 ng/ml)

V popisech metod jsou používány pouze zkratky médií CellGro, DMEM, MEM, RPMI nebo pojem médium, které označují médium s obsahem 10 % (v/v) FBS a 1 % (v/v) ATB. Pokud bylo médium bez séra a/nebo ATB, je tato skutečnost uvedena. Médium OptiMEM bylo vždy používáno jen v čisté formě a médium CTL v uvedeném složení.

#### 4.1.9.2 Pro bakterie

- **médium LB (Luria-Bertani)**
  - tekuté: 2 % (w/v) LB Broth (USB Corporation) v ddH<sub>2</sub>O → sterilizace v autoklávu
  - s agarem: 1,5 % (w/v) bakteriologického agaru v LB médiu → sterilizace v autoklávu, dále uchováváno v tuhém stavu ve skleněných lahvích při pokojové teplotě a v případě potřeby rozehráno v mikrovlnné troubě a nalito na Petriho misky
- **médium SOC (Super Optimal Broth with Catabolite Repression)**
  - 2 % (w/v) tryptonu; 0,5 % (w/v) extraktu z kvasinek; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; pH 7,0 v ddH<sub>2</sub>O → sterilizace v autoklávu → před použitím přidání sterilních (autokláv) 10 mM MgCl<sub>2</sub> a sterilních (0,22μm filtr) 20 mM glukózy

#### 4.1.10 Enzymy

- **restrikční enzymy a pufry (New England Biolabs = NEB)**
  - BamHI-HF (20 000 U/ml)
  - EcoRI (20 000 U/ml)
  - EcoRI-High Fidelity (20 000 U/ml)
  - HindIII (20 000 U/ml)
  - MluI (10 000 U/ml)
  - SpeI (10 000 U/ml)
  - XbaI (20 000 U/ml)
  - XhoI (20 000 U/ml)
  - CutSmart® Buffer (10×), NEBuffer 2 (10×), NEBuffer 3 (10×), NEBuffer 4 (10×), NEBuffer for EcoRI (10×)
- **RNase A** (7000 U/ml, 100 mg/ml) (QIAGEN)
- **Shrimp Alkaline Phosphatase** (1 U/μl) + Shrimp Alkaline Phosphatase 10× Buffer (Promega)
- **T4 DNA Ligase** (400 000 U/ml) + 10× T4 DNA Ligase Buffer (NEB)
- **Trypsine solution from porcine pancreas 10×, BioReagent** (Sigma-Aldrich)

#### 4.1.11 Často používané roztoky

- **10× PBS:** 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,2-7,4 v ddH<sub>2</sub>O → sterilizace v autoklávu; pracovní koncentrace 1× → 10× ředěno ddH<sub>2</sub>O  
V textu je používána pouze zkratka PBS, kterou je myšleno 1× PBS.
- **50× pufr Tris-acetát-EDTA (TAE):** 2 M Tris; 1 M kyseliny octové; 50 mM EDTA v dH<sub>2</sub>O; pracovní koncentrace 1× → 50× ředěno dH<sub>2</sub>O

- **10× pufr Tris-EDTA (TE):** 100 mM Tris; 10 mM EDTA; pH 8,0 v ddH<sub>2</sub>O → sterilizace v autoklávu; pracovní koncentrace 1× → 10× ředěno ddH<sub>2</sub>O
- **roztok trypsin-EDTA**
  - 0,05 % (w/v) trypsinu; 0,5 mM EDTA v PBS

#### 4.1.12 Pufry pro nanášení DNA a proteinových vzorků na gel

- **MassRuler DNA Loading Dye (6×)** (Thermo Fisher Scientific)
- **Laemliho pufr** pro SDS-PAGE [60 mM Tris-HCl o pH 6,8; 25 % (v/v) glycerolu; 2 % (w/v) SDS; 5 % (v/v) merkaptoetanolu; 0,1 % (w/v) bromfenolové modři v dH<sub>2</sub>O].

#### 4.1.13 Komerční soupravy a reagensie

- **GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain 10,000× in water** (Biotium) – fluorescenční barvivo pro vizualizaci DNA na elektroforéze
- **Human IFN-γ DuoSet® ELISA** (R&D Systems) – ELISA pro detekci lidského IFN<sub>γ</sub>
- **LIVE/DEAD™ Fixable Blue Dead Cell Stain Kit** (Invitrogen) – fluorescenční barvivo pro detekci mrtvých buněk na průtokovém cytometru; v textu označováno jako L&D
- **Metafectene®** (Biontex) – transfekční činidlo pro savčí buňky založené na liposomech
- **Mix & Go! E. coli Transformation Kit** (Zymo Research) – příprava kompetentních bakterií
- **Neon™ Transfection System 100/10 μL Kit** (Invitrogen) – souprava roztoků, špiček a kyvet k elektroporátoru Neon®
- **PepMix™ HAdV-3 (hexon protein)** (JPT Peptide Technologies) – mix peptidů z hexonového proteinu lidského adenoviru sérotypu 3
- **Pierce® ECL Plus Western Blotting Substrate** (Thermo Scientific) – substrát pro vyvolání Western blotu pomocí křenové peroxidázy
- **QIAfilter Plasmid Midi/Maxi Kit** (QIAGEN) – izolace plazmidu z bakteriální kultury
- **QIAquick Gel Extraction Kit** (QIAGEN) – izolace DNA fragmentu z agarózového gelu

#### 4.1.14 Chemikálie

- agar bakteriologický: Agar-Agar, bacteriological (Carl Roth)
- agaróza: SeaKem® GTG® Agarose (Lonza)
- akrylamid (Merck)
- APS, peroxidisíran amonný: ammoniumpersulfat (Serva)
- BD FACS™ Clean Solution (BD Biosciences)
- BD FACS™ Rinse Solution (BD Biosciences)
- bisakrylamid: N,N'-metylenbisakrylamid (Serva)

- bromfenolová modř (Serva)
- BSA, bovinní sérový albumin: Albumin, bovine (BSA; Sigma-Aldrich)
- butanol: n-butylalkohol (Lachema)
- CaCl<sub>2</sub>: chlorid vápennatý krystalický (dihydrát) (Lachema)
- CH<sub>3</sub>COOH: kyselina octová 99,8% (Lach-Ner)
- CH<sub>3</sub>COOK: octan draselný (Lach-Ner)
- citronan sodný: citronan sodný dihydrát (Lach-Ner)
- dH<sub>2</sub>O: demineralizovaná voda
- ddH<sub>2</sub>O: destilovaná voda sterilizovaná v autoklávu (pro přípravu sterilních roztoků a médií)
- dimethylformamid: N,N-dimethylformamid (Fluka)
- DMSO, dimethylsulfoxid: Dimethyl sulfoxide Hybri-Max™ (DMSO, Sigma-Aldrich)
- EDTA, chetalon 3 dihydrát (Lachema)
- eosin: Eosin rozpustný ve vodě, eosin žlutavý (Lachema)
- etanol: ethylalkohol 96% (Lach-Ner)
- extrakt z kvasinek: Yeast extract (Difco Laboratories)
- FBS, fetální bovinní sérum: Fetal Bovine Serum, Heat Inactivated (Sigma-Aldrich)
- Ficoll (GE Healthcare)
- folát: Folic acid, meets USP testing specifications (Sigma-Aldrich)
- glukóza: D-glukosa monohydrát (Lachema)
- glutamin: L-Glutamine solution, 200 mM, Hybri-Max™ (Sigma-Aldrich)
- glycerol: Glycerol, SigmaUltra (Sigma-Aldrich)
- glycin (Serva)
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peroxid vodíku farmaceutický (Chemické závody Sokolov)
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: kyselina sírová (Lachema)
- HCl: kyselina chlorovodíková (Lachema)
- HEPES pufr: HEPES solution, 1 M, pH 7,0-7,6 (Sigma-Aldrich)
- isopropanol: isopropylalkohol (Lach-Ner)
- KCl: chlorid draselný (Lachema)
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: dihydrogenfosforečnan draselný (Lachema)
- lidské AB sérum: Human Serum from human male AB plasma, USA origin (Sigma-Aldrich)
- MgCl<sub>2</sub>: Magnesium chloride hexahydrate, SigmaUltra (Sigma-Aldrich)
- MEM Vitamins (100x) (PAA)
- merkaptoetanol: 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich)

- metanol: methanol (Lach-Ner)
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: hydrogenfosforečnan disodný dihydrát (Sigma-Aldrich)
- NaCl: chlorid sodný (PENTA)
- NaHCO<sub>3</sub>: Sodium Bicarbonate (7,5%) solution + 75,0 g/l NaHCO<sub>3</sub> (HyClone)
- NaN<sub>3</sub>: Sodium azide BioXtra (Sigma-Aldrich)
- NaOH: hydroxid sodný (Dr. Kulich Pharma)
- polybren: Polybrene® (Santa Cruz Biotechnology)
- SDS, dodecylsírán sodný: sodium dodecyl sulfate (Sigma-Aldrich)
- sušené odtučněné mléko (Laktino)
- TEMED (Serva)
- tetramethylbenzidin: 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine tablets (Sigma-Aldrich)
- Tris: Trizma® base (Sigma-Aldrich)
- trypton: Tryptone (Sigma-Aldrich)
- Tween® 20 (Sigma-Aldrich)

#### 4.1.15 Použité přístroje

- **BD LSRFortessa™** (BD Biosciences) – průtokový cytometr s 5 lasery (UV 355 nm, fialový 405 nm, modrý 488 nm, žlutozelený 561 nm, červený 640 nm), konfigurace viz Přílohy
- **Bio-Rad Gene Pulser® II** (Bio-Rad) – elektroporátor
- **ELx808 Ultra Microplate Reader** (BioTek Instruments) – spektrofotometr pro analýzu ELISA destiček
- **Heraeus Megafuge 16R** (Thermo Scientific) – větší stolní centrifuga s chlazením a výměnnými rotory
- **Kodak Medical X-Ray Processor 102** (Kodak) – přístroj pro vyvolání fotografických filmů
- **MiniSpin® Plus** (Eppendorf) – malá stolní centrifuga bez chlazení
- **NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer** (NanoDrop Technologies) – spektrofotometr pro vzorky o objemu 1 µl
- **Neon® Transfection System** (Invitrogen) – elektroporátor pro savčí buňky
- **Nikon Eclipse TS100** (Nikon) – fluorescenční mikroskop s kamerou **Olympus DP70** (Olympus)
- **PHM 83 Autocal pH Meter** (Radiometer Copenhagen) – pH metr
- **Spekol 11** (Carl Zeiss Jena) – spektrofotometr

- **Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell** (Bio-Rad) – přístroj pro polosuchý přenos proteinů z polyakrylamidového gelu na membránu
- **UV transilluminator** (UVP) – UV transiluminátor
- **UVP EC3 Imaging System W/Biochemi HR Camera** (UVP) – transiluminátor pro různé vlnové délky s kamerou pro vizualizaci a fotografování agarózových a akrylamidových gelů
- **Vi-CELL™ XR Cell Viability Analyzer** (Beckman Coulter) – přístroj pro počítání buněk a analýzu jejich viability

#### 4.1.16 Software

- **BD FACSDiva Software v8.0.1** (BD Biosciences) – software k průtokovému cytometru BD LSRFortessa™
- **Clone Manager 6** (Sci-Ed Software) – software pro *in silico* klonování
- **DP Controller 1.2.1.108** (Olympus) – software pro ovládání kamery Olympus DP70 u mikroskopu Nikon Eclipse TS100
- **FlowJo 10.4** (FlowJo) – software pro analýzu cytometrických dat
- **GraphPad Prism 5** (GraphPad Software) – software pro tvorbu grafů a statistické vyhodnocení dat
- **KC4 – Kineticalc for Windows, 2.7** (BioTek Instruments) – software k přístroji ELx808 Ultra Microplate Reader
- **Microsoft Excel 2016** (Microsoft) – tabulkový software pro tvorbu grafů
- **NanoDrop 3.0.1** (NanoDrop Technologies) – software k spektrofotometru NanoDrop® ND-1000
- **SnapGene® 4.1** (GSL Biotech) – software pro *in silico* klonování
- **Vi-CELL XR 2.03** (Beckman Coulter) – software k přístroji Vi-CELL™ XR na počítání buněk
- **VisionWorks™LS 8.2** (UVP) – software k přístroji UVP EC3 Imaging System

## 4.2 Metody

### 4.2.1 Sterilizace a likvidace infekčního odpadu

Sterilizace roztoků, plastiku a skla byla prováděna ústavními laboranty v autoklávu při teplotě 121 °C a tlaku 215 kPa po dobu 30 min. Roztoky, které nemohly být sterilizovány v autoklávu, byly filtrovány přes 0,22µm filtr.

Infekční odpad byl autoklávován za stejných podmínek, s roztoky bylo poté zacházeno jako s neinfekčním odpadem a suchý odpad byl odvezen do spalovny.

## 4.2.2 Práce s lidskými tkáňovými kulturami

Veškerá sterilní práce s kulturami byla prováděna v laminárním boxu.

### 4.2.2.1 Rozmražení lidských buněk

Buněčné linie nebo PBMC zamražené v tekutém dusíku (-196 °C) byly rozmrazeny ve vodní lázni o teplotě 37 °C (1-2 min). Buňky byly přeneseny pipetou do 15ml plastové zkumavky a bylo k nim přidáno 5 ml příslušného média (viz dále) vytemperovaného na 37 °C. Buňky byly centrifugovány 5 min při 300 g (buněčné linie) nebo 600 g (PBMC) a 21 °C. Supernatant byl odsát a pelet resuspendován v 5 ml čerstvého média. Suspenze byla přenesena do kultivační lahve (25 cm<sup>2</sup>), která byla poté umístěna do CO<sub>2</sub> inkubátoru s 5% atmosférou a teplotou 37 °C (dále používán pouze pojem CO<sub>2</sub> inkubátor).

### 4.2.2.2 Pasážování lidských buněk

Lidské buněčné kultury byly pěstovány v kultivačních lahvích s plochou dna 25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup>, 150 cm<sup>2</sup> nebo 300 cm<sup>2</sup> v CO<sub>2</sub> inkubátoru. Pasážování buněk bylo prováděno po 3-7 dnech podle konfluentnosti/hustoty kultury. Příslušná média a pasážovací poměry jsou uvedeny v Tabulce č. 1.

**Tabulka č. 1: Pasážování lidských buněk**

Buněčná kultura	Médium	Poměr pasážování
293T	DMEM	1:4
HeLa	DMEM	1:9
K562	RPMI	1:4 – 1:9
Jurkat	RPMI	1:9
LEP	MEM	1:1
PBMC → T lymfocyty	RPMI / CellGro / CTL + přídavek IL-2 nebo IL-4 a IL-7 dle prováděného pokusu	k buňkám přidáno příslušné množství média pro udržení koncentrace v rozmezí 1-2× 10 <sup>6</sup> buněk na ml (b/ml)

U adherentních buněk 293T, HeLa a LEP bylo při pasážování nejprve odsáto médium z kultivační lahve. Buňky byly dvakrát opláchnuty roztokem trypsin-EDTA (1 ml / 25 cm<sup>2</sup>, 2 ml / 75 cm<sup>2</sup>, 3 ml / 150 cm<sup>2</sup>, 4 ml / 300 cm<sup>2</sup>), který byl po každém oplachu odsát. Buňky byly následně umístěny do CO<sub>2</sub> inkubátoru na 1-5 min, dokud se neuvolnily ze dna kultivační lahve. Po uvolnění buněk byly zbytky roztoku trypsin-EDTA inhibovány přidáním média (5 ml / 25 cm<sup>2</sup>, 10 ml / 75 cm<sup>2</sup>, 150 cm<sup>2</sup>, 300 cm<sup>2</sup>). Buněčná suspenze byla následně resuspendována

a v kultivační nádobě byla ponechána část odpovídající pasážovacímu poměru. Nakonec bylo k buňkám přidáno čerstvé médium do celkového objemu 5 ml (25 cm<sup>2</sup>), 10 ml (75 cm<sup>2</sup>), 20 ml (150 cm<sup>2</sup>) nebo 40 ml (300 cm<sup>2</sup>).

Suspenzní buňky K562 a Jurkat byly při pasážování přímo resuspendovány ve zbytkovém médiu. V kultivační nádobě byla ponechána část suspenze odpovídající pasážovacímu poměru a k buňkám bylo přidáno čerstvé médium do celkového objemu 5 ml (25 cm<sup>2</sup>) nebo 10 ml (75 cm<sup>2</sup>).

PBMC byly po rozmražení umístěny do CO<sub>2</sub> inkubátoru v médiu RPMI (+ případně s přidanými interleukiny nebo stimulačními protilátkami, viz dále dle experimentu) a druhý nebo třetí den transdukovány/elektroporovány. Dále byly pěstovány tak, aby byla podpořena expanze T lymfocytů, a to podle typu experimentu v médiu RPMI, CellGro nebo CTL s přidavkem IL-2 nebo IL-4 a IL-7 a případně i stimulačními protilátkami. T lymfocyty byly udržovány v rozmezí koncentrací 1-2× 10<sup>6</sup> buněk na ml (b/ml) a při dlouhodobém pěstování byly expandovány do množství dostačujícího pro provedení veškerých analýz.

#### 4.2.2.3 Zamražení buněčných linií

Buňky rostoucí na kultivační lahvi byly spočítány v Bürkerově komůrce nebo na přístroji Vi-CELL™ XR (viz dále). Příslušné množství buněk bylo centrifugováno 5 min při 300/600 g a 4 °C. Pelet byl resuspendován v zamrazovacím médiu v koncentraci uvedené v Tabulce č. 2 a suspenze byla rozdělena do zamrazovacích zkumavek v množství 1 ml na zkumavku. Zkumavky byly následně umístěny přes noc do zamrazovacího stojánku s isopropanolem na -70 °C. Druhý den byly přesunuty do tekutého dusíku.

**Tabulka č. 2: Zamrazování lidských buněk**

Buněčná linie	Počet buněk zamrazovaných do jedné zkumavky (v 1 ml)	Zamrazovací médium
293T HeLa	1-2× 10 <sup>6</sup>	10 % (v/v) FBS; 7,5 % (v/v) dimethylsulfoxidu (DMSO); 2 mg/ml NaHCO <sub>3</sub> v DMEM
K562 Jurkat	1-2× 10 <sup>6</sup>	10 % (v/v) zásobního média RPMI-1640; 10 % (v/v) FBS; 7,5 % (v/v) DMSO; 2 mg/ml NaHCO <sub>3</sub> v ddH <sub>2</sub> O
PBMC (T lymfocyty)	20× 10 <sup>6</sup>	10 % (v/v) DMSO v FBS

#### 4.2.2.4 Počítání buněk v Bürkerově komůrce

Buněčná suspenze byla v mikrozkušavce 3× naředěna eosinem (20 µl suspenze + 40 µl eosinu). Do připravené Bürkerovy komůrky byla pipetována naředěná suspenze tak, aby byla komůrka zcela zaplněna (~15 µl). Pod mikroskopem byl poté spočítán počet živých neobarvených buněk na šesti čtvercích rámovaných dvojitou čarou a tento počet byl zprůměrován. Počet b/ml byl spočítán podle vzorce: *průměrný počet buněk na střední čtverec* × 3 × 10<sup>4</sup> = počet b/ml.

#### 4.2.2.5 Počítání T lymfocytů na přístroji Vi-CELL™ XR

Vi-CELL™ XR (Beckman Coulter) je přístroj určený k počítání buněk a zjišťování jejich viability. Přístroj se skládá z otočného podavače vzorků (1), pumpy, která nasává vzorek (2), komůrky, ve které je prováděno míchání vzorku (3), a CCD kamery snímající obraz (viz Obrázek č. 6). Příslušenstvím k přístroji jsou plastové zkumavky o objemu 1 ml, do kterých se připraví vzorky, a sada čtyř roztoků, mezi kterými je trypanová modř (Trypan Blue), čisticí prostředek (Cleaning Agent), pufr (Buffer Solution) a dezinfekce (Disinfectant). Přístroj se ovládá pomocí softwaru Vi-CELL XR.

Po vložení vzorků do otočného podavače a výběru příslušného počítacího cyklu vše probíhá automaticky – přístroj nasaje vzorek, promíchá jej s trypanovou modří a zahájí počítání. Přístroj snímá buňky procházející optickým polem CCD kamerou, uživatel může snímky kontrolovat na obrazovce počítače. Hlavním výstupem je poté procento živých buněk a počet b/ml.

U PBMC (T lymfocytů) nebo buněk K562 byl počítán vždy 1 ml neředěné buněčné suspenze nebo suspenze 10× ředěné sterilním PBS pomocí počítacího cyklu pro T lymfocyty. Ostatní typy buněk byly počítány v Bürkerově komůrce.



**Obrázek č. 6: Přístroj Vi-CELL™ XR Cell Viability Analyzer (Beckman Coulter).**

Obrázek upraven podle: <http://bcevietnam.com.vn/wp-content/uploads/2016/12/1242637.jpg> [26. 7. 2017]

## 4.2.3 Práce s bakteriemi

### 4.2.3.1 Kultivace bakterií

Bakterie byly kultivovány v tekutém médiu LB nebo na agarových plotnách s médiem LB, a to vždy s příslušným selekčním antibiotikem ampicilinem nebo kanamycinem.

V případě kultivace v tekutém médiu LB pro izolaci plazmidů byly bakterie vyočkovány z konzervy nebo z kolonie na misce a kultivovány přes noc v rotačním inkubátoru při 195 RPM a 37 °C. Druhý den byly zpracovány.

Kultivace na agarových plotnách s médiem LB probíhala přes noc v bakteriálním inkubátoru při 37 °C, kdy byly plotny obráceny dnem vzhůru. Druhý den byly plotny zpracovány.

### 4.2.3.2 Příprava bakteriálních konzerv

Do 2ml mikrozkušavky bylo pipetováno 250 µl ddH<sub>2</sub>O, 250 µl sterilního glycerolu a 500 µl bakteriální kultury rostoucí přes noc (tj. koncentrace glycerolu v konzervách = 25 %). Fáze byly promíchány převrácením mikrozkušavky, která byla ihned zamrazena na -70 °C, kde byly uchovávány veškeré bakteriální konzervy.

### 4.2.3.3 Příprava a kontrola kompetentních bakterií

Kompetentní bakterie byly připravovány pomocí soupravy *Mix & Go! E. coli* Transformation Kit (Zymo Research) dle protokolu výrobce.

Ze zamražených kompetentních bakterií bylo 50 µl vyočkováno do 1 ml LB. Bakterie byly kultivovány v rotačním inkubátoru při 195 RPM a 37 °C. Po 7-8 h bylo z rostoucí bakteriální kultury zaočkováno 500 µl do 50 ml média ZymoBroth™, ve kterém byly bakterie dále kultivovány při 195 RPM a 22 °C. Po 10-11 h byla zkontrolována optická denzita (OD) při 560 nm a bakterie byly ponechány v inkubátoru, dokud OD<sub>560nm</sub> nedosáhla rozmezí 0,4–0,5 (zpravidla po dalších 1-3 h). Kultura byla následně přenesena na led a po 10min inkubaci centrifugována 10 min při 2000 g a 4 °C. Supernatant byl odstraněn a peletované bakterie byly opatrně resuspendovány na ledu v 5 ml vychlazeného 1× roztoku WB (Wash Buffer). Poté byly bakterie opět centrifugovány za stejných podmínek. Supernatant byl zcela odstraněn a buňky byly opatrně resuspendovány na ledu v 5 ml vychlazeného 1× roztoku CB (Competent Buffer). Suspenze bakterií byla poté na ledu rozdělena do sterilních mikrozkušavek po 100 µl a 200 µl a bakterie byly ihned zamrazeny na -70 °C pro pozdější použití.

Pro kontrolu kompetentnosti připravených bakterií bylo 50 µl bakterií transformováno 10 pg plazmidu pUC19 (Invitrogen) dle postupu popsáno dále (viz kapitola 4.2.3.4) s tím rozdílem, že po teplotním šoku bylo k bakteriím přidáno pouze 250 µl SOC média (tj. bakterie byly 6× naředěny). Bakterie byly poté vysety na agarové plotny s ampicilinem po 50 µl

v ředěních 1×, 10× a 100×. Podle počtu kolonií vyrostlých do druhého dne byla vypočítána transformační účinnost v jednotkách CFU (colony forming units) na 1 µg DNA. Dobrá transformační účinnost se pohybuje okolo 10<sup>8</sup> CFU/µg.

#### **4.2.3.4 Transformace bakterií teplotním šokem**

100 µl zamražených kompetentních bakterií bylo umístěno na led. Po rozmražení byly bakterie rozděleny po 50 µl do dvou mikrozkušavek. Do jedné mikrozkušavky byly přidány 1-2 µl DNA (plazmid nebo ligační směs), do druhé 1-2 µl ddH<sub>2</sub>O nebo kontrolní ligační směsi (negativní kontrola). Bakterie byly inkubovány 30 min na ledu. Následně byl proveden teplotní šok umístěním bakterií do termobloku o teplotě 42 °C na 40 s. Poté byly bakterie ihned uloženy zpět na led a po 2 min bylo do každé mikrozkušavky přidáno 450 µl SOC média. Bakterie byly kultivovány 60-90 min v rotačním inkubátoru při 195 RPM a 37 °C a poté vysety ve 3 různých objemech (zpravidla po 20 µl, 40 µl a 60 µl) na agarové plotny s příslušným selekčním antibiotikem. Plotny byly inkubovány přes noc v bakteriálním inkubátoru při 37 °C. Druhý den ráno bylo zkontrolováno, zda jsou kontrolní misky čisté, a příslušné kolonie z experimentálních misek byly vyočkovány do média LB se selekčním antibiotikem.

### **4.2.4 Klonování a práce s DNA**

#### **4.2.4.1 Restrikční štěpení plazmidů**

Plazmidová DNA byla štěpena enzymy od firmy NEB (viz kapitola 4.1.10) zpravidla 60-90 min v termobloku při teplotě příslušející danému enzymu (obvykle 37 °C). Štěpicí směs obsahovala 10× ředěný pufr dle enzymu, DNA, restrikční enzym/y (obvykle 5-20 U enzymu na reakci) a ddH<sub>2</sub>O na doplnění do požadovaného objemu (20 µl pro běžné ověřovací restrikce, 50 µl pro štěpení většího množství DNA na izolaci z gelu).

#### **4.2.4.2 Defosforylace plazmidu**

K defosforylaci kompatibilních konců plazmidu po jednoenzymovém štěpení byla použita fosfatáza Shrimp Alkaline Phosphatase (Promega) v množství 1 U na 1 µg DNA. Před defosforylací byla většinou provedena inaktivace restrikčního enzymu inkubací reakční směsi 20 min při 65 °C nebo 80 °C (dle enzymu). Samotná defosforylace byla prováděna 30 min při 37 °C v 10× zředěném pufru pro SAP nebo byl enzym přidán přímo do štěpicí směsi. Následně byla fosfatáza inaktivována inkubací reakční směsi 15 min při 65 °C či přidáním nanášecího pufru na DNA elektroforézu.

#### **4.2.4.3 Izolace DNA fragmentů z gelu**

Pro izolaci z gelu bylo štěpeno 2-10 µg plazmidové DNA po dobu 90 min při 37 °C. Pokud bylo třeba, byla následně provedena defosforylace. Na agarózový gel o příslušné hustotě byla nanášena veškerá štěpicí směs do jamky o příslušné velikosti (1 mm šířky na 0,2 µg DNA). Na gel byl dále nanášen standard molekulové hmotnosti a pro kontrolu paralelně štěpené 10× zředěné plazmidy. Po dokončení elektroforézy byl gel přenesen na UV transiluminátor (UVP) a potřebný DNA fragment byl rychle vyříznut skalpelem pod UV světlem, aby nedošlo k poškození DNA. Vyříznutý fragment byl přenesen do mikrozkušavky a zvážen.

K izolaci DNA byla použita komerční souprava QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN), postupováno bylo dle návodu výrobce s drobnými odchylkami. K fragmentu gelu byl přidán roztok QG (Buffer QG) v objemu odpovídajícím trojnásobku hmotnosti gelu (1 mg gelu = 1 µl roztoku). Gel byl následně inkubován v termobloku při teplotě 50 °C a občas promíchán na minitřepačce vortex do doby, než se rozpustil (10-15 min). Ke vzorku byl následně přidán isopropanol v objemu odpovídajícím původní hmotnosti gelu a vzorek byl promíchán. Do sběrné mikrozkušavky byla připravena kolonka (QIAquick Spin Column). Na kolonku byl postupně po 750 µl nanášen vzorek, následně byl vždy centrifugován na stolní minicentrifuze (14100 g, 1 min, RT; stejně u všech centrifugací) a po projití přes kolonku odstraněn. Po přefiltrování celého objemu vzorku bylo na kolonku nanášeno 500 µl roztoku QG a kolonka byla centrifugována. Proteklý roztok byl odstraněn, na kolonku bylo nanášeno 750 µl roztoku PE (Buffer PE) a kolonka byla ponechána na stole 3 min. Poté byla centrifugována, proteklý roztok byl odstraněn a kolonka byla znovu centrifugována, aby se dosáhlo odstranění veškerého etanolu z roztoku PE. Kolonka byla přemístěna do čisté mikrozkušavky a bylo na ni nanášeno 30-50 µl elučního roztoku EB (Buffer EB). Kolonka byla ponechána 2 min na stole a poté centrifugována, čímž byla uvolněna DNA navázaná na kolonku. Získaná DNA byla analyzována na elektroforéze a použita k ligaci.

#### **4.2.4.4 Ligace DNA fragmentů**

Ligace byla prováděna pomocí T4 DNA ligázy (NEB). Bylo používáno 50 ng vektorové DNA na reakci při molárním poměru konců 1 : 1 či 1 : 3 (vektor : inzert), k výpočtu množství inzertu byl používán NEBioCalculator™ v 1.7.1 pro ligace (<https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>; 29. 12. 2017). Reakční směs obsahovala 10× ředěný pufr pro T4 DNA ligázu, 400 U T4 DNA ligázy, 50 ng vektoru a příslušné množství inzertu a byla doplněna ddH<sub>2</sub>O do celkového objemu 20 µl. Vždy byla vedle pokusné ligace paralelně provedena i ligace kontrolní, do které byla přidána pouze DNA vektoru. Po smíchání všech komponent byla DNA ligována 10 min při pokojové teplotě, případně přes noc při 4-16 °C. 1-2 µl ligační směsi byly následně použity pro transformaci kompetentních bakterií.

#### **4.2.4.5 Izolace plazmidu metodou alkalické lyze**

1-2 ml bakteriální kultury rostoucí přes noc v LB médiu s příslušným selekčním antibiotikem byly centrifugovány 15 min při 25 830 g a 4 °C. Supernatant byl odstraněn a pelet resuspendován ve 100 µl vychlazeného Sol I (50 mM glukózy; 25 mM Tris o pH 8,0; 10 mM EDTA → sterilizace v autoklávu, uchovávání při 4 °C). K suspenzi bylo přidáno 200 µl Sol II [0,2 N NaOH; 1 % (w/v) SDS] a směs byla promíchána několikerým převrácením mikrozkuřavky. Do mikrozkuřavky bylo následně přidáno 150 µl vychlazeného Sol III [3 M CH<sub>3</sub>COOK; 11,5 % (v/v) CH<sub>3</sub>COOH → uchovávání při 4 °C] a její obsah byl opět promíchán několikerým převrácením mikrozkuřavky. Mikrozkuřavka byla umístěna na 5 min do vychlazeného stojánku do lednice a poté centrifugována 5 min při 21 900 g a 4 °C. Veškerý supernatant (~430 µl) byl přenesen do nové mikrozkuřavky s 300 µl isopropanolu (objem isopropanolu ≅ 70 % objemu supernatantu). Směs byla ponechána 10 min při pokojové teplotě a poté centrifugována 15 min při 25 830 g a 20 °C. Supernatant byl odstraněn a k DNA peletu bylo přidáno 500 µl 70% etanolu. Mikrozkuřavka byla centrifugována 10 min při 21 900 g a 20 °C. Supernatant byl znovu odstraněn a mikrozkuřavka byla ponechána otevřená pod alobalem ~15 min v bakteriálním inkubátoru při 37 °C, aby se z peletu odpařil etanol. Pelet byl poté rozpuštěn v 30 µl 1× TE s RNázou (20 µg/ml).

#### **4.2.4.6 Ověření izolované plazmidové DNA na agaróřové elektroforéře**

K separaci DNA byl používán agaróřový gel. Dle velikosti separovaných fragmentů byl používán 0,6-1% (w/v) roztok agaróřy v 1× TAE pufru s 20 000× ředěným činidlem GelRed™ (Biotium). Pro ověření úspěšnosti izolace byl na gel nanesen neštěpený vzorek (2-5 µl) a pro ověření úspěšnosti klonování a správnosti izolovaného plazmidu byl nanesen vzorek štěpený příslušnými restričními enzymy. Vzorky byly před nanesením smíchány s nanášecím pufrém. Na gel byl rovněž nanesen standard molekulové hmotnosti. Elektroforéza probíhala při napětí 5-8 V na cm vzdálenosti mezi elektrodami (tj. při ~90 V) zpravidla 90 min. Po dokončení elektroforézy byly gely foceny na přístroji UVP EC3 Imaging System (UVP).

#### **4.2.4.7 Izolace plazmidu pomocí komerční soupravy QIAfilter Plasmid Midi/Maxi Kit**

Pro získání čisté plazmidové DNA s dostatečnou kvalitou pro transfekci lidských buněk byla prováděna izolace pomocí komerční soupravy QIAfilter Plasmid (QIAGEN), dle potřebného množství získané DNA pomocí její Midi nebo Maxi verze. Postupováno bylo dle návodu výrobce s mírnými úpravami. V postupu níže číslo před lomítkem označuje objem používaný u Midi verze, za lomítkem pak u Maxi verze soupravy.

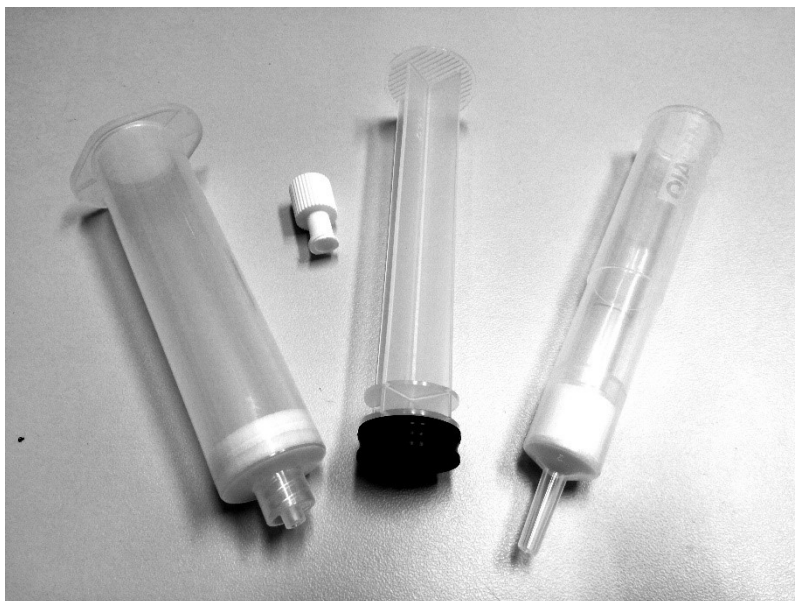
100-500 ml bakteriální kultury rostoucí přes noc v médiu LB s příslušným selekčním antibiotikem bylo centrifugováno 15 min při 4 696 g a 4 °C. Supernatant byl odstraněn a pelet

resuspendován ve 4 ml/10 ml vychlazeného roztoku P1 (Buffer P1) s RNázou A (100 µg/ml) a LyseBlue tak, aby v suspenzi nezůstaly žádné shluky. K suspenzi byly následně přidány 4 ml/10 ml roztoku P2 (Buffer P2) a obsah zkumavky byl promícháván protřepáváním, dokud celý nezmodral díky obsaženému indikátoru LyseBlue. Lyzát byl dále inkubován 5 min při pokojové teplotě. Následně k němu byly přidány 4 ml/10 ml vychlazeného roztoku P3 (Buffer P3) a vzorek byl ihned promísen protřepáváním zkumavky, dokud nezmizelo modré zabarvení. Lyzát byl přelit do „injekční stříkačky s filtrem“ (QIAfilter Cartridge), do jejíž špičky byl předem zašroubován uzávěr (QIAfilter Cap), a byl takto inkubován 10 min za pokojové teploty. Během inkubace byla kalibrována kolonka (QIAGEN-tip 100/500) aplikací 4 ml/10 ml roztoku QBT (Buffer QBT), který se nechal kolonkou volně protéci do odpadní nádoby. Poté byl ze špičky „injekční stříkačky s filtrem“ vyšroubován uzávěr, do stříkačky byl opatrně vsunut píst (plastové příslušenství soupravy viz Obrázek č. 7) a lyzát byl filtrován na připravenou kolonku, přes kterou se nechal samovolně protéci. Kolonka byla následně promyta 2 × 10 ml/30 ml roztoku QC (Buffer QC). Z promyté kolonky byla do čisté plastové zkumavky uvolněna DNA aplikací 5 ml/15 ml roztoku QF (Buffer QF) na kolonku. DNA byla z proteklého roztoku vysrážena přidáním 3,5 ml/10,5 ml (tj. 70 % objemu) isopropanolu. Obsah zkumavky byl promíchán jejím opatrným převrácením.

V případě Midi soupravy byl obsah zkumavky následně rozdělen po 1,7 ml do pěti mikrozkuavek a centrifugován 30 min při 15 000 g a 4 °C. Po centrifugaci byl z mikrozkuavek odstraněn supernatant a k peletům bylo přidáno 400 µl 70% etanolu. Pelety byly pipetováním uvolněny ze dna a obsahy dvou, respektive tří mikrozkuavek byly spojeny do jedné (nakonec tedy byly z jedné izolace získány dvě mikrozkuavky). Mikrozkuavky byly centrifugovány 10 min při 15 000 g a 4 °C.

V případě Maxi soupravy byla po přidání isopropanolu zkumavka centrifugována 90 min při 4 696 g a 4 °C. Supernatant byl odstraněn, k DNA peletu bylo přidáno 5 ml 70% etanolu a zkumavka byla centrifugována 30 min při 4 696 g a 4 °C.

V případě obou souprav byl v následujícím kroku supernatant odstraněn a pelety byly dosušeny ponecháním otevřených zkuavek ~20 min v laminárním boxu. Pelety byly následně rozpuštěny ve 200-500 µl sterilního 1× TE a ponechány v lednici při 4 °C přes noc. DNA byla následně uchovávána při -20 °C.



**Obrázek č. 7: Plastové příslušenství soupravy QIAfilter Plasmid Midi Kit (QIAGEN).**

Zleva „injekční stříkačka s filtrem“ (QIAfilter Cartridge), uzávěr (QIAfilter Cap), píst a kolonka (QIAGEN-tip 100).

#### **4.2.4.8 Stanovení koncentrace plazmidové DNA na přístroji NanoDrop®**

Po zapnutí přístroje NanoDrop® (NanoDrop Technologies) a spuštění programu pro měření koncentrace nukleových kyselin byly na měřicí terčík nanесeny 2  $\mu\text{l}$   $\text{dH}_2\text{O}$  pro automatickou kalibraci přístroje. Poté bylo provedeno měření 2  $\mu\text{l}$  blanku, tj. roztoku, ve kterém byla rozpuštěna DNA (zpravidla 1 $\times$  pufr TE nebo roztok EB z komerční soupravy). Následně byly měřeny jednotlivé vzorky v objemu 1,5  $\mu\text{l}$ . Pro přesnější stanovení koncentrace byl většinou jeden vzorek měřen v ředění 1 $\times$ , 10 $\times$ , 100 $\times$  a případně i 1000 $\times$  a finální koncentrace byla zprůměrována z těchto naměřených hodnot. Po skončení měření bylo na měřicí terčík nanесeno větší množství  $\text{dH}_2\text{O}$  a po krátké inkubaci byla voda setřena a přístroj vypnut.

#### **4.2.5 Konstrukce gBCAR**

Pro konstrukci gBCAR byl vybrán scFv AE11F (Lantto *et al.*, 2002) odvozený z lidské neutralizační protilátky ITC88 zacílený na konzervovanou subdoménu I antigenní domény AD-2 gB. Nukleotidová sekvence scFv fragmentu AE11F byla získána z databáze GenBank (Benson *et al.*, 2012) pod přístupovým číslem AF443433 (Synthetic construct clone AE11F/D34A, anti-CMV glycoprotein B recombinant single chain Fv antibody gene, partial cds) (Lantto *et al.*, 2002). V této sekvenci byl oproti originálu scFv AE11F mutován AMK zbytek D34 na A kvůli studiu změny afinity a na C-konec byla zaklonována sekvence FLAG epitopu (DDDDK) (Lantto *et al.*, 2002). Při zadávání syntézy byl AMK zbytek 34 změněn zpět na D, S14 byl zaměněn za P a dále byly provedeny optimalizace sekvence z hlediska restričních míst, obsahu G-C párů a produkce v lidských buňkách.

Signalizační část byla převzata z CAR proti lidské molekule CD19 (CD19-CAR) vyvinutého na ÚHKT MUDr. Pavlem Otáhalem, Ph.D. (Otáhal *et al.*, 2016; Ptáčková *et al.*, 2018). Obsahovala transmembránovou doménu CD8 $\alpha$ , kostimulační doménu 4-1BB a aktivační doménu CD3 $\zeta$ .

## 4.2.6 Transfekce lidských buněk

### 4.2.6.1 Kalcium-fosfátová transfekce

Adherentní buňky 293T byly sklizeny a spočítány. Na jednu misku o průměru 60 mm bylo nasazeno 700 000 buněk v 5 ml média DMEM. Buňky byly na noc umístěny do CO<sub>2</sub> inkubátoru, aby se mohly přichytit na dno. Druhý den bylo u buněk vyměněno médium za 2,5 ml média OptiMEM. Byly připraveny transfekční směsi o objemu 200  $\mu$ l obsahující 6  $\mu$ g DNA ve 250mM CaCl<sub>2</sub>. Směsi byly pomalu nakapány do 200  $\mu$ l 2 $\times$  HBS [280 mM NaCl; 50 mM HEPES; 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7,0  $\rightarrow$  autokláv] a inkubovány 5 min při pokojové teplotě. Poté byly směsi nakapány na buňky. Po 5 h v CO<sub>2</sub> inkubátoru bylo k buňkám přidáno 2,5 ml média DMEM.

Po 24 h byla zkontrolována účinnost transfekce na fluorencenčním mikroskopu podle fluorescence GFP, které bylo transfekováno jako pozitivní kontrola transfekce ve stejném množství jako pokusná DNA. Pro negativní kontrolu byl používán samotný 250mM CaCl<sub>2</sub> bez DNA. 72 h po transfekci byly buňky sklizeny a lyzovány v Laemmliho pufru pro analýzu metodou western blot (viz kapitola 4.2.7).

### 4.2.6.2 Lipofekce pomocí transfekčního činidla Metafectene®

Buňky 293T byly sklizeny a spočítány. Na jednu misku o průměru 60 mm bylo nasazeno 700 000 buněk v 5 ml média. Buňky byly ponechány přes noc v CO<sub>2</sub> inkubátoru. Druhý den před transfekcí bylo zkontrolováno, že mají buňky konfluenci ~50-70 %.

Příprava transfekčních směsí byla prováděna podle návodu výrobce činidla Metafectene® (Biontex). Směs A obsahovala DNA, směs B činidlo Metafectene®. Na misku o průměru 60 mm byly připraveny směsi v objemu 300  $\mu$ l.

Směs A: V mikroskopické misku bylo připraveno médium OptiMEM v daném objemu. Do něj bylo přidáno příslušné množství DNA a směs byla promíchána pipetou.

Směs B: V mikroskopické misku bylo připraveno médium OptiMEM v daném objemu. Do něj bylo přidáno činidlo Metafectene® v objemu odpovídajícím zvolenému poměru DNA ( $\mu$ g) : Metafectene® ( $\mu$ l). Obvykle používané poměry byly 1 : 2 až 1 : 4, na 60 mm misku bylo používáno 6  $\mu$ g DNA. Směs byla promíchána pipetou.

Následně byla směs A obsahující DNA přenesena do mikroskopické misky se směsí B a obsah mikroskopické misky byl opatrně promíchán pipetováním. Směs byla inkubována 20 min při pokojové teplotě, aby mohlo dojít k vytvoření komplexů lipidů s DNA. Během inkubace bylo

z buněk odsáto médium, buňky byly jednou opláchnuty médiem OptiMEM a nakonec k nim bylo přidáno 2,5 ml tohoto média. Po inkubaci byla transfekční směs nakapána na buňky a ty byly uloženy do CO<sub>2</sub> inkubátoru.

Úspěšnost transfekce byla ověřena po 24 či 48 h na fluorescenčním mikroskopu podle fluorescence GFP, které bylo vždy transfekováno jako kontrola ve stejném množství a poměru ku činidlu Metafectene® jako pokusná DNA. Pro negativní kontrolu bylo používáno samotné médium bez činidla Metafectene®. 48 h po transfekci byly buňky sklizeny a analyzovány metodou western blot nebo průtokovou cytometrií.

#### **4.2.6.3 Elektroporace na elektroporátoru Bio-Rad Gene Pulser® II**

Na elektroporátoru Bio-Rad Gene Pulser® II (Bio-Rad) byly zpracovávány buňky K562. Na 24jamkovou destičku bylo pipetováno 800 µl média OptiMEM do potřebného množství jamek. Destička byla vložena do CO<sub>2</sub> inkubátoru pro vytemperování média. Buňky K562 byly spočítány a naředěny na koncentraci  $5 \times 10^6$  b/ml do potřebného objemu média OptiMEM.  $10^6$  buněk ve 200 µl média bylo přeneseno do elektroporační kyvety a bylo k nim přidáno 5 µg DNA. Síla pulsu byla nastavena na 0,2 kV a 300 µF. Kyveta byla vložena do nástavce a buňkám byl udělen puls o délce okolo 4,5 ms. Buňky byly ihned z kyvety přemístěny do vytemperovaného média na 24jamkovém panelu a dále až do zpracování pěstovány v CO<sub>2</sub> inkubátoru.

#### **4.2.6.4 Elektroporace na elektroporátoru Neon®**

Elektroporací na elektroporátoru Neon® (Invitrogen) byly do T lymfocytů vnášeny plazmidy transpozonového systému piggyBac. PBMC určené na elektroporaci byly resuspendovány v médiu RPMI v koncentraci  $5-10 \times 10^6$  b/ml a byly ponechány přes noc v CO<sub>2</sub> inkubátoru.

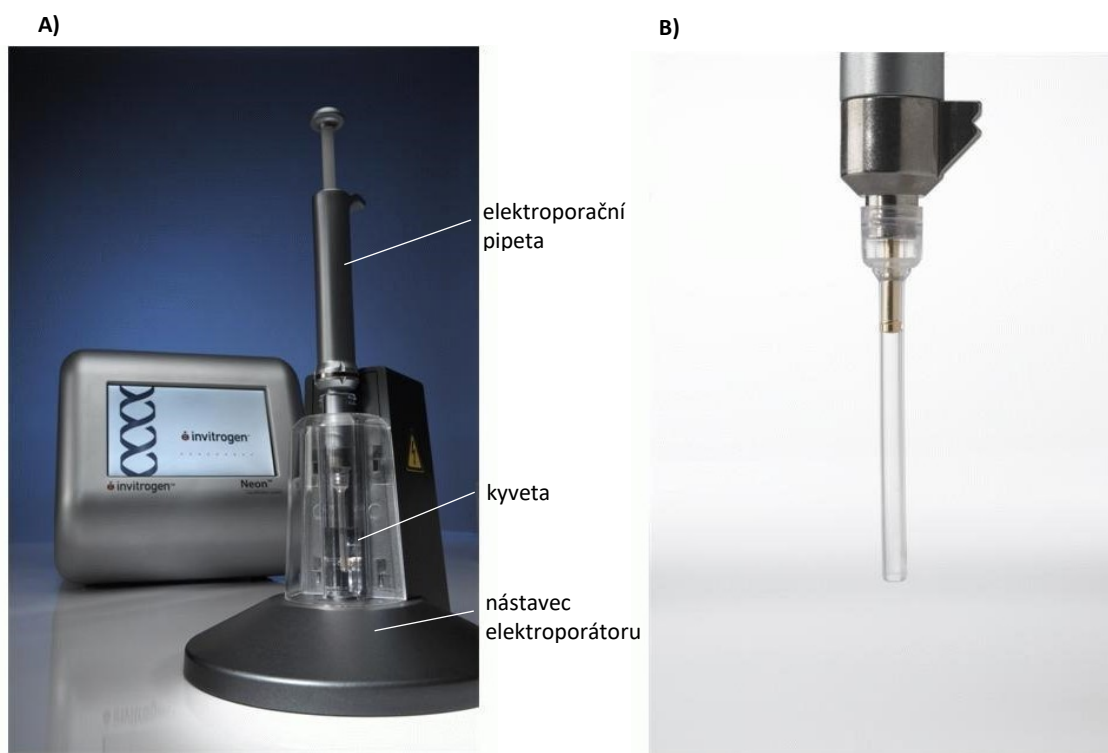
Druhý den bylo v CO<sub>2</sub> inkubátoru vytemperováno médium CellGro na 24jamkové destičce v objemu 500 µl na jamku. Elektroporační kyveta byla vložena do nástavce elektroporátoru (viz Obrázek č. 8A) a byl do ní nanesen roztok E2 (Electrolytic buffer E2) tak, aby se elektroda kyvety nacházela pod hladinou (~2,5 ml). V případě elektroporace různými plazmidy bylo nutné mezi vzorky vyměnit kyvetu a pufr v ní, aby nedošlo ke vzájemné kontaminaci.

Na jednu elektroporaci bylo potřeba  $4 \times 10^6$  T lymfocytů. Ty byly spočítány a příslušný počet buněk byl centrifugován 3 min při 400 g a 21 °C. Buňky byly následně 2× promyty roztokem PBS, podruhé bylo nutné PBS zcela odsát a buněčný pelet resuspendovat ve 110 µl roztoku T (Resuspension buffer T).

K buňkám v roztoku T byla ihned přidána DNA v množství 5,5 µg na 110 µl suspenze. Do buněk byla vnášena směs piggyBac plazmidů pPBEF (s genem zájmu) a pBASE v poměru 1 : 2. Elektroporační pipetou se 100µl špičkou (viz Obrázek č. 8B) byly najednou nabrány buňky tak, aby ve špičce nebyla přítomna vzduchová bublina a při pulsu nevznikla jiskra (alternativně byly

použity 10 $\mu$ l špičky a buňky byly elektroporovány po částech). Pipeta byla umístěna do elektroporační kyvety a buňkám byl udělen puls o délce 20 ms při napětí 2 300 V. Ihned po elektroporaci byly buňky přeneseny do vytemperovaného média CellGro v množství jedna elektroporace o 110  $\mu$ l na jamku.

Buňky byly inkubovány v CO<sub>2</sub> inkubátoru do dalšího dne, kdy byly přemístěny na destičku s adsorbovanými protilátkami  $\alpha$ -CD3 (1 : 100) /  $\alpha$ -CD28 (1 : 100) /  $\alpha$ -hu-IgG-AF647 (1  $\mu$ g/ml) v kombinacích (1)  $\alpha$ -CD3 +  $\alpha$ -CD28, (2)  $\alpha$ -CD3 +  $\alpha$ -CD28 +  $\alpha$ -hu-IgG-AF647 a (3)  $\alpha$ -hu-IgG-AF647 (viz kapitola 5.5.2) a byly k nim přidány cytokiny IL-4 a IL-7 v minimálním množství média (150  $\mu$ l). Poté byly buňky pěstovány v CO<sub>2</sub> inkubátoru a přibližně po týdnu přesunuty pryč z plastiku s protilátkami. K buňkám bylo postupně přidáváno médium CellGro s IL-4 a IL-7 tak, aby nedošlo k jejich podředení.



**Obrázek č. 8: Elektroporátor Neon<sup>®</sup> Transfection System (Invitrogen).**

A) v popředí nástavec elektroporátoru s vloženou kyvetou a elektroporační pipetou, v pozadí samotný elektroporátor; B) detail elektroporační špičky. Obrázky byly převzaty a upraveny podle:

A) [http://www.helsinki.fi/uploads/3/7/0/7/37078801/3636281\\_orig.jpg](http://www.helsinki.fi/uploads/3/7/0/7/37078801/3636281_orig.jpg) [28. 12. 2017];

B) <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/figures/Neon%20Tip%20retracted.JPG-650.jpg> [28. 12. 2017].

## 4.2.7 Western blot

### 4.2.7.1 Příprava vzorků pro western blot

Buňky 293T byly rozvolněny do média pomocí pipety, přeneseny do 15ml plastové zkumavky a centrifugovány 10 min při 300 g a 4 °C. Médium bylo odstraněno, buněčný pelet resuspendován v 5 ml vychlazeného PBS a opět centrifugován při stejných podmínkách. Supernatant byl odstraněn, pelet resuspendován v 1 ml vychlazeného PBS, přemístěn do mikrozukavky a znovu centrifugován. Po odstranění PBS byly buňky lyzovány ve 100-200  $\mu$ l Laemmliho pufru protažením přes injekční stříkačku s jehlou o průměru 1,2 mm (BD Biosciences) a 5min povařením v termobloku.

### 4.2.7.2 Denaturační proteinová elektroforéza (SDS-PAGE)

Do sestavené aparatury na přípravu vertikálního polyakrylamidového gelu byl mezi skla nanesen 10% separační gel do výšky ~4,5 cm. Gel byl převrstven 200  $\mu$ l butanolu a ponechán přibližně 20 min do zpolymerování. Následně byl butanol vylit a aparatura propláchnuta dH<sub>2</sub>O. Byl namíchan zaostřovací gel, který byl nanesen na gel separační až po horní okraj skel. Mezi skla byl zastrčen hřebínek pro vytvoření jamek a gel byl ponechán 20 min do zpolymerování.

Gel byl poté přenesen do vertikální elektroforetické aparatury a zalit 1 $\times$  pufrem SDS-PAGE [25 mM Tris; 192 mM glycinu; 0,1 % (w/v) SDS; pH 8,3 v dH<sub>2</sub>O]. Před vytažením hřebínku byly podle něj vyznačeny spodní hrany jamek. Před nanesením vzorků byly jamky propláchnuty SDS-PAGE pufrem pomocí mikrostříkačky Hamilton. Mezi nanesením jednotlivých vzorků byla stříkačka vždy několikrát propláchnuta SDS-PAGE pufrem. Po nanesení všech vzorků a standardu molekulové hmotnosti byla elektroforéza zapojena ke zdroji napětí a puštěna na 80 V. Poté, co vzorky opustily zaostřovací gel, bylo napětí zvýšeno na 120 V. Průběh elektroforézy byl ukončen ve chvíli, kdy bromfenolová modř z Laemmliho pufru dosáhla spodního okraje gelu.

#### Použité gely:

- 10% separační gel: 375 mM Tris o pH 8,8; 23 % (v/v) směsi akrylamidu a bisakrylamidu [29 % (w/v) akrylamidu, 1 % (w/v) bisakrylamidu v dH<sub>2</sub>O]; 0,1 % (w/v) SDS; 0,1 % (w/v) APS; 0,15 % (v/v) TEMED v dH<sub>2</sub>O
- zaostřovací gel: 125 mM Tris-HCl o pH 6,8; 16,7 % (v/v) směsi akrylamidu a bisakrylamidu; 0,1 % (w/v) SDS; 0,1 % (w/v) APS; 0,17 % (v/v) TEMED v dH<sub>2</sub>O

#### **4.2.7.3 Přenos proteinů na nitrocelulózovou membránu**

Polyakrylamidový gel byl vytažen z aparatury a byl z něj odříznut zaostřovací gel a spodní část s bromfenolovou modří. Gel byl přenesen do misky s 1x blotovacím pufrem [25 mM Tris; 192 mM glycin; 20 % (v/v) metanol; 0,03 % (w/v) SDS v dH<sub>2</sub>O] a inkubován na kývačce 20 min. Z nitrocelulózové membrány (Hybond™-C Extra, nitrocellulose membrane optimised for protein transfer; Amersham Biosciences) byl ustřižen kus přibližně o velikosti gelu, který byl také přenesen do misky s blotovacím pufrem a inkubován po dobu 20 min.

Byla připravena aparatura Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad) na polosuché blotování (semi-dry blotting). Z hrubého filtračního papíru (Extra Thick Blot Filter Paper; Bio-Rad) byly ustřiženy dva kusy o něco větší než gel. Na anodě blotovacího zařízení byl následně sestaven tzv. „blotovací sendvič“ (zespoda nahoru, tj. od anody ke katodě): filtrační papír namočený v blotovacím pufru – membrána – gel – filtrační papír namočený v blotovacím pufru. Před přidáním další vrstvy byl sendvič vždy zalit blotovacím pufrem, zpod gelu byly nakonec vytlačeny bubliny pomocí skleněné zkumavky. Blotovací zařízení bylo uzavřeno víkem s katodou a připojeno ke zdroji. Proteiny byly přenášeny na membránu 1 h při 70 mA. Poté byly pitevními nůžkami na membránu vyznačeny pozice standardu a pro snadné určení orientace byl ustřižen pravý horní roh membrány.

#### **4.2.7.4 Imunodetekce**

Nitrocelulózová membrána s přenesenými proteiny byla inkubována 5 min v promývacím roztoku [0,1 % (v/v) Tween 20 v PBS] a blokována přes noc v lednici blokovacím roztokem [5 % (w/v) sušeného mléka v promývacím roztoku]. Druhý den byla membrána opláchnuta inkubací 4× 5 min v promývacím roztoku na kývačce.

Membrána byla poté přenesena na stůl na folii (Sarogold® PRO; Saropack). Na membránu byl nanesen 1 ml primární protilátky ředěné v blokovacím roztoku. Membrána byla zakryta krabičkou a inkubována 60 min. Během inkubace bylo kontrolováno, zda membrána nevysychá, a podle potřeby byl na ni nanesen ještě druhý ml ředěné protilátky. Membrána byla následně promyta 4× 5 min promývacím roztokem. Poté byla opět přenesena na folii a inkubována se sekundární protilátkou proti myšímú IgG konjugovanou s HRP ( $\alpha$ -mo-HRP) ředěnou v poměru 1 : 2 000. Inkubace probíhala 60 min s 1 ml naředěné protilátky, membrána byla při tom překryta krabičkou. Během inkubace bylo kontrolováno, zda membrána nevysychá, a podle potřeby byl na ni nanesen ještě druhý ml ředěné protilátky. V některých případech byla použita pouze jedna protilátka proti antigenu zájmu přímo konjugovaná s HRP.

Následovalo promytí 4× 5 min promývacím roztokem a vyvolání chemiluminiscence pomocí soupravy Pierce® ECL Plus Western Blotting Substrate (Thermo Scientific). Na membránu byl nanesen vyvolávací roztok o objemu 1 ml vzniklý smícháním substrátů A a B

(Substrate A, Substrate B) v poměru 40 : 1 (1 ml substrátu A a 25  $\mu$ l substrátu B). Po 5min inkubaci byla membrána zabalena do folie a vlepena do vyvolávací kazety. V temné komoře byl do kazety vložen film (Amersham Hyperfilm™ ECL; GE Healthcare), na který byla membrána exponována podle síly signálu sekundy až desítky minut. Nakonec byl film vyvolán na přístroji Kodak Medical X-Ray Processor 102 (Kodak).

#### 4.2.8 Příprava lentivirů

Na příslušný počet jamek 6jamkové destičky byly vysety buňky 293T v 1 ml média DMEM v hustotě 400 000 buněk na jamku. Daná hustota vysetí zajistila přibližně 50% konfluenci po inkubaci přes noc v CO<sub>2</sub> inkubátoru.

Druhý den v odpoledních hodinách byly buňky transfekovány pomocí činidla Metafectene® v poměru 1 : 2 (DNA : Metafectene®). Lentivirové plazmidy byly transfekované v množství 1,5  $\mu$ g pWPXLd : 0,75  $\mu$ g psPAX2 : 0,75  $\mu$ g pMD2.G na jamku (celkem 3  $\mu$ g DNA, poměr množství plazmidů 2:1:1). Transfekční směsi byly připraveny v PBS nebo v DMEM bez séra a ATB. Buňky byly opláchnuty DMEM s 10 % FBS bez ATB a poté byly ponechány v 1 ml tohoto média. Po nakapání transfekční směsi byly buňky ponechány v CO<sub>2</sub> inkubátoru přes noc. Následující ráno třetího dne bylo u buněk vyměněno médium za RPMI. Čtvrtý den ráno bylo z buněk posbíráno médium a nahrazeno 1 ml čerstvého RPMI. Médium bylo klarifikováno centrifugací o délce 10 min při 400-600 g a 4 °C a bylo ihned použito pro spinofekci nebo bylo zamrazeno na -70 °C. Pátý den byl proveden sběr druhého lentivirového média, které bylo opět klarifikováno centrifugací a použito nebo zamrazeno, destička s buňkami 293T byla vyhozena. Z každé jamky byl tedy získán 2x 1 ml lentivirového média.

V pozdější fázi projektu byla lentivirová média před použitím vždy přemražována, protože při použití čerstvého média docházelo k postupnému přerůstání T lymfocytů buňkami 293T, které se centrifugací nepodařilo zcela odstranit.

#### 4.2.9 Transdukce lentivirů do buněk – spinofekce

K transdukci T lymfocytů byly používány čerstvé nebo zamražené dárcovské PBMC. Rozmražené PBMC byly před transdukci ponechány přes noc v CO<sub>2</sub> inkubátoru v médiu RPMI.

Spinofekce byla prováděna na 6jamkových destičkách s navázanými  $\alpha$ -CD3 a  $\alpha$ -CD28 protilátkami. Protilátky byly naředěny v PBS v poměru 1 : 500 a naneseny na destičku v objemu 1 ml na jamku. Protilátky byly adsorbovány 1-2 h při 37 °C nebo v lednici přes noc.

První lentivirová média byla mezitím rozmrazena nebo vzata rovnou po klarifikaci a byl k nim přidán polybren na cílovou koncentraci 4  $\mu$ g/ml. T lymfocyty byly spočítány a rozděleny do mikrozkušavek po 10<sup>6</sup> buněk. Zkušavky byly centrifugovány a pelety T lymfocytů resuspendovány v 1 ml příslušného lentivirového média.

Poté byly jamky 6jamkové destičky opláchnuty 1 ml PBS a byly na ně nanесeny T lymfocyty v lentivirových médiích. Destička byla oblepena parafilmem a centrifugována 1 h při 600/800 g a 21 °C. Destička byla následně umístěna na 2 h do CO<sub>2</sub> inkubátoru a poté byl k T lymfocytům přidán 1 ml média RPMI s IL-2. Druhý den byla opakována spinofekce s druhou várkou lentivirových médií, která byla přidána do jamek k T lymfocytům, tentokrát již bez polybrenu. Po 2 h v CO<sub>2</sub> inkubátoru byl k T lymfocytům přidán další ml média RPMI s IL-2 (celkem tedy byly T lymfocyty po dvou spinofekcích ve 4 ml média).

Dále byly T lymfocyty pěstovány v CO<sub>2</sub> inkubátoru a bylo k nim průběžně přidáváno médium RPMI s IL-2 tak, aby se jejich koncentrace pohybovala v rozmezí 1-2× 10<sup>6</sup> b/ml. Po 4-5 dnech byly T lymfocyty přesunuty pryč z plastiku s protilátkami.

V jednom z pokusů byly také vyzkoušeny stimulační T lymfocytů před transdukci pomocí protilátek a použití IL-4 a IL-7 (viz kapitola 5.8). Jedna část buněk (1) byla zpracována dle klasického protokolu, tzn. nebyla stimulována a byla po rozmražení ponechána 24 h v samotném médiu RPMI. Druhá část (2) byla po rozmražení 48 h inkubována v médiu RPMI s IL-2 a stimulačními protilátkami α-CD3 (1 : 5 000) + α-CD28-BD (1 μg/ml) + α-CD49d (1 μg/ml). Třetí část (3) byla 48 h inkubována v médiu RPMI s IL-4 a IL-7 a stejným mixem stimulačních protilátek. Všechny protilátky byly nařaděny do média. Po příslušné inkubaci byly buňky transdukovány lentiviry a bylo k nim přidáno médium RPMI s IL-2 (1 a 2) nebo IL-4 a IL-7 (3). Dále byly buňky pěstovány v CO<sub>2</sub> inkubátoru.

Při transdukci buněk 293T bylo použito 238 000 b/jamku, u linie Jurkat 10<sup>6</sup> b/jamku. Před přidáním média po spinofekci byly buňky ponechány v CO<sub>2</sub> inkubátoru přes noc.

#### **4.2.10 Barvení buněk pro průtokovou cytometrii**

Buňky byly sklizeny z kultivační nádoby a spočítány. Adherentní buňky byly spláchnuty pipetou (293T) nebo uvolněny inkubací s 10mM roztokem EDTA (LEP). Buňky byly rozděleny do FACS zkumavek (Falcon® 5mL Round Bottom PP Test Tube; Corning) v příslušném množství (zpravidla 0,5-1× 10<sup>6</sup> buněk na jednu zkumavku, tj. jednu kombinaci barvicích protilátek) a centrifugovány 5-10 min při 4 °C a 600 g u T lymfocytů nebo 300 g u ostatních typů buněk (dále stejné podmínky centrifugací). Médium bylo odstraněno, buněčný pelet byl resuspendován v 1 ml PBS a buňky byly centrifugovány.

Buňky byly ponechány v ~100 μl PBS a bylo k nim přidáno 20 μl PBS s činidlem LIVE/DEAD™ Fixable Blue Dead Cell Stain (L&D; Invitrogen) v množství 0,2 μl na 10<sup>6</sup> buněk pro rozlišení mrtvých a živých buněk. Buňky byly inkubovány 30-60 min ve tmě při pokojové teplotě (stejně i další inkubace). Následně bylo činidlo zředěno přidáním 880 μl FACS pufru [1 % (w/v) BSA a 0,1 % (w/v) NaN<sub>3</sub> v PBS] a zkumavky byly centrifugovány.

U vzorků barvených pouze extracelulárně byl pelet ponechán ve 100  $\mu$ l FACS pufru, kterým bylo přidáno 20  $\mu$ l barvicí směsi protilátek ředěných ve FACS pufru. Inkubace probíhala 30-60 min. Směs byla zředěna 880  $\mu$ l FACS pufru, zkumavky byly centrifugovány a bylo v nich ponecháno 100  $\mu$ l FACS pufru. Dále mohlo následovat další barvení sekundární protilátkou a oplach FACS pufrem, nebo již byly vzorky zafixovány přidáním 100  $\mu$ l fixačního činidla (IC Fixation Buffer; eBioscience), ve kterém byly inkubovány 20 min. Poté bylo činidlo zředěno 1 ml FACS pufru, buňky byly centrifugovány a supernatant byl odsát. Nakonec byly buňky resuspendovány v 500  $\mu$ l FACS pufru a měřeny na průtokovém cytometru, případně uschovány do lednice a změřeny druhý den.

Intracelulárně barvené vzorky byly po barvení na viabilitu a proplachu FACS pufrem fixovány přidáním 100  $\mu$ l fixačního činidla na dobu 20 min. Následovalo přidání 800  $\mu$ l 1 $\times$  permeabilizačního pufru (Permeabilization Buffer 10 $\times$ ; eBioscience ředěný v ddH<sub>2</sub>O) a centrifugace. U buněk bylo ponecháno 100  $\mu$ l permeabilizačního pufru a bylo k nim přidáno 20  $\mu$ l barvicí směsi protilátek namíchané v permeabilizačním pufru pro intracelulární barvení. Po 30-60 min byly protilátky zředěny 880  $\mu$ l FACS pufru a zkumavky byly centrifugovány. Dále mohlo následovat další barvení sekundární protilátkou a oplach FACS pufrem, nebo již byly buňky rovnou resuspendovány v 500  $\mu$ l FACS pufru a měřeny nebo uloženy do lednice.

Při barvení protilátkou proti lidskému IgG (H+L) byly po oplachu FACS pufrem buňky obvykle inkubovány 10 min ve 100  $\mu$ l FACS pufru s 10 % (v/v) lidského AB séra pro vyvázání volné protilátky. Následovalo zředění 800  $\mu$ l FACS pufru, centrifugace a další barvení nebo fixace.

#### **4.2.11 Měření na průtokovém cytometru BD LSRFortessa™**

Byl zapnut cytometr BD LSRFortessa™ (BD Biosciences) a systém fluidiky a spuštěn program BD FACSDiva. Cytometr byl proplachován ~10 min ddH<sub>2</sub>O filtrovanou přes 0,22 $\mu$ m filtr. Mezitím byl v programu FACSDiva založen nový experiment s danými vzorky a byly připraveny grafy s vynesemím příslušných parametrů pro sledování správného průběhu měření. Pomocí nebarvených a plně barvených vzorků bylo nastaveno vhodné napětí detektorů. Následně byly změřeny všechny vzorky od nebarvených přes jednobarevné a FMO kontroly (fluorescence minus one; oproti plně barvenému vzorku použito o jednu protilátku méně) až po kompletně barvené vzorky. Mezi vzorky s různými fluorochromy byl přístroj krátce propláchnut filtrovanou ddH<sub>2</sub>O nebo byl proveden tzv. prime, kdy byla vypuštěna zbylá tekutina z nasávací jehly do odpadní zkumavky. Po měření byl přístroj propláchnut 10 min roztokem BD FACS™ Clean, 10 min roztokem BD FACS™ Rinse a 10 min filtrovanou ddH<sub>2</sub>O. Poté byl cytometr i s odtokem vypnut. Soubory s výsledky byly exportovány ve formátu FCS 3.0 a analyzovány v programu FlowJo.

#### 4.2.12 Infekce buněk LEP virem HCMV kmene Ad169

HCMV kmene Ad169 (HCMV Ad169) je v naší laboratoři pěstován na primární buněčné linii lidských embryonálních plicních buněk (LEP). Na infikovaných buňkách bylo prováděno měření extracelulárního gB a byly využity jako cílové buňky při funkčním testování gBCAR T lymfocytů.

Buňky LEP byly nasazeny v potřebném množství na zvolený plastík. Na infekci pro měření množství gB v buňkách byly používány misky o průměru 60 mm, na které bylo nasazeno  $10^6$  buněk LEP ve 3 ml média MEM. Druhý den po nasazení byly adherované buňky infikovány příslušným množstvím viru, v případě 60 mm misky 20  $\mu$ l virového inokula, které bylo nakapáno na buňky (pro snazší manipulaci bylo 20  $\mu$ l inokula smícháno s PBS do objemu 200  $\mu$ l). 96 h.p.i. byly buňky zpracovány pro měření na průtokovém cytometru.

Na funkční test byly používány 6jamkové destičky, na které bylo množství buněk optimalizováno na 412 000 b/jamku v 1,5 ml média a množství viru na 10  $\mu$ l (data neukázána).

**Optimalizace:** Pro detekci extracelulárního gB byla u 60 mm misek vyzkoušena infekce do suspenze buněk (tj. infekce buněk, které dosud nestihly přisednout) 200  $\mu$ l, 40  $\mu$ l a 20  $\mu$ l virového inokula. Buňky však ani v jednom případě nepřežily do druhého dne. Následně byla proto vyzkoušena infekce 20  $\mu$ l inokula na adherované buňky a množství gB bylo změřeno 24 a 48 h.p.i. Buňky přežívaly, avšak množství extracelulárního gB v těchto časových intervalech bylo velmi nízké (data neukázána). Proto bylo dále množství gB testováno až 96 h.p.i. (viz kapitola 5.7), kdy má být podle proteomické studie autorů Weekes *et al.* (2014) množství gB na povrchu buněk nejvyšší. Detekce povrchového gB v tomto čase byla pozitivní. Inkubace infikovaných buněk LEP s gBCAR T lymfocyty v rámci funkčního testu byla tedy prováděna v intervalu 72 až 96 h.p.i. (viz kapitola 5.9.1).

Na funkční test byla u 6jamkové destičky testována množství 6  $\mu$ l, 8  $\mu$ l a 10  $\mu$ l inokula, která byla přepočtena z 60 mm misek podle množství buněk nebo média. Největší procento gB pozitivních buněk poskytlo 10  $\mu$ l inokula (data neukázána), toto množství bylo tedy použito pro infekci buněk na funkční test.

#### 4.2.13 ELISA pro detekci IFN $\gamma$

Pro detekci IFN $\gamma$  v buněčném supernatantu byla použita komerční souprava Human IFN- $\gamma$  DuoSet<sup>®</sup> ELISA (R&D Systems). Bylo postupováno podle návodu výrobce.

Na 96jamkovou destičku byla nanášena myší protilátka proti lidskému IFN $\gamma$  (Capture Antibody). Na každou jamku bylo nanášeno 100  $\mu$ l protilátky zředěné v PBS na koncentraci 2  $\mu$ g/ml. Destička byla zakryta a inkubována přes noc při pokojové teplotě.

Druhý den byla destička propláchnuta  $3 \times 300$   $\mu$ l promývacího roztoku na jamku [Wash Buffer; 0,05 % (v/v) Tween 20 v PBS]. Následně byla blokována 1 h při pokojové teplotě 300  $\mu$ l

čerstvě připraveného blokovacího roztoku na jamku [Reagent Diluent; 1 % (w/v) BSA v PBS; pH 7,2-7,4]. Destička byla během blokace zakryta. Po blokaci byla destička opět propláchnuta 3× 300 µl promývacího roztoku na jamku.

Na destičku byl do příslušných jamek nanesen standard a vzorky ředěné v blokovacím roztoku po 100 µl na jamku. Standard byl ředěn dvojkovou ředicí řadou s počáteční koncentrací IFN $\gamma$  600 pg/ml. Destička byla zakryta a inkubována 2 h při pokojové teplotě. Následně byla destička propláchnuta 3× 300 µl promývacího roztoku na jamku. Do každé jamky bylo pipetováno 100 µl detekční protilátky (Detection Antibody) zředěné v blokovacím roztoku na koncentraci 125 ng/ml. Destička byla zakryta a inkubována 2 h při pokojové teplotě. Následovalo promytí destičky 3× 300 µl promývacího roztoku na jamku.

Do každé jamky bylo poté přidáno 100 µl streptavidinu konjugovaného s HRP (Streptavidin-HRP) ředěného 40× v blokovacím roztoku. Destička byla zakryta a inkubována ve tmě 20 min při pokojové teplotě. Poté byla destička propláchnuta 3× 300 µl promývacího roztoku na jamku.

Do každé jamky bylo pipetováno 100 µl roztoku substrátu (Substrate Solution), destička byla zakryta a inkubována ve tmě 20 min při pokojové teplotě. Do každé jamky bylo následně přidáno 50 µl roztoku zastavujícího reakci (Stop Solution; 2 N H $_2$ SO $_4$ ), obsah jamek byl promíchán poklepem destičky a byla změřena OD při 450 nm na přístroji EL $_x$ 808 Ultra Microplate Reader (BioTek Instruments). Množství IFN $\gamma$  v jamkách bylo určeno porovnáním s kalibrační křivkou vytvořenou podle standardu v programu Microsoft Excel 2016 (Microsoft). Graf a statistické vyhodnocení uvedené ve výsledcích bylo vytvořeno v programu GraphPad Prism 5 (GraphPad Software).

**Složení roztoku substrátu:** 0,01 % (w/v) tetramethylbenzidinu; 10 % (v/v) dimethylformamidu; 0,02 % (v/v) H $_2$ O $_2$  v 0,05M fosfocitrátovém pufru o pH 5,0 (0,1 M Na $_2$ HPO $_4$ ; 0,05 M citronanu sodného; pH 5,0 upraveno pomocí H $_3$ PO $_4$  → sterilizace přes 0,22µm filtr)

#### **4.2.14 Metody prováděné jinou osobou**

Pomocí těchto metod byly získány čerstvé PBMC pro přípravu gBCAR T lymfocytů a virus HCMV Ad169 pro infekci buněk LEP. Metody byly provedeny Mgr. Petrem Hainzem, který rovněž provedl stimulaci PBMC dárce ZV 34/2 pomocí PepMixu<sup>TM</sup> HAdV-3.

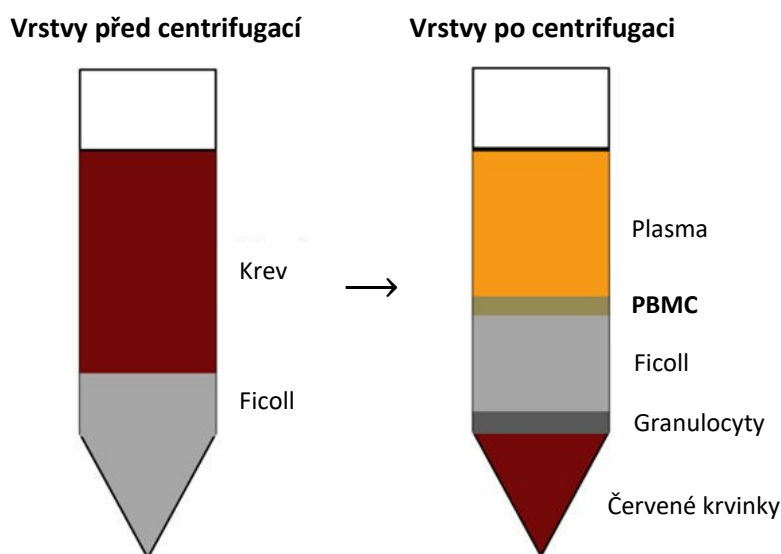
##### **4.2.14.1 Izolace PBMC pomocí činidla Ficoll**

Všechny použité chemikálie a roztoky byly před provedením izolace vytemperovány na pokojovou teplotu.

Před zpracováním krve byly připraveny čtyři 50ml plastové zkumavky, do kterých bylo přidáno 15 ml činidla Ficoll. 20 ml krve bylo naředěno sterilním PBS do celkového objemu

100-120 ml. Zředěná krev byla rovnoměrně navrstvena do připravených zkumavek na činidlo Ficoll (~30 ml na zkumavku). Zkumavky byly centrifugovány 30 min při 770 g, zrychlení 5, brždění 1 a teplotě 20 °C. Po centrifugaci byla ze všech zkumavek opatrně posbírána mléčná opaleskující vrstva s PBMC (viz Obrázek č. 9) do jedné 50ml zkumavky, buňky byly promíchány a rozděleny do 4 nových zkumavek. Zkumavky s činidlem Ficoll a dalšími krevními složkami byly zlikvidovány.

Každá zkumavka s PBMC byla doplněna PBS na celkový objem 40-45 ml. Zkumavky byly centrifugovány 15 min při 310 g, zrychlení 9, brždění 3 a teplotě 20 °C. Supernatanty byly zlikvidovány, pelety byly resuspendovány v 10 ml PBS a spojeny do jedné zkumavky, která byla centrifugována za stejných podmínek. Supernatant byl po centrifugaci odstraněn, pelet resuspendován ve 40 ml média RPMI s 10 % FBS bez ATB a opět centrifugován za stejných podmínek. Po odstranění supernatantu byl pelet resuspendován ve 41 ml RPMI s 10 % FBS bez ATB a neředěné a 10× ředěné buňky byly spočítány. Po zjištění počtu buněk bylo potřebné množství uloženo do CO<sub>2</sub> inkubátoru v médiu RPMI dle prováděného pokusu. Nadbytečné buňky byly zamrazeny. Obdobně byly izolovány také používané zamražené vzorky BC a ZV.



**Obrázek č. 9: Separace krevních složek pomocí činidla Ficoll**

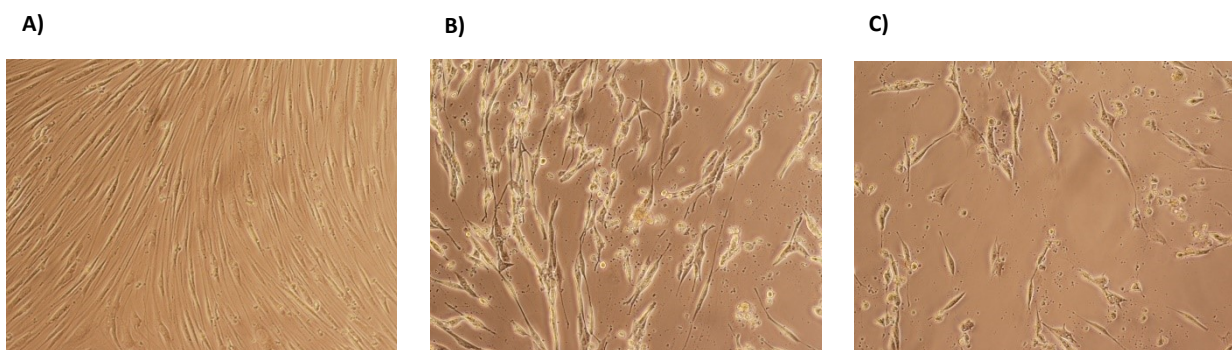
Vlevo zkumavka s krví a činidlem Ficoll před centrifugací, vpravo po centrifugaci se znázorněnými separovanými vrstvami krevních složek. Obrázek upraven podle: <https://media.nature.com/full/nature-assets/nprot/journal/v9/n7/images/nprot.2014.104-F5.jpg> [8. 12. 2017]

#### 4.2.14.2 Izolace viru HCMV Ad169

Původní inokulum HCMV Ad169 bylo získáno od RNDr. Kateřiny Roubalové, CSc., ze společnosti VIDIA spol. s.r.o. Virus byl dále množen na tkáňových kulturách buněk LEP v kultivačních lahvích. 15-20 dní po infekci buněk, tj. v době, kdy byl pozorovatelný úplný cytopatický efekt (viz Obrázek č. 10), byly kultivační lahve 3× zmrazeny a rozmrazeny na -70 °C pro rozvolnění buněk.

Následně byly lyzované buňky přeneseny do centrifugačních zkumavek a centrifugovány 20 min při 390 g a 4 °C. Klarifikovaný supernatant obsahující virus byl poté rozplněn do mikrozkušavek, zamražen na -70 °C a používán k infekcím.

U viru se nepodařilo dosáhnout tvorby plaků a kvantifikace pomocí PFU/ml. Kvantifikace byla provedena infekcí buněk LEP na 24jamkové destičce inokulem ředěným desítkovou řadou. Na jamku bylo nasazeno 60 000 buněk LEP ve 400 µl média MEM a infekce byla provedena 100 µl příslušně naředěného inokula do suspenze buněk. U používaného inokula byl cytopatický efekt pozorován do ředění 10<sup>-4</sup> až 10<sup>-5</sup>.



**Obrázek č. 10: Infekce buněk LEP virem HCMV Ad169.**

A) neinfikované buňky; B) buňky 10 dní po infekci HCMV Ad169; C) buňky 20 dní po infekci HCMV Ad169. Na obrázcích B) a C) je pozorovatelný silný cytopatický efekt. Foceno na mikroskopu Nikon Eclipse TS100 (Nikon) s kamerou Olympus DP70 (Olympus) při zvětšení 40×. Autor fotografií: Mgr. Petr Hainz.

#### **4.2.14.3 Stimulace PBMC ZV 34/2 pomocí peptidů HAdV-3**

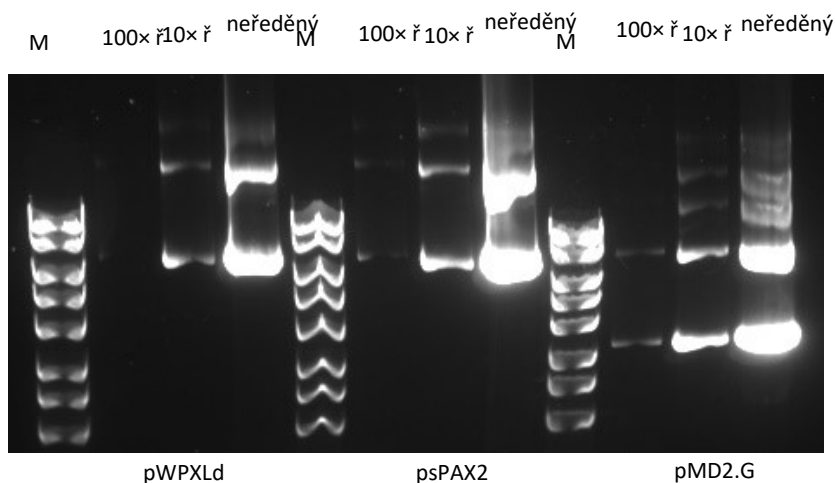
25 × 10<sup>6</sup> rozmražených PBMC dárce ZV 34/2 bylo resuspendováno ve 100 µl média CTL v mikrozkušavce. Buňkám byl udělen antigenní puls přidáním 0,17 µg PepMixu™ HAdV-3 (JPT Peptide Technologies), na který daný dárce dobře odpovídal v předchozích pokusech. Buňky byly umístěny na 1 h do CO<sub>2</sub> inkubátoru. Následně byly buňky přeneseny na kultivační lahev o ploše dna 75 cm<sup>2</sup> do 20 ml média CTL a umístěny do CO<sub>2</sub> inkubátoru na 5 dní. Poté byly spočítány, centrifugovány (tj. zbaveny peptidů) a resuspendovány ve 20 ml média CTL s IL-4 a IL-7 v koncentraci 0,5 × 10<sup>6</sup> b/ml. Po 4 dnech bylo k buňkám přidáno 5 ml média CTL s IL-4 a IL-7 a po dalších 3 dnech v CO<sub>2</sub> inkubátoru byly buňky elektroporovány na přístroji Neon®.

#### **4.2.15 Příprava materiálu pro pokusy**

##### **4.2.15.1 Izolace lentivirových plazmidů pro přípravu lentivirů a klonování**

Pro přípravu lentivirů používaných pro transdukcii buněk a pro klonování bylo potřeba izolovat větší množství tří lentivirových plazmidů, tj. plazmidů pWPXLd, psPAX2 a pMD2.G. Z bakteriálních konzerv připravených Mgr. Vojtěchem Šrollerem, Ph.D., byly vyočkovány bakterie do média LB s ampicilinem. Z narostlých kultur byly izolovány plazmidy pomocí

soupravy QIAfilter Plasmid Maxi Kit (QIAGEN). Vzorky z izolátů byly analyzovány na elektroforéze, která potvrdila, že obsahují plazmidovou DNA (viz Obrázek č. 11). Na spektrofotometru NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies) byla změřena koncentrace DNA v izolátech a tyto byly dále používány pro přípravu lentivirových částic, plazmid pWPXLd byl také použit pro klonování.



**Obrázek č. 11: Ověření přítomnosti DNA v izolátech plazmidů pWPXLd, psPAX2 a pMD2.G určených pro přípravu lentivirových částic a klonování.**

*0,8% agarózový gel. 10×/100× ř = 10×/100× ředěný plazmid.*

#### **4.2.15.2 Vnesení pWPXLd-gBCAR a pWPXLd do bakterií Stbl3**

Lentivirový plazmid pWPXLd-gBCAR byl připraven za použití XL-1 Blue bakterií (Agilent) (viz kapitola 5.1). Izolace plazmidu z tohoto bakteriálního kmene ovšem poskytovala velmi nízké výtěžky. Proto byl plazmid pWPXLd-gBCAR a následně i samotný pWPXLd vnesen do kompetentních bakterií Stbl3™ (Thermo Fisher Scientific). Bakterie Stbl3™ se vyznačují nízkou frekvencí rekombinace a jsou vhodné pro množení plazmidů obsahujících dlouhé přímé repetice, které se nacházejí právě v lentivirovém pWPXLd plazmidu. Výtěžky izolované plazmidové DNA z bakterií Stbl3™ již byly dostačující pro provedení veškerých pokusů.

## 5 Výsledky

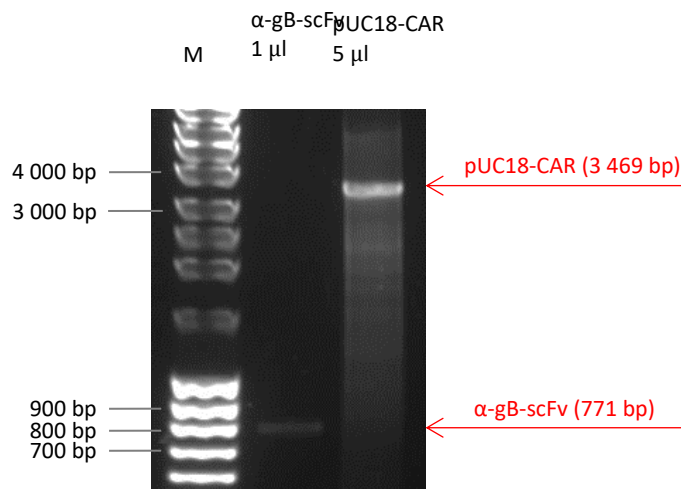
### 5.1 Konstrukce gBCAR a lentivirového vektoru obsahujícího gBCAR

Ke konstrukci gBCAR byla použita syntetická sekvence  $\alpha$ -gB-scFv (GeneArt) odvozená ze sekvence scFv AE11F (Lantto *et al.*, 2002). Signalizační část byla převzata z CAR proti lidské molekule CD19 (CD19-CAR) (Otáhal *et al.*, 2016; Ptáčková *et al.*, 2018). Pro vnášení konstruktů do T lymfocytů byl zvolen lentivirový systém, proto bylo nutné gBCAR po zkonstruování vložit do lentivirového vektoru pWPXLd.

#### 5.1.1 Konstrukce gBCAR v plazmidu pUC18

Jako první krok v přípravě gBCAR bylo nutné v plazmidu pUC18-CD19-CAR nahradit  $\alpha$ -CD19-scFv za syntetický  $\alpha$ -gB-scFv z plazmidu pMA-T.

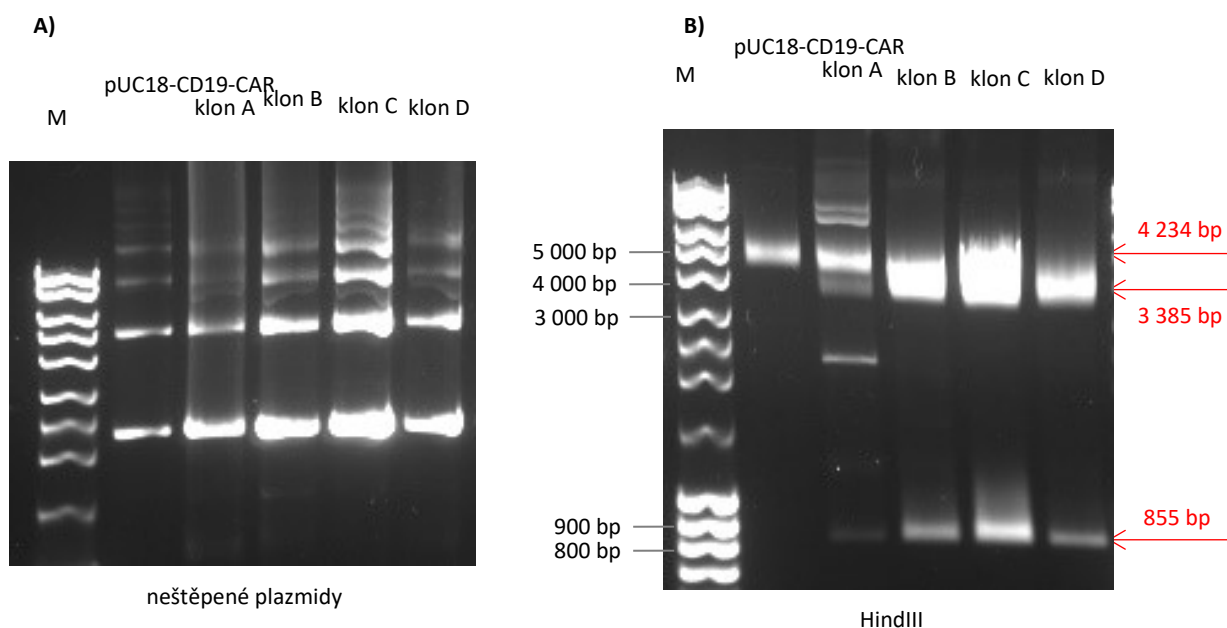
Pro izolaci DNA z gelu bylo štěpeno 6  $\mu$ g plazmidů pMA-T- $\alpha$ -gB-scFv a pUC18-CD19-CAR pomocí restrikčních enzymů MluI a SpeI. Z agarózového gelu byly vyříznuty a izolovány fragmenty  $\alpha$ -gB-scFv (771 bp) a plazmid pUC18 se signalizační částí CAR (3 469 bp, pUC18-CAR). Kvalita izolovaných fragmentů byla ověřena na elektroforéze (viz Obrázek č. 12).



**Obrázek č. 12: DNA fragmenty  $\alpha$ -gB-scFv a pUC18-CAR izolované z gelu a použité pro klonování. Fragmenty byly štěpeny enzymy MluI a SpeI. 0,8% agarózový gel.**

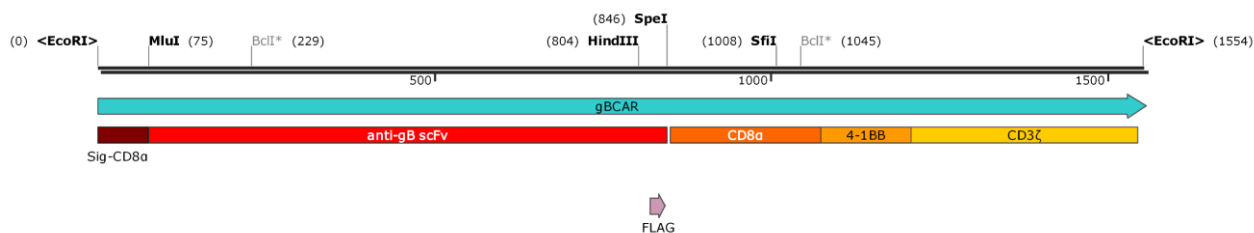
Izolované fragmenty byly ligovány v molárním poměru konců 1 : 3 (vektor : insert) a použity pro transformaci kompetentních XL-1 Blue bakterií. Ze čtyř narostlých kolonií byly vyočkovány bakterie do média LB s ampicilinem. Z části narostlé kultury byly izolovány plazmidy metodou alkalické lyze, zbylý objem kultur byl centrifugován a pelety zamraženy. Pro zjištění úspěšnosti klonování byly izolované plazmidy štěpeny restrikčním enzymem HindIII, kdy byla u původního

pUC18-CD19-CAR očekávána linearizace (4 234 bp) a u plazmidu pUC18-gBCAR vznik fragmentů o délce 855 bp a 3 385 bp. Podle štěpení pomocí enzymu HindIII se všechny klony jevily jako správné, u klonu A proběhlo štěpení jen částečně (viz Obrázek č. 13B). Pro další práci byl vybrán klon D. Ze zamražené bakteriální pelety D byl tedy pomocí komerční soupravy izolován plazmid pUC18-gBCAR obsahující zkonstruovaný gBCAR (viz Obrázek č. 14).



**Obrázek č. 13: Plazmidy izolované z bakteriálních kolonií po transformaci ligační směsí  $\alpha$ -gB-scFv a pUC18-CAR.**

A) neštěpené plazmidy; B) plazmidy štěpené enzymem HindIII, u DNA z klonu A proběhlo štěpení jen částečně. 0,8% agarózový gel.



**Obrázek č. 14: Konstrukt gBCAR**

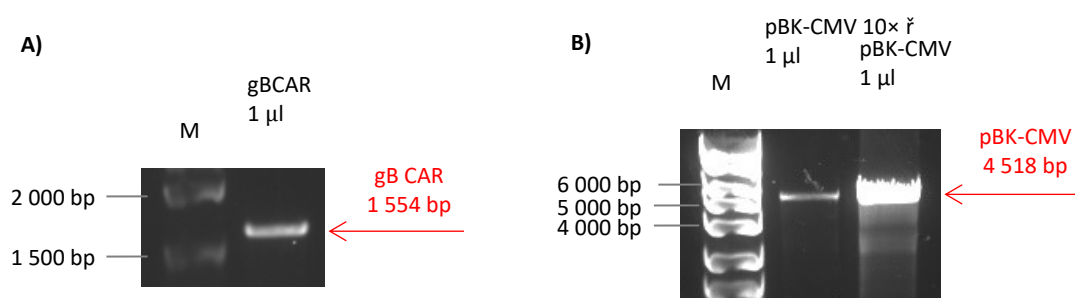
Antigen-vazebnou část gBCAR tvoří upravený AE11F fragment odvozený z lidské neutralizační protilátky (Lantto et al., 2002). Dále CAR obsahuje CD8 $\alpha$  transmembránový řetězec pro ukotvení v membráně a signalizační část tvořenou doménami 4-1BB a CD3 $\zeta$ . Na N konci CAR se nachází signalizační sekvence z CD8 $\alpha$  řetězce pro cílení gBCAR do cytoplazmatické membrány, na C konci scFv fragmentu je kódován epitop FLAG.

### 5.1.2 Konstrukce plazmidu pBK-CMV-gBCAR

gBCAR z plazmidu pUC18 bylo nutné překlonsat do plazmidu pBK-CMV, aby byla získána vhodná restrikční místa pro další klonování do lentivirového a transpozonového plazmidu (viz dále).

Pro izolaci z gelu bylo štěpeno 6  $\mu$ g plazmidu pUC18-gBCAR pomocí enzymu EcoRI. Z agarózového gelu byl vyříznut a izolován fragment gBCAR o délce 1 554 bp.

Dále bylo pro izolaci z gelu štěpeno 10  $\mu$ g plazmidu pBK-CMV pomocí enzymu EcoRI. DNA byla po restrikci defosforylována a nanášena na agarózový gel, ze kterého byl vyříznut a izolován linearizovaný plazmid pBK-CMV o délce 4 518 bp. Kvalita obou izolovaných fragmentů použitých pro klonování byla ověřena na elektroforéze (viz Obrázek č. 15).

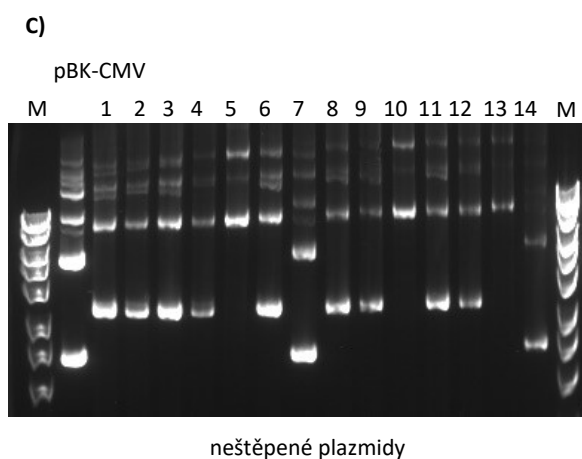
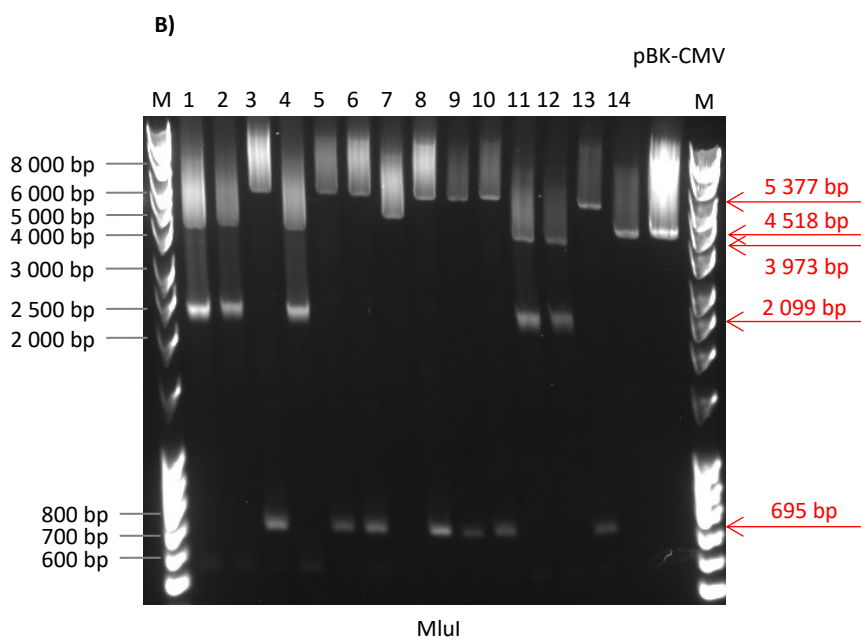
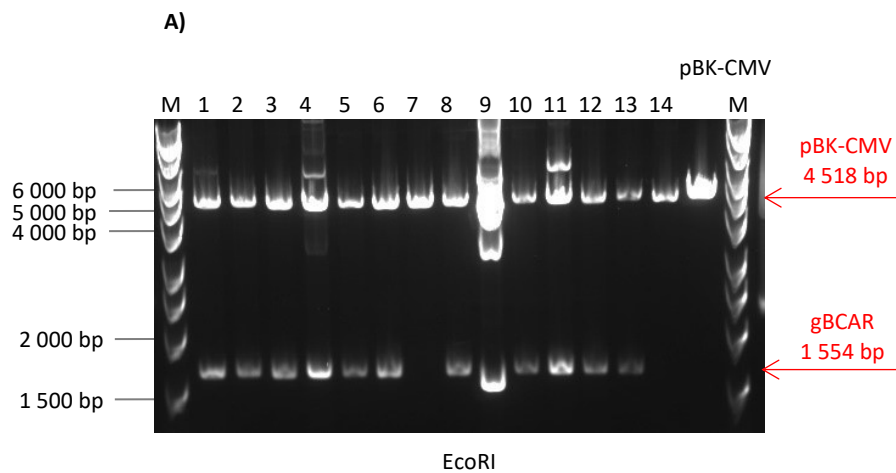


**Obrázek č. 15: DNA fragmenty izolované z gelu a použité pro ligaci gBCAR do plazmidu pBK-CMV.** A) DNA fragment gBCAR izolovaný z gelu; B) linearizovaný plazmid pBK-CMV izolovaný z gelu. Oba fragmenty byly štěpeny pomocí enzymu EcoRI. 0,8% agarózové gely. 10 $\times$  ř = 10 $\times$  ředěný plazmid.

Linearizovaný plazmid pBK-CMV a fragment gBCAR byly ligovány v molárním poměru konců 1 : 3. Po transformaci bakterií XL-1 Blue bylo vyočkováno 14 kolonií do média LB s kanamycinem a z narostlých bakteriálních kultur byly metodou alkalické lyze izolovány plazmidy.

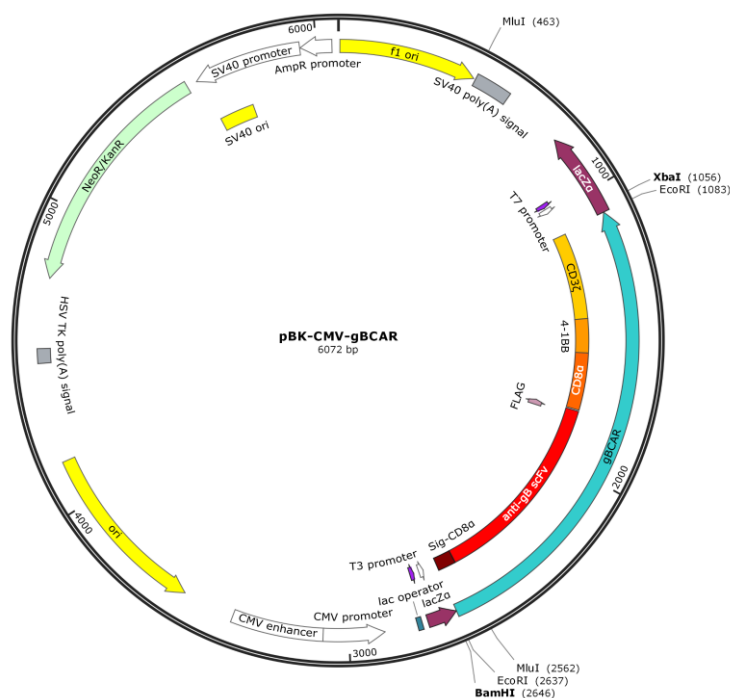
Jelikož se jednalo o neorientované klonování, mohl se gBCAR do plazmidu pBK-CMV zaklonovat ve dvou možných orientacích. Pro ověření orientace inzertu bylo provedeno štěpení pomocí enzymu MluI. Při správné orientaci byly očekávány fragmenty o velikostech 2099 bp a 3973 bp, při špatné orientaci fragmenty o délce 5377 bp a 695 bp. U původního plazmidu pBK-CMV mělo dojít pouze k linearizaci (4 518 bp). Dále bylo provedeno štěpení pomocí enzymu EcoRI, který měl z plazmidu pBK-CMV-gBCAR vyštěpit gBCAR o velikosti 1554 bp.

Restrikční štěpení ukázalo, že klony 1, 2, 4, 11 a 12 obsahovaly gBCAR ve správné orientaci (viz Obrázek č. 16). Pro další práci byla zvolena DNA z klonu 1, kterou byly transformovány bakterie XL-1 Blue, z nichž byl poté pomocí komerční soupravy izolován plazmid pBK-CMV-gBCAR (viz Obrázek č. 17).



**Obrázek č. 16: Plazmidy izolované z bakteriálních kolonií po transformaci ligační směsí gBCAR a pBK-CMV.**

A) plazmidy štěpené enzymem EcoRI; B) plazmidy štěpené enzymem HindIII; C) neštěpené plazmidy. 1% agarózový gel.



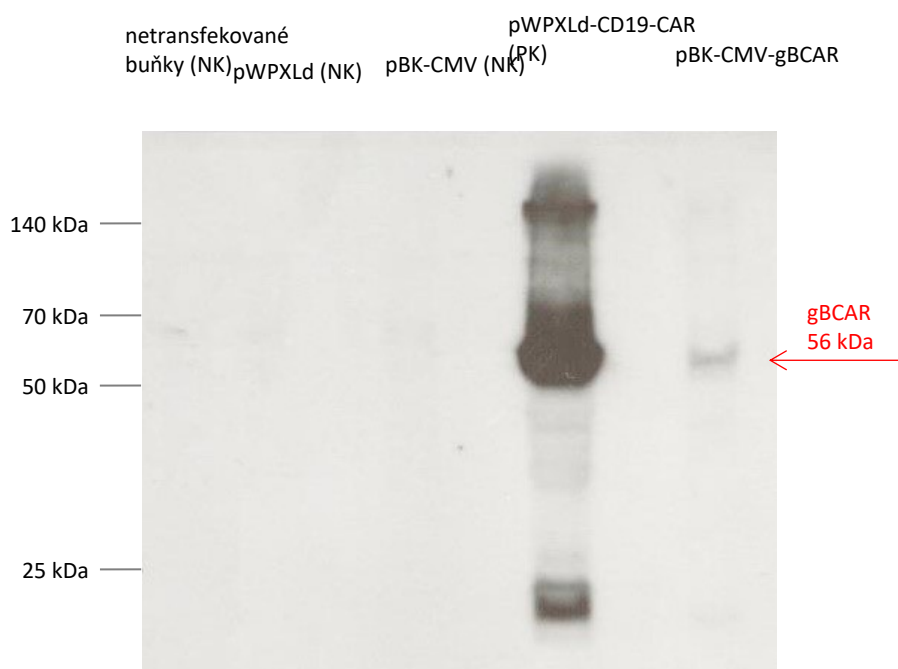
**Obrázek č. 17: Zkonstruovaný plazmid pBK-CMV-gBCAR.**

### 5.1.3 Exprese gBCAR z plazmidu pBK-CMV-gBCAR v buňkách 293T

Před dalším klonováním bylo nutné ověřit, zda je gBCAR z plazmidu pBK-CMV-gBCAR produkován v transfekovaných buňkách.

Pro ověření exprese konstruktů gBCAR byl plazmid pBK-CMV-gBCAR vnesen do buněk 293T pomocí kalcium-fosfátové transfekce. Jako negativní kontroly sloužily buňky netransfekované a transfekované plazmidy pBK-CMV nebo pWPXLd (zároveň vizuální kontrola úspěšnosti transfekce díky produkci GFP). 72 h po transfekci byly buňky lyzovány v Laemmliho pufru a analyzovány metodou western blot. K imunodetekci byla použita primární myší protilátka proti lidskému CD3ζ řetězci ( $\alpha$ -CD3ζ), který se nachází v CAR, a sekundární protilátka  $\alpha$ -mo-HRP. Jako pozitivní kontrola byl použit lyzát z buněk 293T transfekovaných plazmidem pWPXLd obsahujícím CAR proti lidské molekule CD19 (pWPXLd-CD19-CAR). Lyzát byl získán od Mgr. Pavlínky Ptáčkové ze skupiny MUDr. Pavla Otáhal, PhD.

V lyzátu obsahujícím gBCAR byl detekován signál odpovídající molekulové hmotnosti ~56 kDa, který se shodoval se signálem detekovaným v lyzátu s CD19-CAR (viz Obrázek č. 18). Molekulová hmotnost ~56 kDa odpovídala predikované hmotnosti obou molekul CAR podle nástrojů „Translate“ a „Compute pI/Mw“ na internetovém portálu ExPASy (<https://web.expasy.org/translate/>; [https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/); 26. 12. 2017, viz Přílohy). Bylo tedy potvrzeno, že je gBCAR v transfekovaných buňkách produkován, a bylo možné přistoupit k jeho překlonování do lentivirového plazmidu.



**Obrázek č. 18: Detekce gBCAR produkovaného z plasmidu pBK-CMV-gBCAR v buňkách 293T pomocí metody western blot protilátkou  $\alpha$ -CD3 $\zeta$ .**

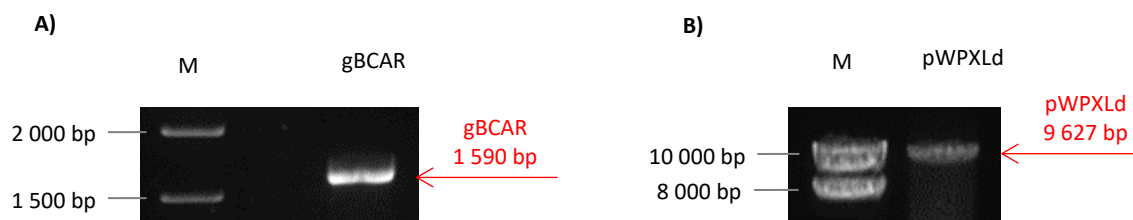
Analýza lyzátů z buněk 293T transfekovaných plasmidy pBK-CMV-gBCAR, pWPXLd-CD19-CAR, pBK-CMV a pWPXLd pomocí kalcium-fosfátu a z buněk netransfekovaných. Použita byla primární protilátka  $\alpha$ -CD3 $\zeta$  (1 : 1 000) a sekundární protilátka  $\alpha$ -mo-HRP (1 : 2 000). Na gel byly nanесeny vzorky po 15  $\mu$ l, pozitivní kontroly z buněk 293T transfekovaných plasmidem pWPXLd-CD19-CAR bylo nanесeno 20  $\mu$ l. Délka expozice: 1 min. 10% separační polyakrylamidový gel. Silnější signál u CD19-CAR vzorku byl způsoben větším množstvím vzorku a silnějším promotorem v plasmidu pWPXLd (EF-1 $\alpha$  promotor) oproti pBK-CMV (CMV promotor). V tomto vzorku jsou rovněž patrné další proužky, které mohou odpovídat multimerům CD19-CAR (nad 140 kDa) nebo rozpadovým produktům (pod 25 kDa). NK = negativní kontrola, PK = pozitivní kontrola.

#### 5.1.4 Konstrukce lentivirového plasmidu pWPXLd-gBCAR

Pro přípravu lentivirů bylo nutné překlonovat gBCAR z plasmidu pBK-CMV do lentivirového plasmidu pWPXLd. Pro tento účel byl plazmid pBK-CMV-gBCAR štěpen pomocí restričních enzymů BamHI a XbaI a plazmid pWPXLd pomocí enzymů BamHI a SpeI, přičemž bylo využito komplementarity restričních míst XbaI a SpeI. Enzymy BamHI a SpeI byl zároveň z plasmidu pWPXLd vyštěpen gen pro GFP, který se v něm přirozeně vyskytuje.

Pro izolaci z gelu bylo štěpeno 10  $\mu$ g plasmidu pBK-CMV-gBCAR pomocí enzymů BamHI a XbaI. Z agarózového gelu byl vyříznut a izolován fragment gBCAR o délce 1590 bp (viz Obrázek č. 19A).

Dále bylo pro izolaci z gelu štěpeno 5  $\mu$ g plasmidu pWPXLd pomocí enzymů BamHI a SpeI. DNA byla nanесena na agarózový gel, ze kterého byl vyříznut a izolován fragment plasmidu pWPXLd o délce 9 627 bp (viz Obrázek č. 19B).

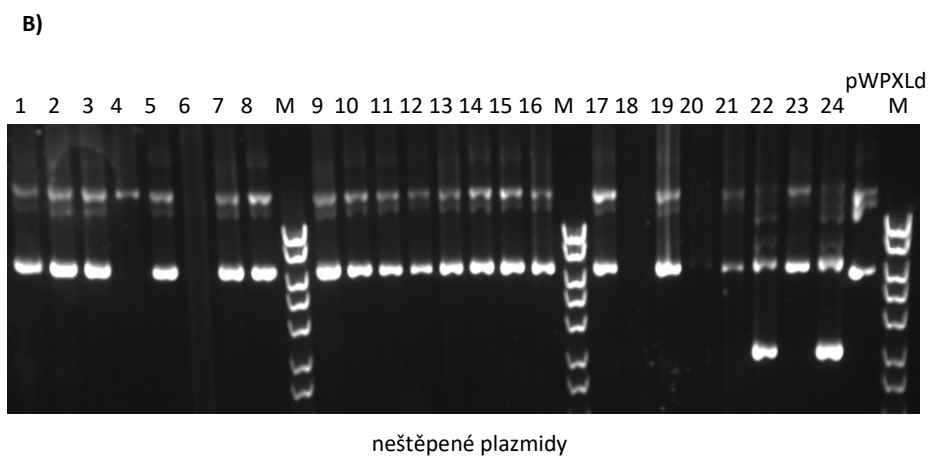
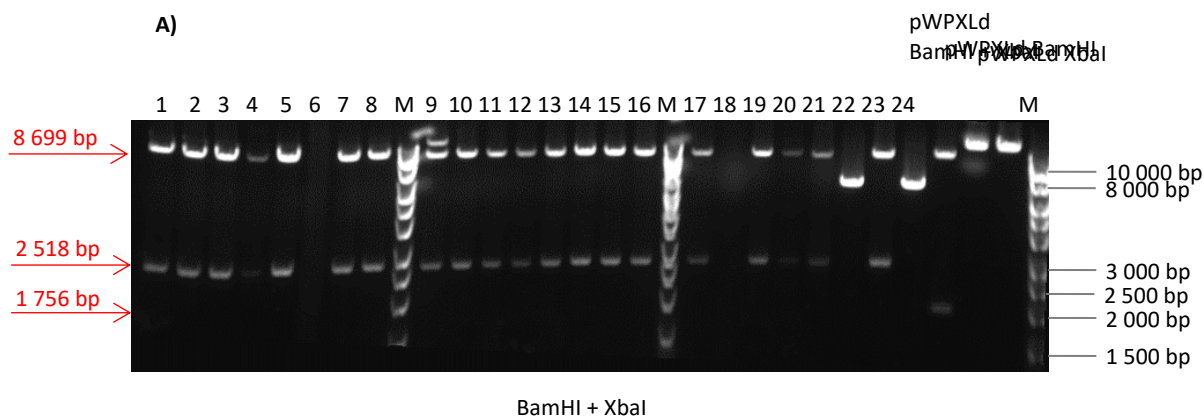


**Obrázek č. 19: DNA fragmenty izolované z gelu a použité pro ligaci gBCAR do plazmidu pWPXLd.**  
 A) DNA fragment gBCAR izolovaný z gelu štěpený enzymy BamHI a XbaI; B) DNA fragment plazmidu pWPXLd izolovaný z gelu štěpený enzymy BamHI a SpeI. 1% (gBCAR) a 0,6% (pWPXLd) agarózový gel.

Izolovaný fragment plazmidu pWPXLd byl defosforylován fosfatázou, která byla následně tepelně inaktivována. Fragmenty pWPXLd a gBCAR byly poté ligovány v molárním poměru konců 1 : 1 a 1 : 4. Po transformaci XL-1 Blue bakterií bylo vyočkováno 24 kolonií do média LB s ampicilinem a z narostlých bakteriálních kultur byly metodou alkalické lyze izolovány plazmidy.

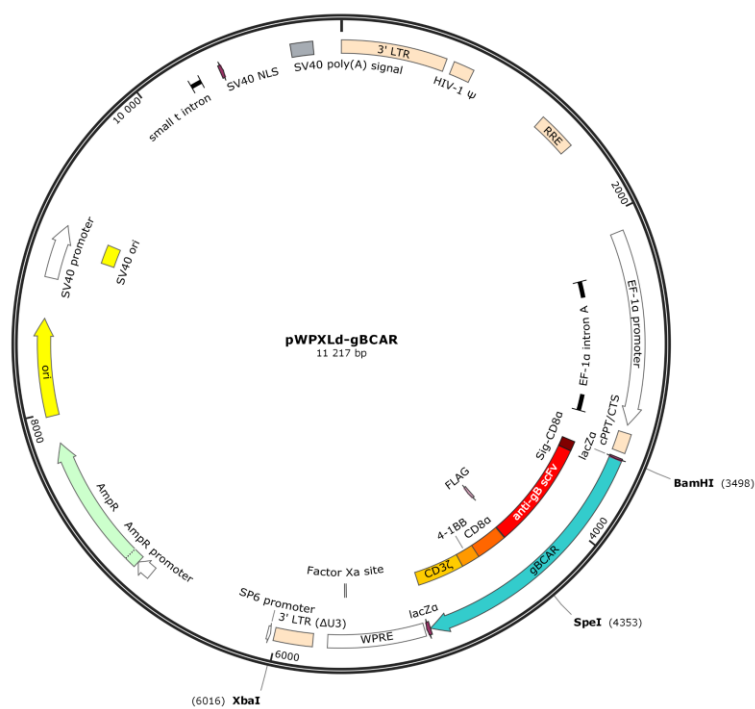
Pro ověření zaklonování gBCAR do pWPXLd bylo provedeno štěpení pomocí enzymů BamHI a XbaI. Při úspěšném zaklonování gBCAR do pWPXLd byly očekávány fragmenty o velikostech 2 518 bp a 8 699 bp. U původního plazmidu pWPXLd byly očekávány fragmenty o velikostech 1 756 bp a 8 699 bp.

Restrikční štěpení ukázalo, že klony 1-5, 7-17, 19-21 a 23 obsahovaly zaklonovaný gBCAR (viz Obrázek č. 20). Pro další práci byla zvolena DNA z klonu č. 5, kterou byly transformovány kompetentní XL-1 Blue bakterie, z nichž byl následně pomocí komerční soupravy izolován plazmid pWPXLd-gBCAR určený pro přípravu lentivirových částic (viz Obrázek č. 21).



**Obrázek č. 20: Plazmidy izolované z bakteriálních kolonií po transformaci ligační směsí gBCAR a pWPXLd.**

A) plazmidy štěpené enzymy BamHI a XbaI; B) neštěpené plazmidy. 0,8% agarózový gel.

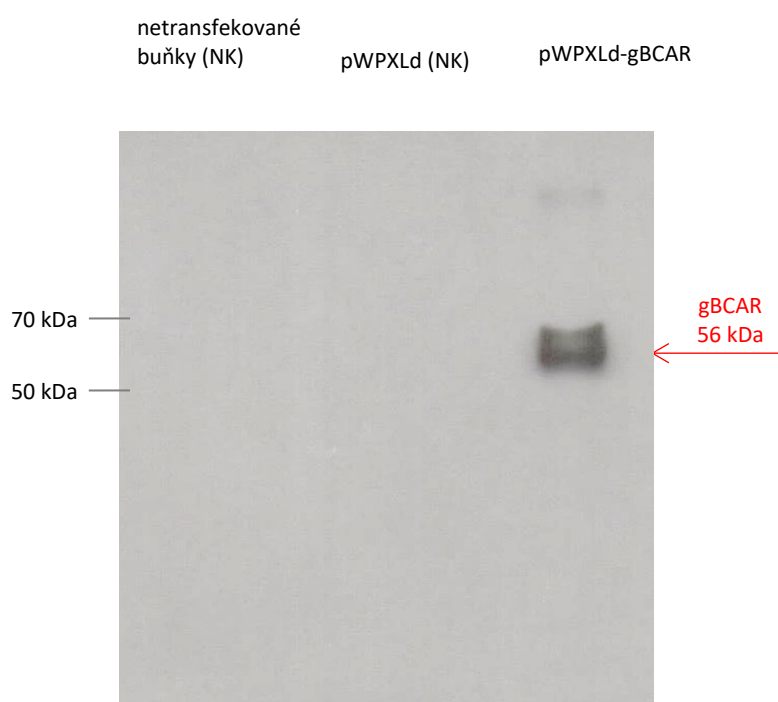


**Obrázek č. 21: Plazmid pWPXLd-gBCAR.**

### 5.1.5 Exprese gBCAR z plazmidu pWPXLd-gBCAR v buňkách 293T

Před samotnou přípravou lentivirových částic bylo nutné ověřit, že se gBCAR z plazmidu pWPXLd produkuje v transfekovaných buňkách.

Plazmid pWPXLd-gBCAR byl vnesen do buněk 293T pomocí činidla Metafectene v poměru 1 : 4 (DNA : Metafectene). Jako negativní kontrola byly použity buňky transfekované plazmidem pWPXLd (GFP) a netransfekované buňky. 48 h po transfekci byly buňky lyzovány v Laemmliho pufru a analyzovány metodou western blot (viz Obrázek č. 22). K imunodetekci byla použita primární protilátka  $\alpha$ -CD3 $\zeta$  a sekundární protilátka  $\alpha$ -mo-HRP. V lyzátu obsahujícím gBCAR byl detekován signál odpovídající predikované velikosti ~56 kDa.

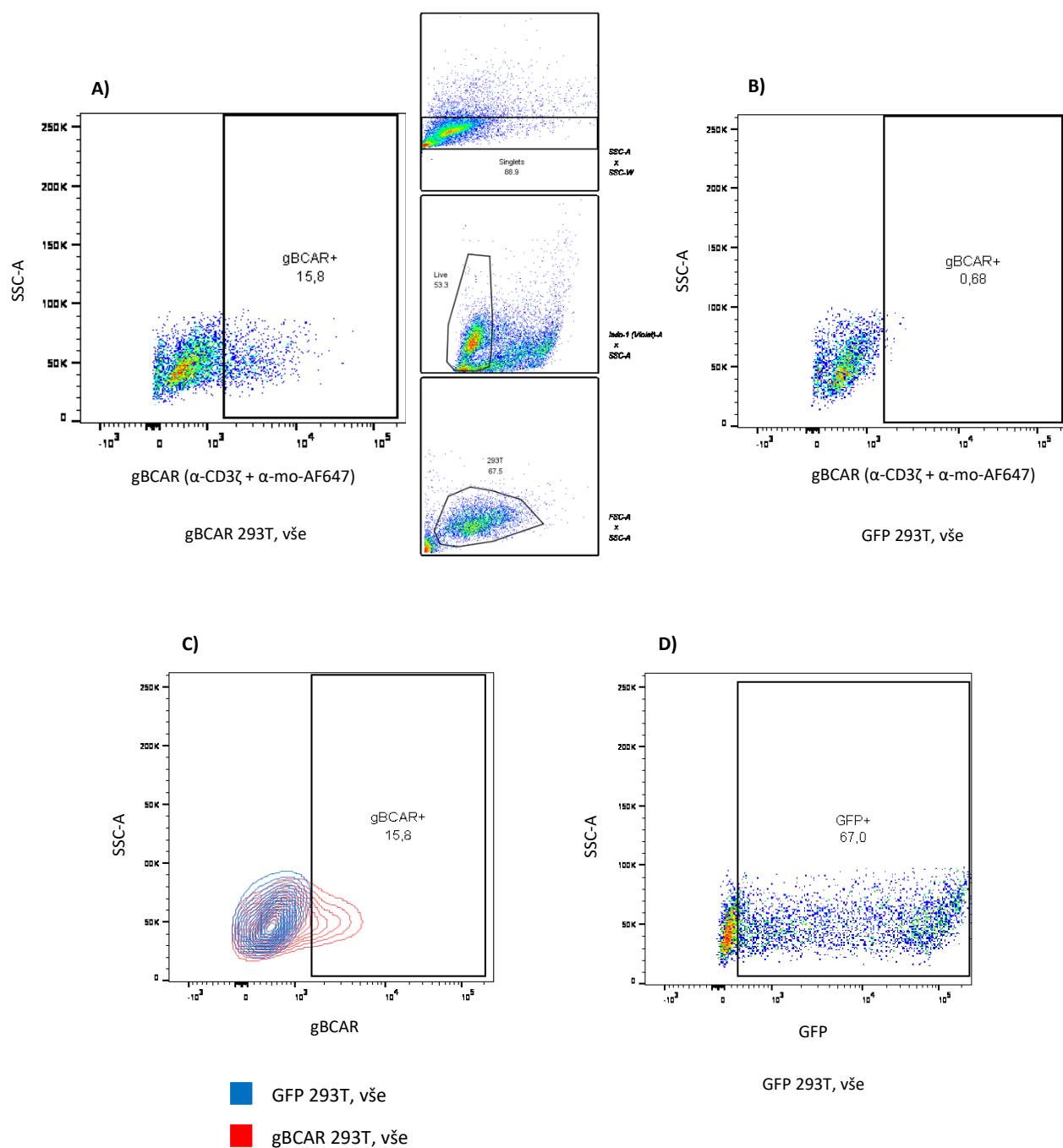


**Obrázek č. 22: Detekce gBCAR produkovaného z plazmidu pWPXLd-gBCAR v buňkách 293T pomocí metody western blot protilátkou  $\alpha$ -CD3 $\zeta$ .**

*Analýza lyzátní z buněk 293T transfekovaných plazmidy pWPXLd-gBCAR a pWPXLd pomocí činidla Metafectene (1 : 4) a z buněk netransfekovaných. Použita byla primární protilátka  $\alpha$ -CD3 $\zeta$  (1 : 2 000) a sekundární protilátka  $\alpha$ -mo-HRP (1 : 2 000). Na gel byly naneseny vzorky po 10  $\mu$ l. Délka expozice: 10 s. 10% separační polyakrylamidový gel. NK = negativní kontrola.*

Produkce gBCAR byla otestována také pomocí průtokové cytometrie. 293T buňky byly transfekovány plazmidem pWPXLd-gBCAR pomocí činidla Metafectene v poměru 1 : 4. Jako kontrola byly použity buňky transfekované plazmidem pWPXLd (GFP) a netransfekované buňky. Po 48 h byly buňky sklizeny a barveny intracelulárně pomocí primární protilátky  $\alpha$ -CD3 $\zeta$  a sekundární protilátky proti myšímú IgG konjugované s Alexa Fluor 647 ( $\alpha$ -mo-AF647). Měření na průtokovém cytometru odhalilo ~15,1 % gBCAR+ buněk (viz Obrázek č. 23).

Produkce gBCAR z plazmidu pWPXLd-gBCAR byla tedy potvrzena pomocí western blotu i průtokové cytometrie a mohlo být přikročeno k přípravě lentivirových částic.



**Obrázek č. 23: Detekce gBCAR produkovaného z plazmidu pWPXLd-gBCAR v buňkách 293T pomocí průtokové cytometrie protilátkou α-CD3ζ.**

Buňky byly připraveny transfekcí pomocí činidla Metafectene v poměru 1 : 4. Byly barveny činidlem L&D a následně intracelulárně primární protilátkou α-CD3ζ (1 μg / 10<sup>6</sup> buněk) a sekundární protilátkou α-mo-AF647 (1 : 200). A) detekce gBCAR v buňkách 293T transfekovaných plazmidem pWPXLd-gBCAR s gateovací strategií pokusu, kompletní barvení; B) detekce gBCAR v kontrolních buňkách transfekovaných plazmidem pWPXLd, kompletní barvení; C) překrytí obrysových grafů A a B; D) detekce GFP v buňkách transfekovaných plazmidem pWPXLd, kompletní barvení.

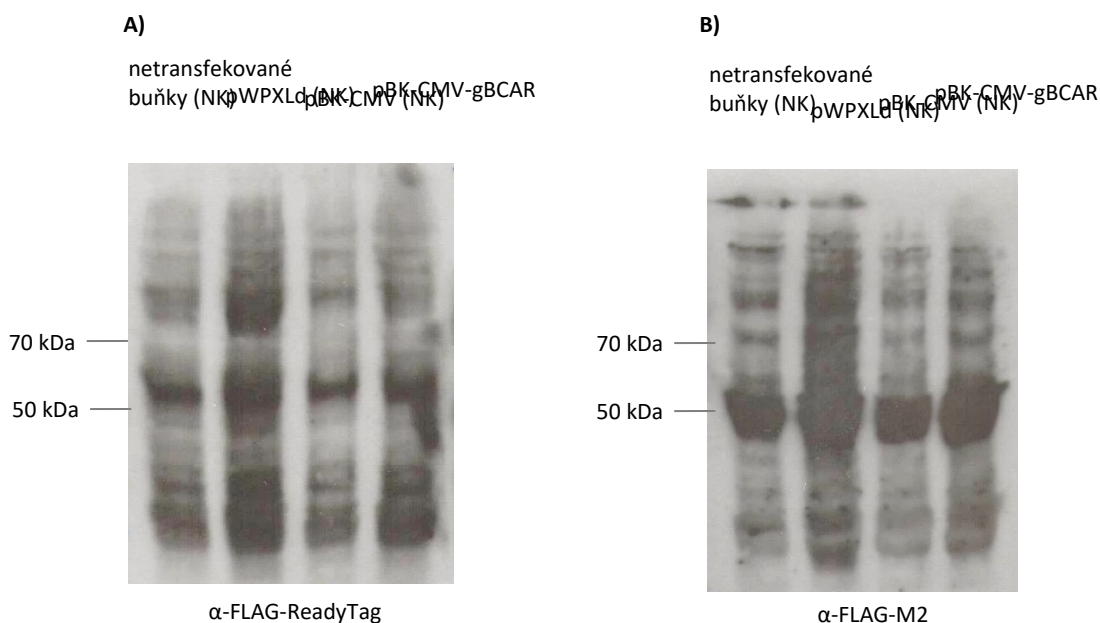
## 5.2 Identifikace vhodné protilátky pro detekci gBCAR na povrchu buněk pomocí průtokové cytometrie

Pro detekci gBCAR v experimentálních buněčných liniích a v cílových T lymfocytech byla zvolena průtoková cytometrie. Pro fungování CAR je nezbytná jeho lokalizace na povrchu buňky. Bylo proto potřeba najít protilátku, která by cílila na extracelulární část molekuly gBCAR a při barvení dokázala podat informaci o přítomnosti gBCAR na buněčné membráně.  $\alpha$ -CD3 $\zeta$  protilátka, která byla použita pro první detekce gBCAR ve 293T buňkách, se váže na intracelulární část molekuly. Navíc by ji nebylo možné použít pro detekci gBCAR v T lymfocytech vzhledem k přítomnosti CD3 $\zeta$  řetězce v TCR. Proto bylo třeba nalézt jinou vhodnou protilátku, kterou by bylo možné použít pro povrchovou detekci gBCAR v T lymfocytech pomocí průtokové cytometrie.

### 5.2.1 Protilátky proti epitopu FLAG

Zkonstruovaná molekula gBCAR obsahuje ve své extracelulární  $\alpha$ -gB-scFv části epitop FLAG (aminokyselinová sekvence DYKDDDDK; viz Obrázek č. 14). Proto byly nejprve vyzkoušeny protilátky proti tomuto epitopu.

Lyzáty z první transfekce buněk 293T pomocí pBK-CMV-gBCAR, ve kterých byla již přítomnost gBCAR potvrzena pomocí protilátky  $\alpha$ -CD3 $\zeta$  (viz kapitola 5.1.3), byly znovu analyzovány metodou western blot ve dvou paralelách. Jedna byla detekována primární myší protilátkou  $\alpha$ -FLAG-ReadyTag, druhá myší protilátkou  $\alpha$ -FLAG-M2. Jako sekundární protilátka byla v obou případech použita protilátka  $\alpha$ -mo-HRP. U obou protilátek proti epitopu FLAG byl ve všech vzorcích viditelný silný nespecifický signál a nebylo možné detekovat žádný proužek okolo 56 kDa, který by se nenalézal v negativních kontrolách (viz Obrázek č. 24).



**Obrázek č. 24: Detekce gBCAR produkovaného z plazmidu pBK-CMV-gBCAR v buňkách 293T pomocí metody western blot primárními protilátkami proti epitopu FLAG.**

Analýza lyzátů z 293T buněk transfekovaných plazmidy pBK-CMV-gBCAR, pBK-CMV, pWXPXd a z buněk netransfekovaných. A) detekce primární protilátkou α-FLAG-ReadyTag (1 : 320), B) detekce primární protilátkou α-FLAG-M2 (1 : 500). V obou případech byla použita sekundární protilátka α-mo-HRP (1 : 2 000). Na gel byly nanесeny vzorky po 25 μl. Ve všech vzorcích je patrný silný nespecifický signál, gBCAR okolo 56 kDa nelze detekovat. Délka expozice: 5 min. 10% separační polyakrylamidový gel. NK = negativní kontrola.

Detekce pomocí protilátek proti epitopu FLAG byla zopakována ještě jednou s lyzáty z buněk 293T transfekovaných plazmidem pWXPXd-gBCAR, ve kterých již byla přítomnost gBCAR potvrzena (viz kapitola 5.1.5). Bylo očekáváno, že silnější promotor v plazmidu pWXPXd (EF-1α) oproti pBK-CMV (CMV) by mohl zajistit vyšší expresi gBCAR v buňkách a umožnit tak jeho detekci. Protilátky byly naředěny dvakrát více než v předchozím pokusu (tj. α-FLAG-ReadyTag 1 : 400 a α-FLAG-M2 1 : 1 000) a i když se podařilo snížit pozadí, opět se nepodařilo detekovat žádný signál okolo 56 kDa specifický jen pro buňky transfekované plazmidem pWXPXd-gBCAR (data neukázána). Ani jedna z protilátek proti epitopu FLAG tedy nedokázala gBCAR na western blotu detekovat.

## 5.2.2 Protilátky proti lidskému IgG

Protilátky proti epitopu FLAG byly tedy opuštěny a pro detekci byly vyzkoušeny protilátky proti molekule lidského IgG a jejím jednotlivým řetězcům.

### 5.2.2.1 Protilátky proti kappa řetězci lidského IgG

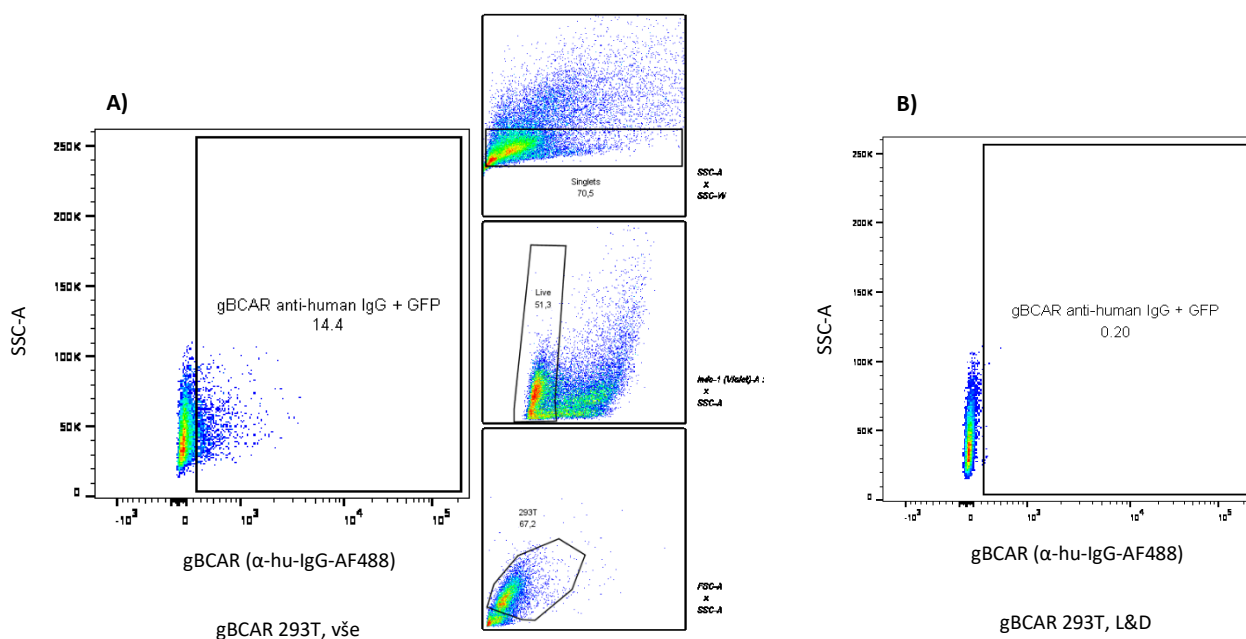
Nejprve byla vyzkoušena myší protilátka proti kappa řetězci lidského IgG konjugovaná s PE. Buňky 293T transfekované plazmidem pWXPXd-gBCAR byly barveny extracelulárně v ředění

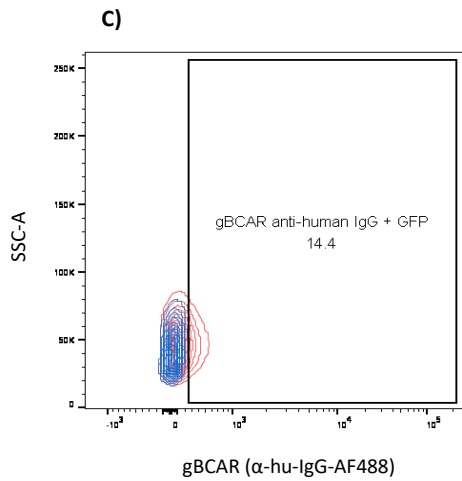
1 : 120 a následně změřeny na průtokovém cytometru, protilátka však nedokázala gBCAR na povrchu buněk detekovat (data neukázána).

### 5.2.2.2 Protilátky proti těžkému a lehkému řetězci lidského IgG

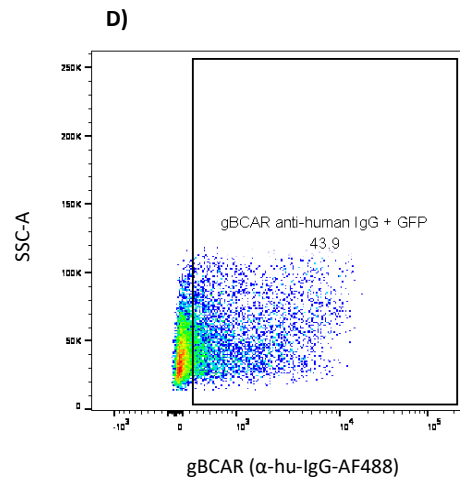
Dále byla vyzkoušena kozí protilátka proti těžkému a lehkému řetězci (H+L) lidského IgG konjugovaná s Alexa Fluor 488 ( $\alpha$ -hu-IgG-AF488).

Buňky 293T byly transfekovány plazmidem pWPXLd-gBCAR pomocí činidla Metafectene v poměru 1 : 2. Jako kontrola byly použity buňky transfekované plazmidem pWPXLd (GFP) nebo buňky netransfekované. Po 48 h byly buňky sklizeny a barveny extracelulárně pomocí  $\alpha$ -hu-IgG-AF488 protilátky a intracelulárně pomocí protilátek  $\alpha$ -CD3 $\zeta$  a  $\alpha$ -mo-AF647 pro analýzu průtokovou cytometrií. Protilátka  $\alpha$ -hu-IgG-AF488 dokázala gBCAR rozpoznat, bylo s ní detekováno ~14,2 % gBCAR+ buněk (viz Obrázek č. 25, A-C). Barvení pomocí protilátek  $\alpha$ -CD3 $\zeta$  a  $\alpha$ -mo-AF647 detekovalo ~12,9 % gBCAR+ buněk (viz Obrázek č. 25, E-G). Bez rozlišení živých a mrtvých buněk bylo při obou barveních nalezeno ~40 % gBCAR+ buněk (viz Obrázek č. 25D a H).

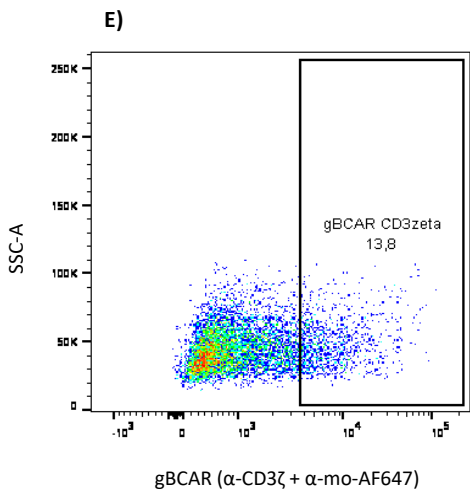




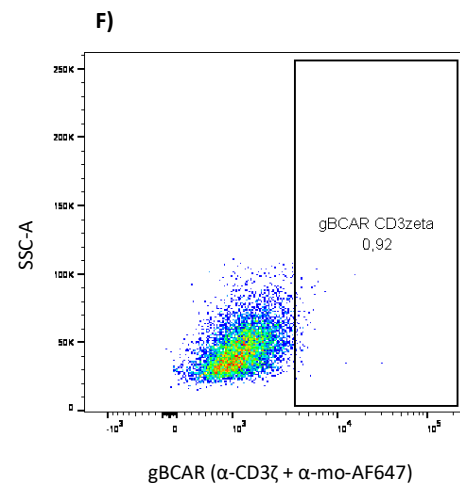
■ gBCAR 293T, L&D  
■ gBCAR 293T, vše



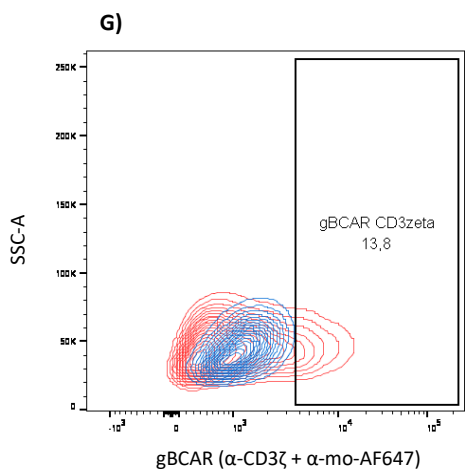
gBCAR 293T,  $\alpha$ -hu-IgG-AF488 bez L&D



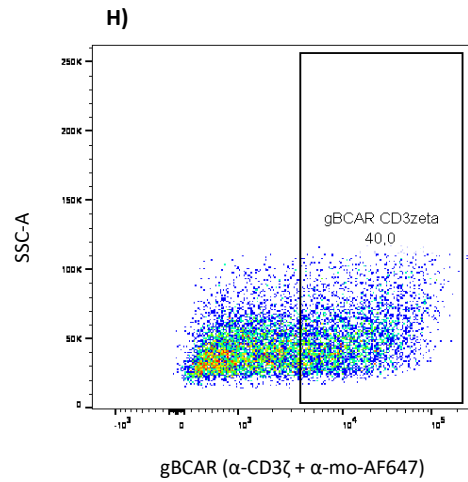
gBCAR 293T, vše



GFP 293T, vše



■ GFP 293T, vše  
■ gBCAR 293T, vše



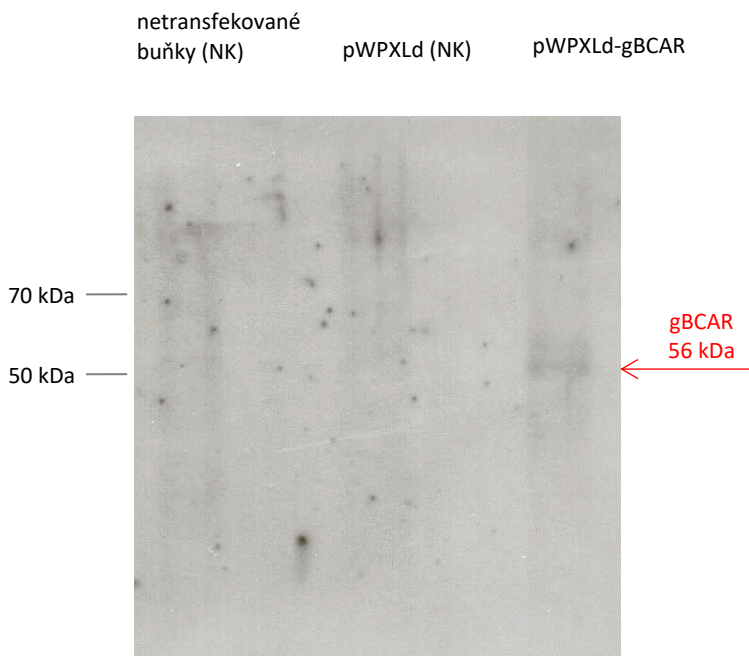
gBCAR 293T,  $\alpha$ -CD3 $\zeta$  +  $\alpha$ -mo-AF647  
bez L&D

**Obrázek č. 25: Detekce gBCAR produkovaného z plazmidu pWPXLd-gBCAR v buňkách 293T průtokovou cytometrií pomocí protilátky  $\alpha$ -hu-IgG-AF488 a dvojice protilátek  $\alpha$ -CD3 $\zeta$  a  $\alpha$ -mo-AF647.**

Buňky byly připraveny transfekcí pomocí činidla Metafectene v poměru 1 : 2. Byly barveny činidlem L&D, dále extracelulárně protilátkou  $\alpha$ -hu-IgG-AF488 a intracelulárně primární protilátkou  $\alpha$ -CD3 $\zeta$  (1  $\mu$ g / 10<sup>6</sup> buněk) a sekundární protilátkou  $\alpha$ -mo-AF647 (1 : 400). A) detekce gBCAR v buňkách 293T transfekovaných plazmidem pWPXLd-gBCAR pomocí protilátky  $\alpha$ -hu-IgG-AF488 s gateovací strategií pokusu, kompletní barvení; B) kontrolní buňky transfekované plazmidem pWPXLd-gBCAR barvené L&D; C) překrytí obrysových grafů A a B; D) detekce gBCAR v buňkách 293T transfekovaných plazmidem pWPXLd-gBCAR pomocí protilátky  $\alpha$ -hu-IgG-AF488 bez L&D; E) detekce gBCAR v buňkách 293T transfekovaných plazmidem pWPXLd-gBCAR pomocí protilátek  $\alpha$ -CD3 $\zeta$  a  $\alpha$ -mo-AF647, kompletní barvení; F) kontrolní buňky transfekované plazmidem pWPXLd, kompletní barvení; G) překrytí obrysových grafů E a F; H) detekce gBCAR v buňkách transfekovaných plazmidem pWPXLd-gBCAR pomocí protilátek  $\alpha$ -CD3 $\zeta$  a  $\alpha$ -mo-AF647 bez L&D.

Pro detekci byla dále vyzkoušena oslí protilátka proti H+L lidského IgG konjugovaná s HRP ( $\alpha$ -hu-IgG-HRP). Test proveden pomocí western blotu.

Na polyakrylamidový gel byly naneseny vzorky lyzátů z transfekce buněk 293T plazmidem pWPXLd-gBCAR (viz kapitola 5.1.5). Po přenesení na nitrocelulózovou membránu byla provedena imunodetekce protilátkou  $\alpha$ -hu-IgG-HRP. V důsledku závady na vyvolávacím přístroji bylo vyvolání provedeno až s odstupem 40 min po přidání substrátu, proto byl získaný signál na fotografickém filmu velmi slabý, přesto však bylo možné ve vzorku s gBCAR nalézt signál v oblasti ~56 kDa odpovídající gBCAR proteinu (viz Obrázek č. 26).

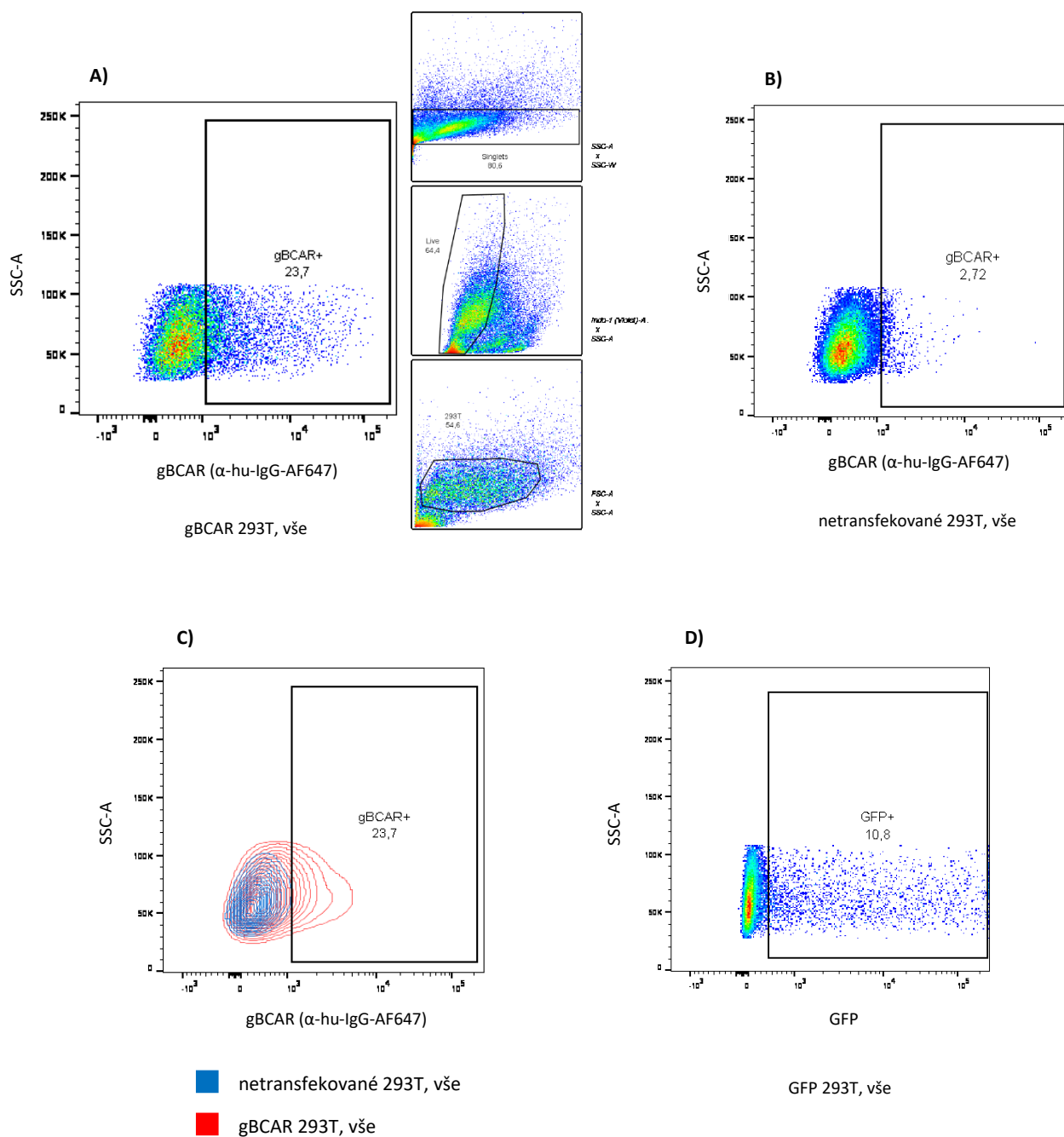


**Obrázek č. 26: Detekce gBCAR produkovaného z plazmidu pWPXLd-gBCAR v buňkách 293T pomocí metody western blot protilátkou  $\alpha$ -hu-IgG-HRP.**

Analýza lyzátů z buněk 293T transfekovaných plazmidy pWPXLd-gBCAR, pWPXLd a z buněk netransfekovaných. Byla použita protilátka  $\alpha$ -hu-IgG-HRP (1 : 10 000). Na gel byly naneseny vzorky po 10  $\mu$ l. Délka expozice: 20 min (od nanesení substrátu po začátek vyvolávání uběhlo 40 min). 10% separační polyakrylamidový gel. NK = negativní kontrola.

Pro otestování na průtokovém cytometru byla protilátka  $\alpha$ -hu-IgG od Jackson ImmunoResearch objednána ve variantě konjugované s flurochromem Alexa Fluor 647 ( $\alpha$ -hu-IgG-AF647).

Buňky 293T byly transfekovány plazmidem pWPXLd-gBCAR pomocí činidla Metafectene v poměru 1 : 3. Jako kontrola byly použity buňky transfekované plazmidem pWPXLd (GFP) nebo buňky netransfekované. Po 48 h byly buňky sklizeny a barveny extracelulárně pomocí protilátky  $\alpha$ -hu-IgG-AF647. Průtokovou cytometrií bylo potvrzeno, že protilátka dokáže gBCAR rozpoznat, když s ní bylo detekováno ~21 % gBCAR+ buněk (viz Obrázek č. 27). Protilátka  $\alpha$ -hu-IgG-AF647 tedy byla dále používána pro povrchovou detekci gBCAR v T lymfocytech.



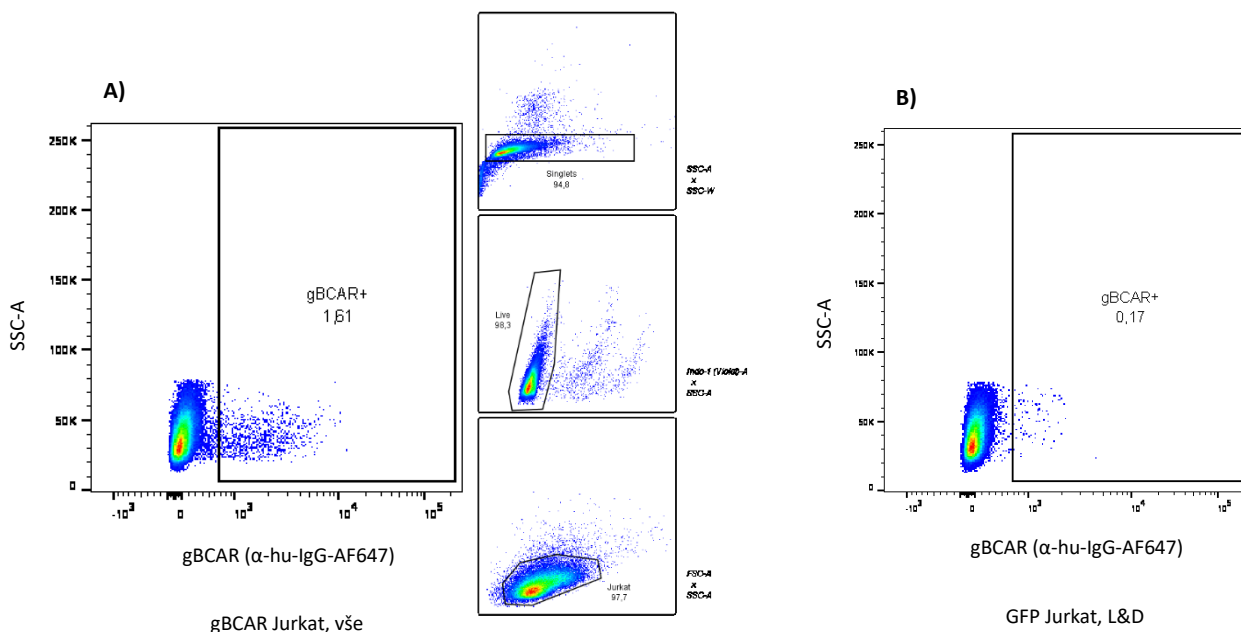
**Obrázek č. 27: Detekce gBCAR produkovaného z plazmidu pWPXLd-gBCAR v buňkách 293T průtokovou cytometrií pomocí protilátky  $\alpha$ -hu-IgG-AF647.**

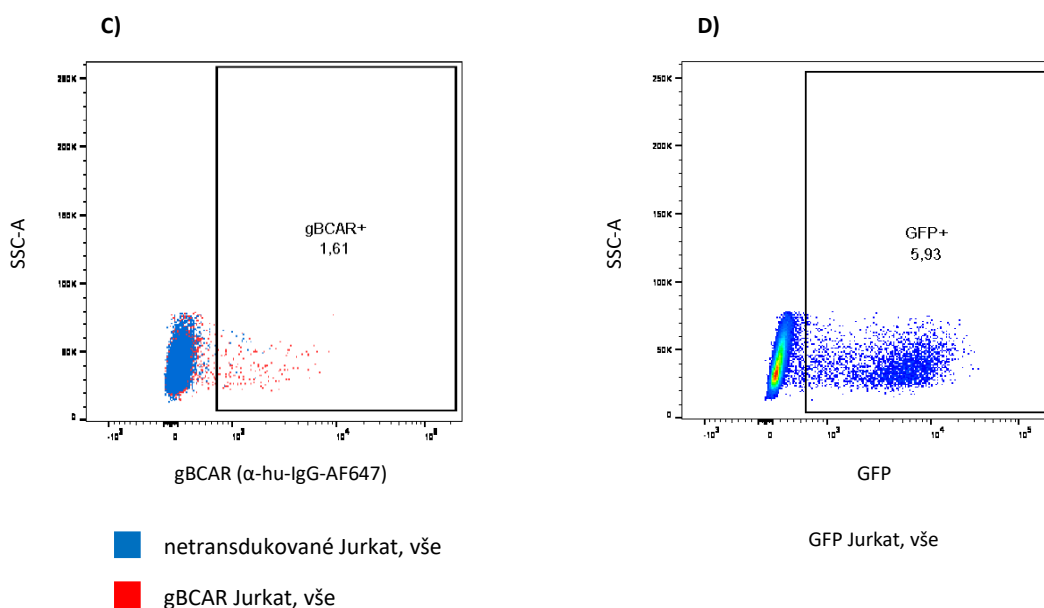
Buňky byly připraveny transfekcí pomocí činidla Metafectene v poměru 1 : 3. Byly barveny činidlem L&D a extracelulárně protilátkou  $\alpha$ -hu-IgG-AF647 (1 : 200). A) detekce gBCAR v buňkách transfekovaných plazmidem pWPXLd-gBCAR pomocí protilátky  $\alpha$ -hu-IgG-AF647 s gateovací strategií pokusu, kompletní barvení; B) kontrolní buňky netransfekované, kompletní barvení; C) překrytí obrysových grafů A a B; D) detekce GFP v buňkách transfekovaných plazmidem pWPXLd, kompletní barvení.

### 5.3 Exprese gBCAR v buňkách Jurkat po transdukci lentiviry

Po nalezení vhodné protilátky pro povrchovou detekci gBCAR bylo přistoupeno k přípravě lentivirových částic. Před transdukcí gBCAR do dárcovských T lymfocytů bylo vyzkoušeno jejich vnesení do buněčné linie T lymfocytů Jurkat.

Byly připraveny lentiviry nesoucí gen pro gBCAR a GFP, kterými byly transdukovány buňky Jurkat. Po 10 dnech byla část buněk odebrána a barvena extracelulárně protilátkou  $\alpha$ -hu-IgG-AF647 pro analýzu průtokovou cytometrií. Bylo detekováno ~8 % gBCAR+ buněk, které ovšem nebyly barveny činidlem L&D, takže zahrnovaly i mrtvé buňky (data neukázána). Buňky byly dále pěstovány v CO<sub>2</sub> inkubátoru po dobu 7 týdnů a poté opět změřeny na průtokovém cytometru. Bylo detekováno ~1,44 % živých stabilně transfekovaných gBCAR+ buněk (viz Obrázek č. 28).





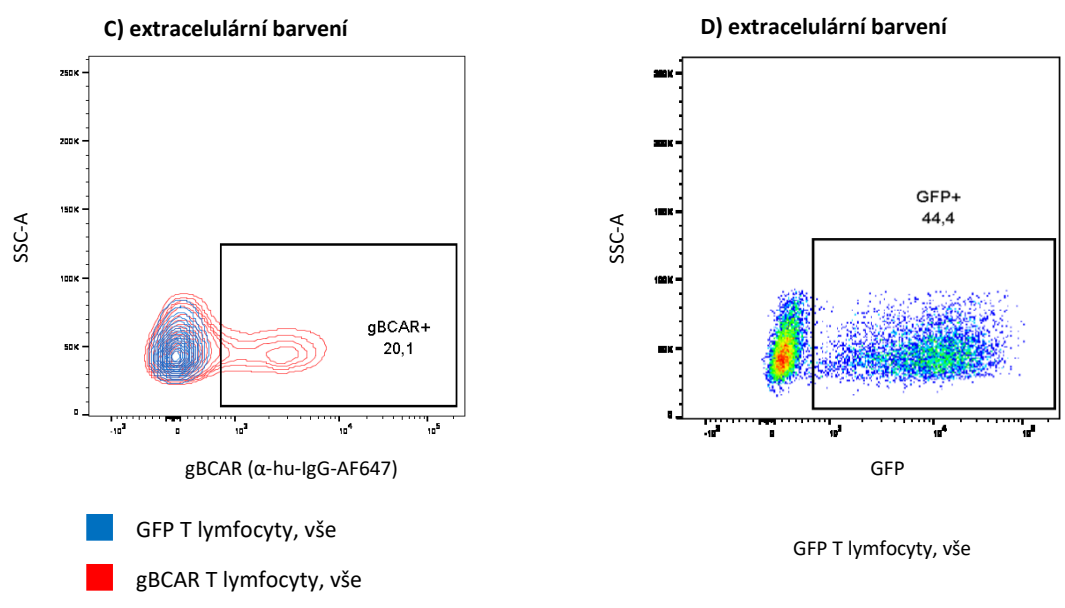
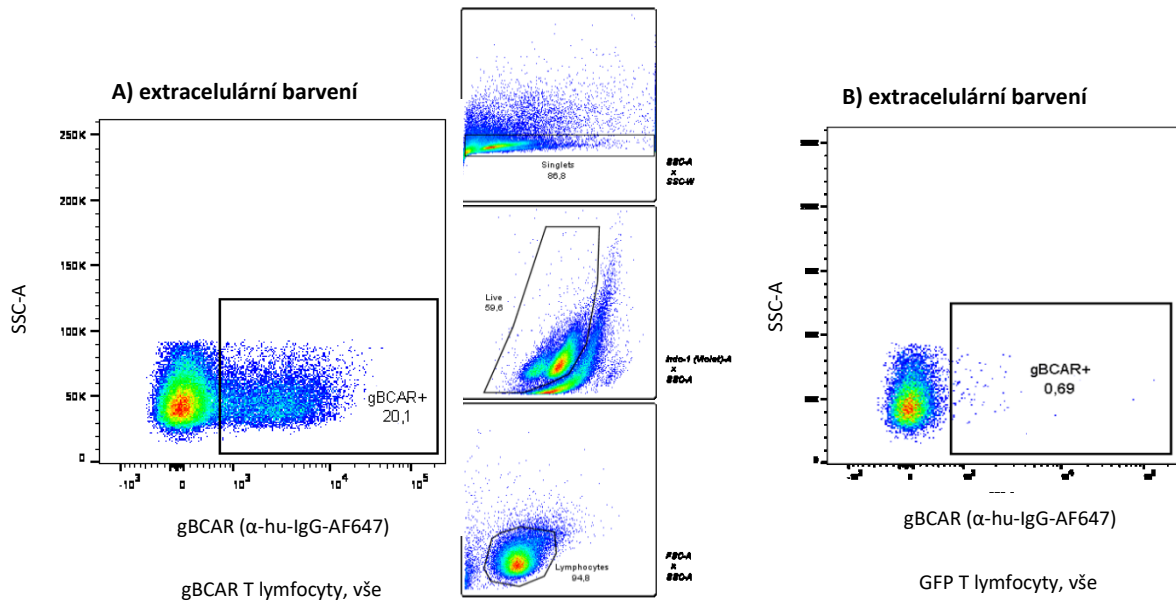
**Obrázek č. 28: Detekce gBCAR pomocí průtokové cytometrie v buňkách Jurkat transdukových lentiviry po dlouhodobé kultivaci.**

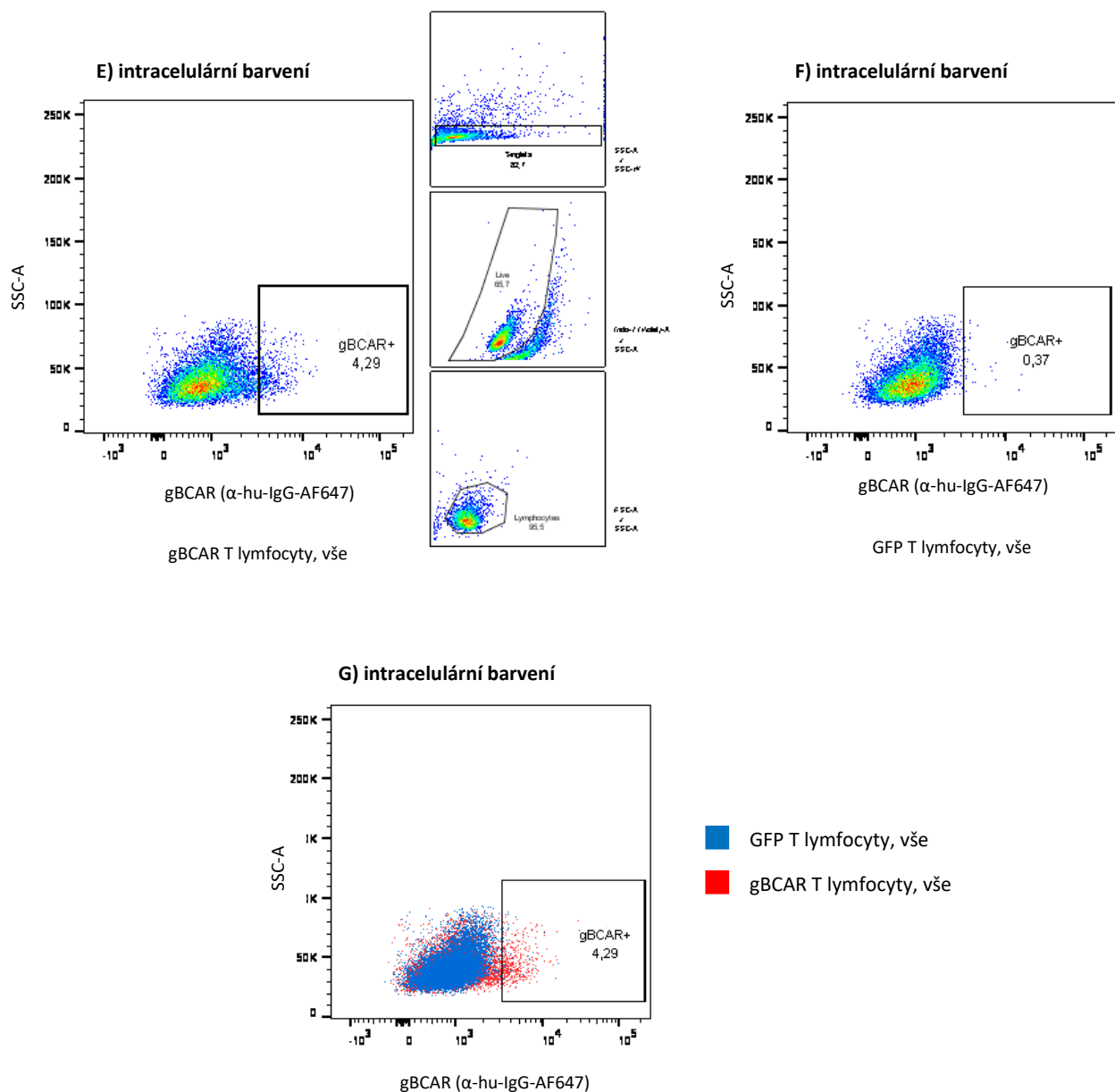
Buňky byly připraveny transdukcí gBCAR/GFP lentiviry. Následně byly pěstovány 7 týdnů v CO<sub>2</sub> inkubátoru a poté změřeny na průtokovém cytometru. Byly barveny činidlem L&D a extracelulárně protilátkou α-hu-IgG-AF647 (1 : 200). A) detekce gBCAR v buňkách transdukových gBCAR lentiviry s gateovací strategií pokusu, kompletní barvení; B) kontrolní buňky transdukové GFP lentiviry barvené L&D; C) překrytí grafů A a B; D) detekce GFP v buňkách transdukových GFP lentiviry, kompletní barvení.

## 5.4 Exprese gBCAR v dárcovských T lymfocytech po transdukcí lentiviry

Po pokusech s buněčnou linií Jurkat bylo přistoupeno k vnášení gBCAR přímo do dárcovských T lymfocytů.

Rozmražené PBMC dárce BC 48 byly ponechány přes noc v CO<sub>2</sub> inkubátoru a druhý den byly transdukovány gBCAR a GFP lentiviry. Po 14 dnech pěstování v RPMI s IL-2 byla část buněk barvena extracelulárně a část intracelulárně protilátkou α-hu-IgG-AF647 pro analýzu průtokovou cytometrií. Pomocí extracelulárního barvení bylo detekováno ~19,4 % gBCAR+ buněk (viz Obrázek č. 29, A-C), intracelulární barvení odhalilo ~3,9 % gBCAR+ (viz Obrázek č. 29, E-G).



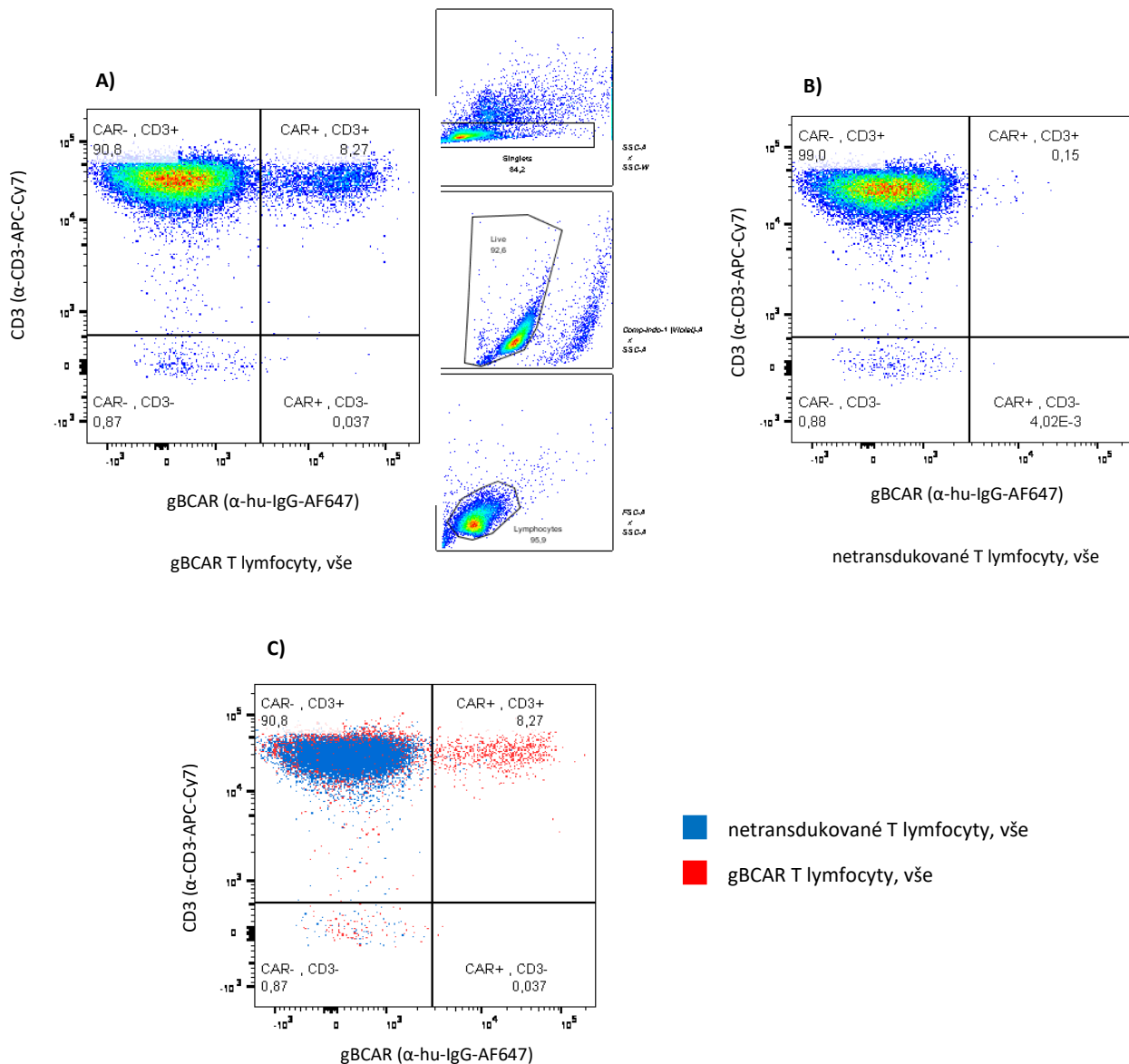


**Obrázek č. 29: Extracelulární a intracelulární detekce gBCAR v rozmražených T lymfocytech transdukováných lentiviry pomocí průtokové cytometrie.**

Buňky byly rozmrazeny a transdukovány gBCAR/GFP lentiviry. Následně byly pěstovány 14 dnů v CO<sub>2</sub> inkubátoru v RPMI s IL-2 a poté byly změřeny na průtokovém cytometru. Buňky byly barveny činidlem L&D a extracelulárně i intracelulárně protilátkou α-hu-IgG-AF647 (1 : 200). A) extracelulární detekce gBCAR v T lymfocytech transdukováných gBCAR lentiviry s gateovací strategií extracelulárních vzorků, kompletní barvení; B) kontrolní buňky transdukované GFP lentiviry kompletně barvené extracelulárně; C) překrytí obrysových grafů A a B; D) detekce GFP v buňkách transdukováných GFP lentiviry, kompletní extracelulární barvení; E) intracelulární detekce gBCAR v T lymfocytech transdukováných gBCAR lentiviry s gateovací strategií intracelulárních vzorků, kompletní barvení; F) kontrolní buňky transdukované GFP lentiviry kompletně barvené intracelulárně; G) překrytí grafů E a F.

Protože v předchozím pokusu nebyla při barvení použita myší protilátka proti lidské molekule CD3 pro určení T lymfocytů (α-CD3-APC/Cy7 nebo α-CD3-BV786), byla znovu provedena transdukce do rozmražených PBMC dárce BC 48. Buňky byly po rozmražení ponechány přes noc

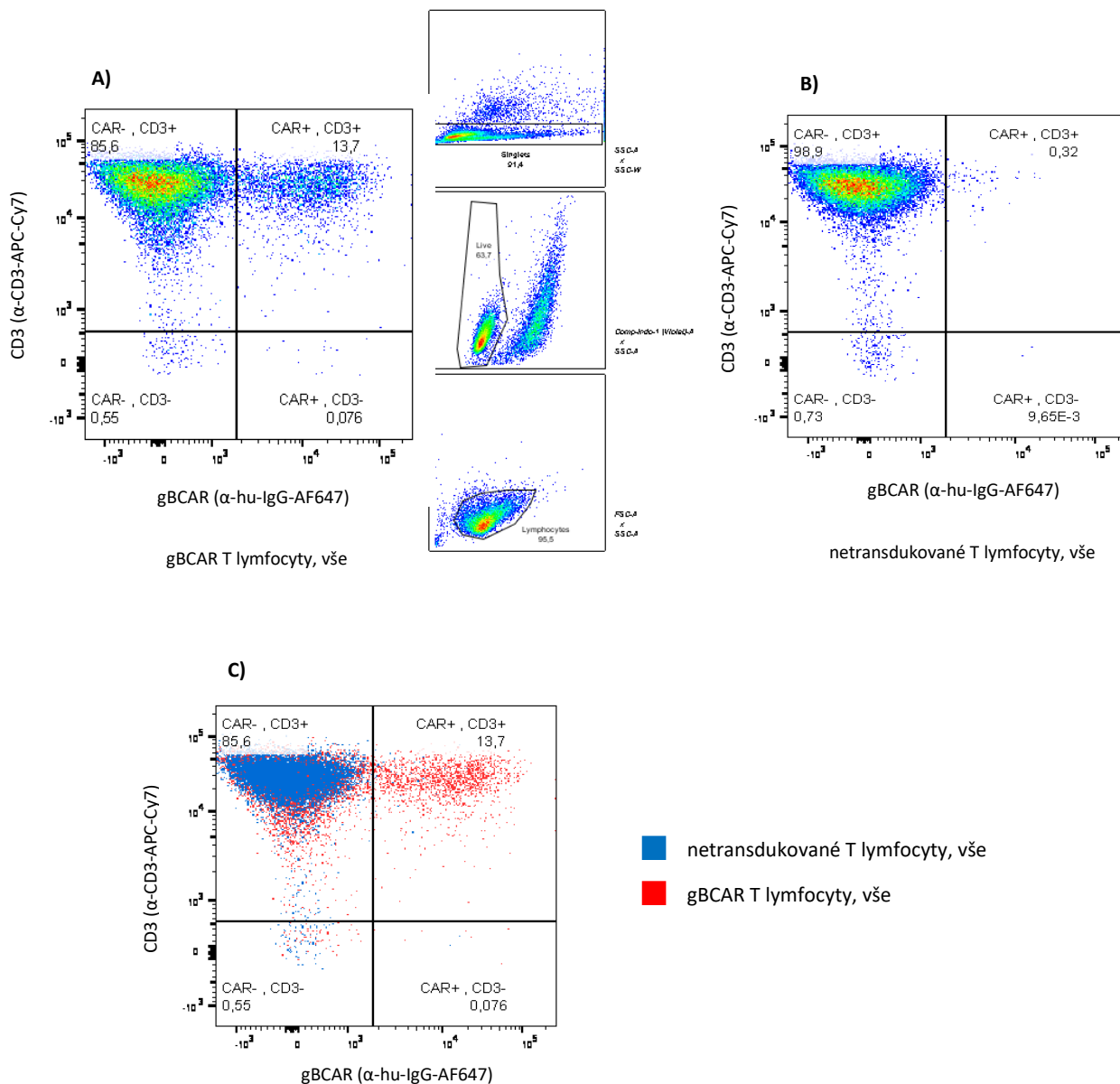
v CO<sub>2</sub> inkubátoru a druhý den transdukovány gBCAR a GFP lentiviry. Buňky byly poté pěstovány 14 dní v RPMI s IL-2 a následně barveny extracelulárně protilátkami  $\alpha$ -CD3-APC/Cy7 a  $\alpha$ -hu-IgG-AF647. Průtokovou cytometrií bylo úspěšně detekováno ~8,1 % gBCAR+ CD3+ buněk (viz Obrázek č. 30). Z buněk vybraných podle grafu FSC-A vs. SSC-A jako T lymfocyty bylo jen asi 1 % CD3-.



**Obrázek č. 30: Detekce gBCAR v rozmražených T lymfocytech transdukováných lentiviry pomocí průtokové cytometrie za využití protilátky proti molekule CD3.**

Buňky byly rozmrazeny a transdukovány gBCAR/GFP lentiviry. Následně byly pěstovány 14 dnů v CO<sub>2</sub> inkubátoru v RPMI s IL-2 a poté byly změřeny na průtokovém cytometru. Buňky byly barveny činidlem L&D a extracelulárně protilátkami  $\alpha$ -hu-IgG-AF647 (1 : 100) a  $\alpha$ -CD3-APC-Cy7 (1  $\mu$ l / 10<sup>6</sup> buněk). A) detekce gBCAR v T lymfocytech transdukováných gBCAR lentiviry s gateovací strategií pokusu, kompletní barvení; B) kontrolní netransdukované buňky kompletně barvené; C) překrytí grafů A a B.

Následně byla vyzkoušena transdukcce gBCAR do čerstvě izolovaných PBMC dárce 58. V den izolace byly buňky transdukovány gBCAR a GFP lentiviry. Buňky byly 14 dní pěstovány v RPMI s IL-2 a poté barveny extracelulárně protilátkami  $\alpha$ -CD3-APC/Cy7 a  $\alpha$ -hu-IgG-AF647, přičemž byla provedena inkubace s 10% lidským sérem v pufru FACS. Průtokovou cytometrií bylo detekováno ~13,4 % gBCAR+ CD3+ buněk (viz Obrázek č. 31). Z buněk vybraných podle grafu FSC-A vs SSC-A jako T lymfocyty bylo méně než 1 % CD3-.



**Obrázek č. 31: Detekce gBCAR v T lymfocytech připravených transdukcí lentivirů do čerstvého PBMC.**

Buňky byly izolovány z čerstvě odebrané krve dárce 58 a transdukovány gBCAR/GFP lentiviry. Následně byly pěstovány 14 dnů v CO<sub>2</sub> inkubátoru v RPMI s IL-2 a poté změřeny na průtokovém cytometru. Buňky byly barveny činidlem L&D a extracelulárně protilátkami  $\alpha$ -hu-IgG-AF647 (1 : 100) a  $\alpha$ -CD3-APC-Cy7 (1  $\mu$ l / 10<sup>6</sup> buněk). A) detekce gBCAR v T lymfocytech transdukováných gBCAR lentiviry s gateovací strategií pokusu, kompletní barvení; B) kontrolní netransdukovávané buňky kompletně barvené; C) překrytí grafů A a B.

## 5.5 Příprava gBCAR T lymfocytů pomocí transpozonového systému piggyBac

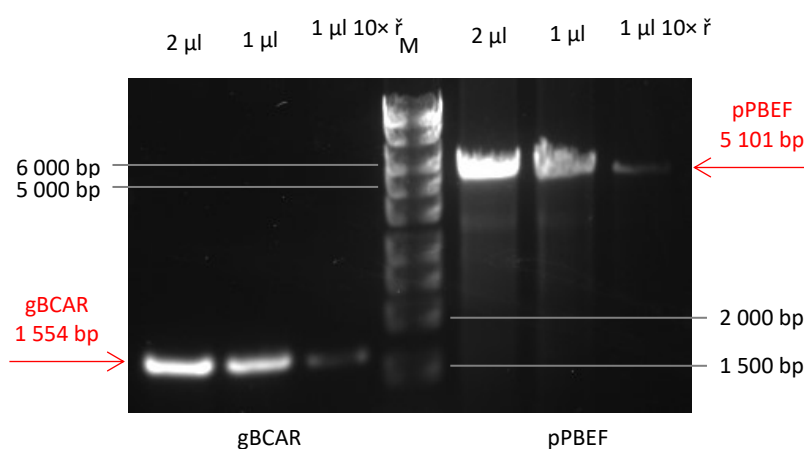
Kromě vnášení gBCAR do T lymfocytů pomocí lentivirových vektorů byl vyzkoušen tzv. piggyBac transpozonový systém. Jedná se o dvojici plazmidů, nosičový plazmid pPBEF a plazmid pBASE kódující enzym transpozázu, která zajistí integraci do genomu buňky, a tedy stabilní transfekci.

### 5.5.1 Konstrukce piggyBac vektoru obsahujícího gBCAR

Nejprve bylo nutné vložit konstrukt gBCAR do nosičového plazmidu pPBEF.

Pro izolaci z gelu bylo štěpeno 8  $\mu\text{g}$  cílového plazmidu pPBEF pomocí enzymu EcoRI. Po štěpení byl enzym tepelně inaktivován, plazmid defosforylován a fosfatáza následně rovněž tepelně inaktivována. Z agarózového gelu byl vyříznut a izolován linearizovaný plazmid o délce 5 101 bp.

Dále bylo pro izolaci z gelu štěpeno 8  $\mu\text{g}$  plazmidu pBK-CMV-gBCAR pomocí enzymu EcoRI. Z agarózového gelu byl vyříznut a izolován fragment gBCAR o délce 1 554 bp. Oba fragmenty použité pro klonování byly následně ověřeny na elektroforéze (viz Obrázek č. 32).



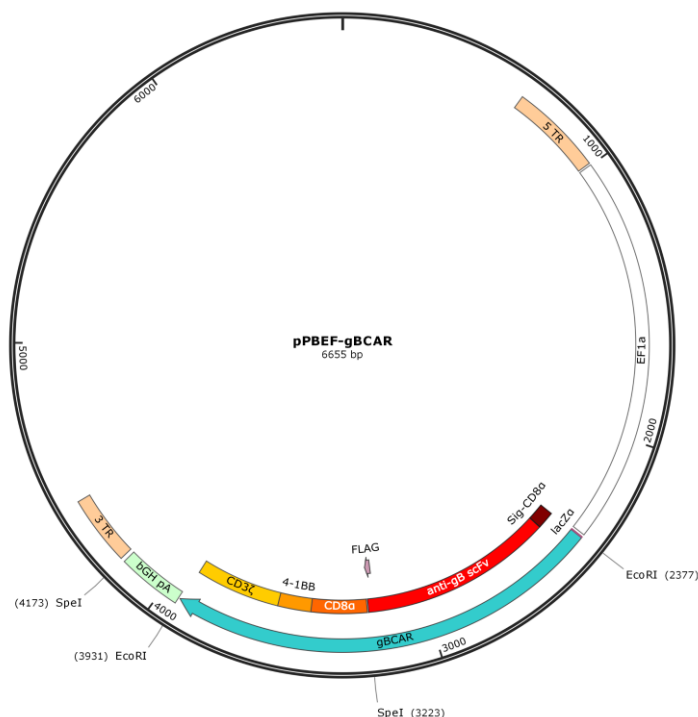
**Obrázek č. 32: DNA fragmenty gBCAR a linearizovaného plazmidu pPBEF izolované z gelu a použité pro klonování.**

Fragmenty byly vyštěpeny enzymem EcoRI. 0,8% agarózový gel. 10 $\times$  ř = 10 $\times$  ředěný plazmid.

Linearizovaný plazmid pPBEF a fragment gBCAR byly ligovány v molárním poměru konců 1 : 3. Po transformaci bakterií XL-1 Blue bylo vyočkováno 10 kolonií do média LB s ampicilinem a z narostlých bakteriálních kultur byly metodou alkalické lyze izolovány plazmidy.

Pro zjištění úspěšnosti zaklonování gBCAR do pPBEF bylo provedeno štěpení plazmidů pomocí enzymu EcoRI. Jelikož se jednalo o neorientované klonování a gBCAR se mohl do plazmidu pPBEF zaklonovat ve dvou možných orientacích, bylo provedeno také štěpení pomocí



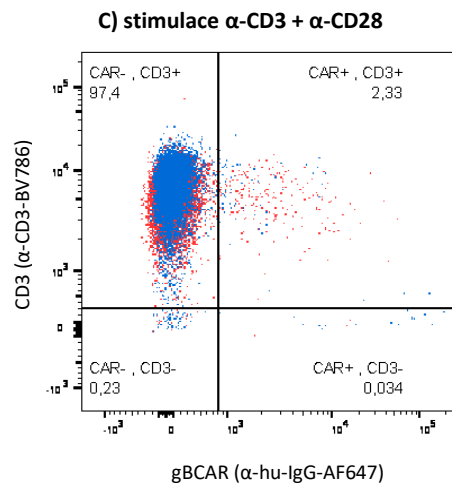
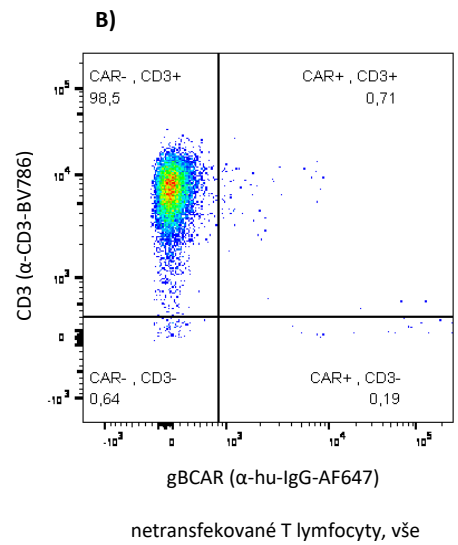
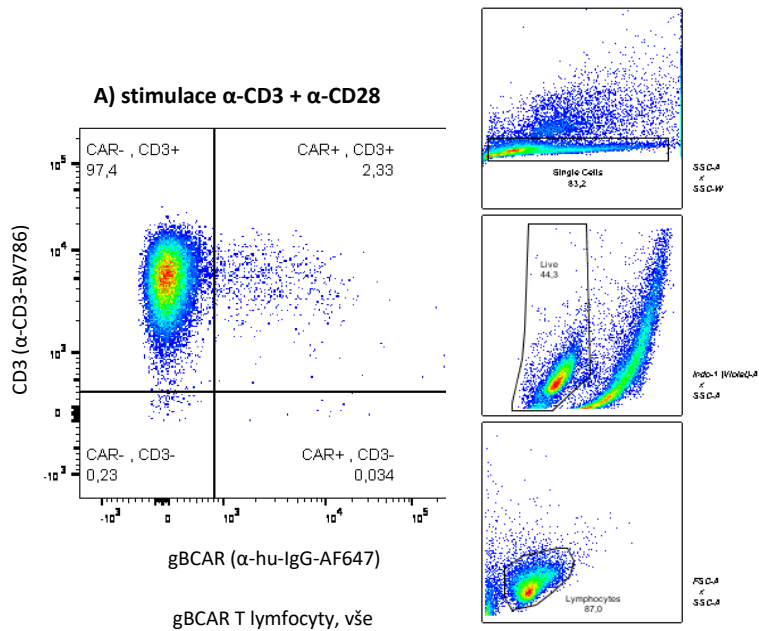


**Obrázek č. 34: Plazmid pPBEF-gBCAR.**

## 5.5.2 Vnesení vektorů piggyBac do T lymfocytů pomocí elektroporace

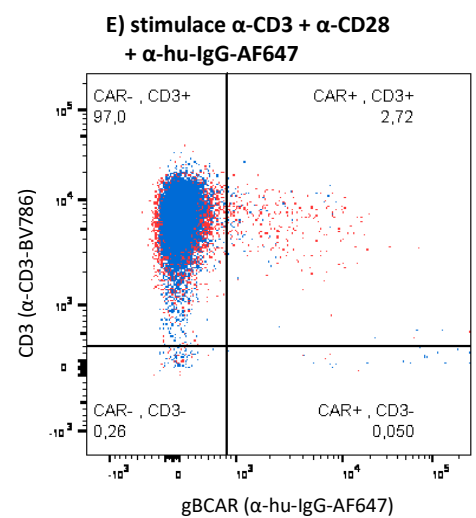
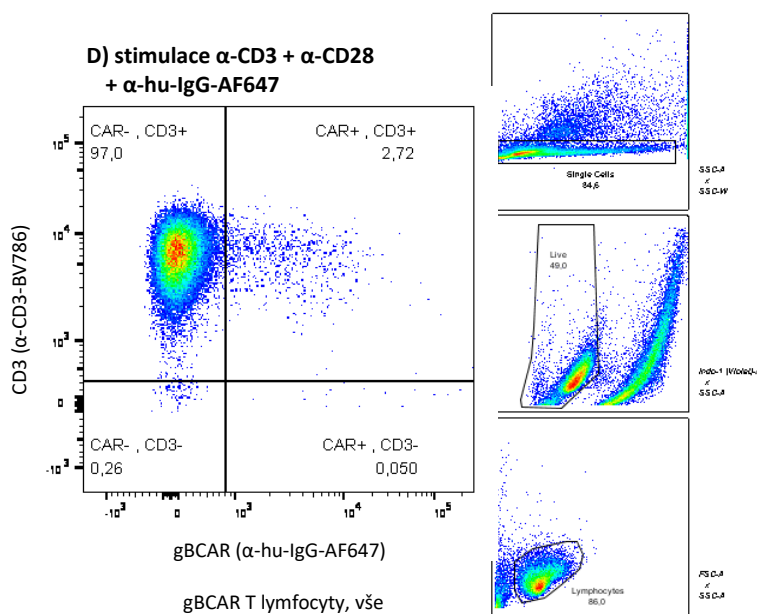
Plazmidy piggyBac systému byly vnášeny do buněk pomocí elektroporátoru Neon®. Čerstvě izolované PBMC dárce 56 byly vedle plazmidu pBASE elektroporovány samotným plazmidem pPBEF-gBCAR nebo kombinací pPBEF-gBCAR a plazmidu pPBEF s CD19-CAR (pPBEF-CD19-CAR). Pro kontrolu elektroporace byl do části buněk elektroporován také plazmid pWPXLd (GFP). Druhý den byly buňky s vneseným samotným pPBEF-gBCAR přeneseny na jamky s adsorbovanými protilátkami  $\alpha$ -CD3 +  $\alpha$ -CD28 (1) nebo  $\alpha$ -CD3 +  $\alpha$ -CD28 +  $\alpha$ -hu-IgG-AF647 (2) nebo  $\alpha$ -hu-IgG-AF647 (3). Po 12 dnech pěstování v médiu CellGro s IL-4 a IL-7 byly všechny buňky barveny extracelulárně protilátkami  $\alpha$ -CD3-BV786 a  $\alpha$ -hu-IgG-AF647, přičemž byla provedena inkubace s 10% lidským sérem v pufru FACS. Následovalo měření na průtokovém cytometru.

Ve vzorku stimulovaném dvojicí protilátek  $\alpha$ -CD3 +  $\alpha$ -CD28 bylo detekováno ~1,6 % gBCAR+ CD3+ buněk (viz Obrázek č. 35, A-C), ve vzorku stimulovaném trojicí protilátek  $\alpha$ -CD3 +  $\alpha$ -CD28 +  $\alpha$ -hu-IgG-AF647 byla detekována ~2 % gBCAR+ CD3+ buněk (viz Obrázek č. 35B, D a E). Ve vzorku stimulovaném samotnou  $\alpha$ -hu-IgG-AF647 protilátkou a ve vzorku elektroporovaném zároveň plazmidy pPBEF-gBCAR a pPBEF-CD19-CAR bylo detekováno pouze 4-8 % živých buněk, tyto vzorky proto nebyly vyhodnoceny.



■ netransfekované T lymfocyty, vše

■ gBCAR T lymfocyty, vše



■ netransfekované T lymfocyty, vše

■ gBCAR T lymfocyty, vše

**Obrázek č. 35: Detekce gBCAR v T lymfocytech připravených elektroporací čerstvých PBMC a následně stimulovaných protilátkami.**

Buňky byly izolovány z čerstvě odebrané krve dárce 56 a elektroporovány příslušnými plazmidy systému piggyBac (pBASE a pPBEF-gBCAR + případně pPBEF-CD19-CAR) nebo kontrolním GFP plazmidem pWPXLd na přístroji Neon®. Druhý den byly přemístěny na destičku s navázanou kombinací protilátek  $\alpha$ -CD3 /  $\alpha$ -CD28 /  $\alpha$ -hu-IgG-AF647. T lymfocyty byly pěstovány 12 dnů v CO<sub>2</sub> inkubátoru v CellGro s IL-4 a IL-7 a poté byly změřeny na průtokovém cytometru. Buňky byly barveny činidlem L&D a extracelulárně protilátkami  $\alpha$ -CD3-BV786 (1  $\mu$ l / 10<sup>6</sup> buněk) a  $\alpha$ -hu-IgG-AF647 (1 : 200). A) detekce gBCAR v T lymfocytech elektroporovaných plazmidem pPBEF-gBCAR a následně stimulovaných protilátkami  $\alpha$ -CD3 +  $\alpha$ -CD28, gateovací strategie, kompletní barvení; B) kontrolní netransfekované a nestimulované buňky kompletně barvené; C) překrytí grafů A a B; D) detekce gBCAR v T lymfocytech elektroporovaných plazmidem pPBEF-gBCAR a následně stimulovaných protilátkami  $\alpha$ -CD3 +  $\alpha$ -CD28 +  $\alpha$ -hu-IgG-AF647, gateovací strategie, kompletní barvení; E) překrytí grafů D a B.

Vedle elektroporace čerstvých PBMC byla vyzkoušena elektroporace také do rozmražených PBMC dárce ZV 34/2, které byly ponechány přes noc v CO<sub>2</sub> inkubátoru, a do rozmražených ZV 34/2 buněk stimulovaných mixem peptidů z lidského adenoviru sérotypu 3 (HAdV-3), na který daný dárce dobře odpovídal. Ani v jednom případě však buňky nepřežily (data neukázána).

Vzhledem k horším výsledkům přípravy gBCAR T lymfocytů pomocí systému piggyBac v porovnání s lentivirovými vektory byl pro přípravu gBCAR T lymfocytů pro funkční testování zvolen návrat k použití lentivirových vektorů.

## **5.6 Příprava cílových buněk exprimujících gB**

Pro testování funkčnosti gBCAR T lymfocytů bylo potřeba připravit cílové buňky exprimující na svém povrchu gB.

### **5.6.1 Příprava cílových buněk pomocí elektroporace**

Jako cílové buňky měly být použity suspenzní buňky K562 transfekované plazmidem pBK-CMV-gB, který byl v laboratoři připraven v minulosti. Byly provedeny dvě elektroporace na elektroporátoru Bio-Rad Gene Pulser® II, ani jedna z nich se však nezdařila natolik, aby bylo možné na povrchu buněk detekovat gB pomocí průtokové cytometrie (data neukázána).

### **5.6.2 Příprava cílových buněk pomocí lentivirové transdukce**

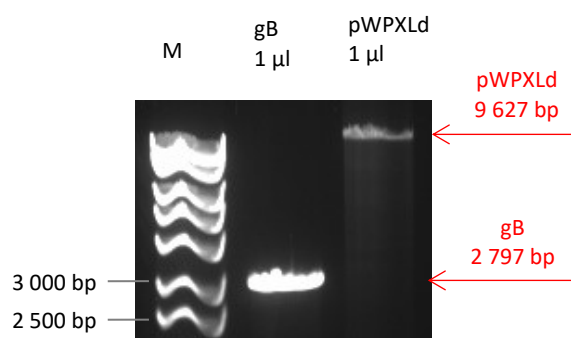
Protože se opakovaně nedařilo připravit cílové buňky elektroporací plazmidu pBK-CMV-gB, byla jako alternativní postup zvolena příprava lentivirů kódujících gB, které měly zároveň umožnit přípravu buněčné linie exprimující gB stabilně.

### 5.6.2.1 Konstrukce lentivirového plazmidu pWPXLd-gB

Nejprve bylo tedy nutné vyštěpit gen pro gB z plazmidu pBK-CMV-gB a vložit jej do plazmidu pWPXLd.

Pro izolaci z gelu bylo štěpeno 10 µg plazmidu pBK-CMV-gB pomocí enzymů BamHI a XbaI. Z agarózového gelu byl vyříznut a izolován fragment gB o délce 2 797 bp, který byl následně ověřen na elektroforéze (viz Obrázek č. 36).

U plazmidu pWPXLd byla použita DNA štěpená pomocí enzymů BamHI a SpeI, která byla izolovaná z gelu a využita již pro klonování gBCAR do pWPXLd (viz kapitola 5.1.4.). Kvalita DNA byla ověřena na elektroforéze (viz Obrázek č. 36).



**Obrázek č. 36: DNA fragmenty gB a plazmidu pWPXLd izolované z gelu a použité pro klonování.**

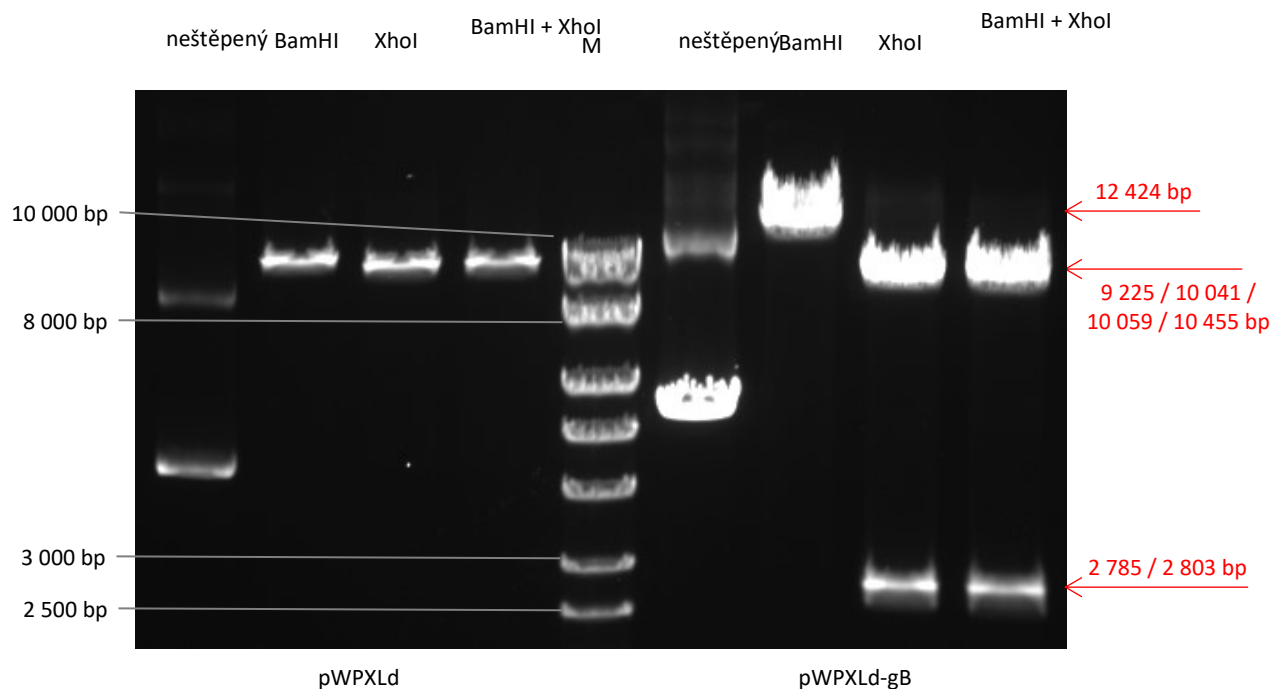
Fragment gB byl štěpen enzymy BamHI a XbaI, fragment pWPXLd enzymy BamHI a SpeI. 0,8% agarózový gel.

Fragmenty pWPXLd a gB byly ligovány v molárním poměru konců 1 : 3. Po transformaci bakterií XL-1 Blue bylo vyočkováno 8 kolonií do média LB s ampicilinem a z narostlých bakteriálních kultur byly metodou alkalické lyze izolovány plazmidy.

Pro ověření úspěšného zaklonování gB do pWPXLd bylo provedeno štěpení pomocí enzymu XhoI. Štěpení neproběhlo příliš dobře, ale naznačilo, že by klon 1 mohl obsahovat zaklonovaný gB (data neukázána). Bylo tedy rozhodnuto vložit plazmid z klonu 1 do bakterií a ověřit jej následně.

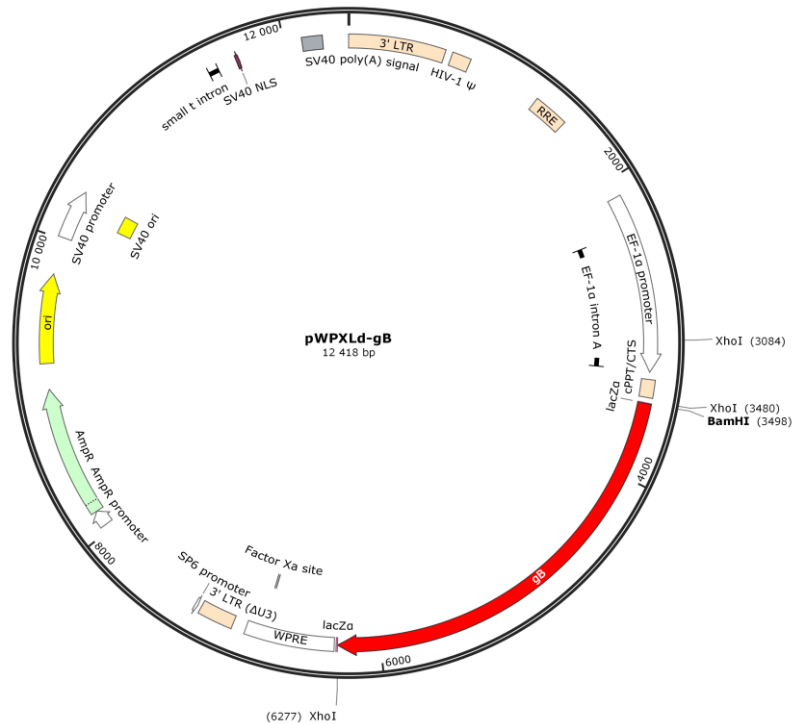
Plazmidem z klonu 1 byly tedy transformovány kompetentní bakterie Stbl3. Jedna z vyrostlých kolonií byla zaočkována do média LB s ampicilinem a z narostlé kultury byla izolována DNA pomocí komerční soupravy. Izolovaná DNA byla ověřena restrikcí štěpením pomocí enzymů BamHI a XhoI. Plazmid pWPXLd-gB měl být těmito enzymy rozštěpen na fragmenty o délce 18 bp, 396 bp, 2 785 bp a 9 225 bp. Samotný enzym BamHI měl způsobit linearizaci (12 424 bp) a XhoI rozštěpení na fragmenty o délce 396 bp, 2 803 bp a 9 225 bp. Dvojitě štěpení původního plazmidu pWPXLd mělo poskytnout fragmenty o délce 18 bp, 396 bp a 10 041 bp. Samotný enzym BamHI měl způsobit linearizaci (10 455 bp) a XhoI rozštěpení na fragmenty o délce 396 bp a 10 059 bp. Analýza na elektroforéze potvrdila, že plazmid obsahuje

gBCAR inzert, když byl při dvojitém štěpení a štěpení pomocí XhoI pozorován fragment o velikosti okolo 2 800 bp, který nebyl u původního plazmidu patrný (viz Obrázek č. 37). Bylo tedy možné plazmid pWPXLd-gB použít pro přípravu lentivirů (viz Obrázek č. 38).



**Obrázek č. 37: Ověření úspěšnosti přípravy plazmidu pWPXLd-gB pomocí štěpení enzymy BamHI a/nebo XhoI.**

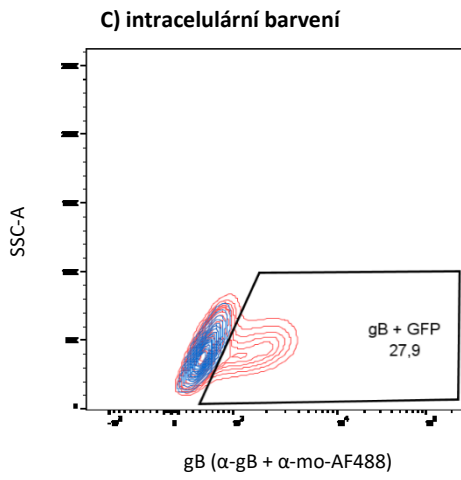
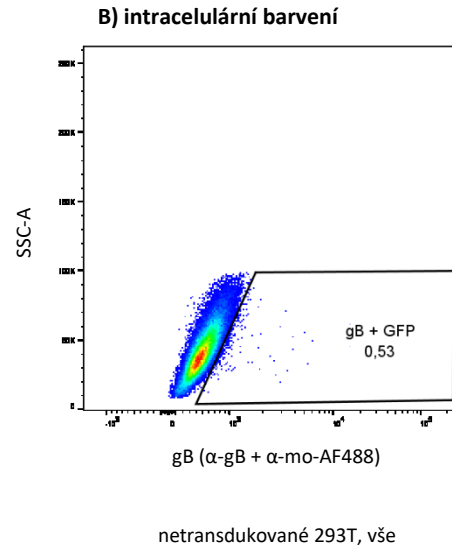
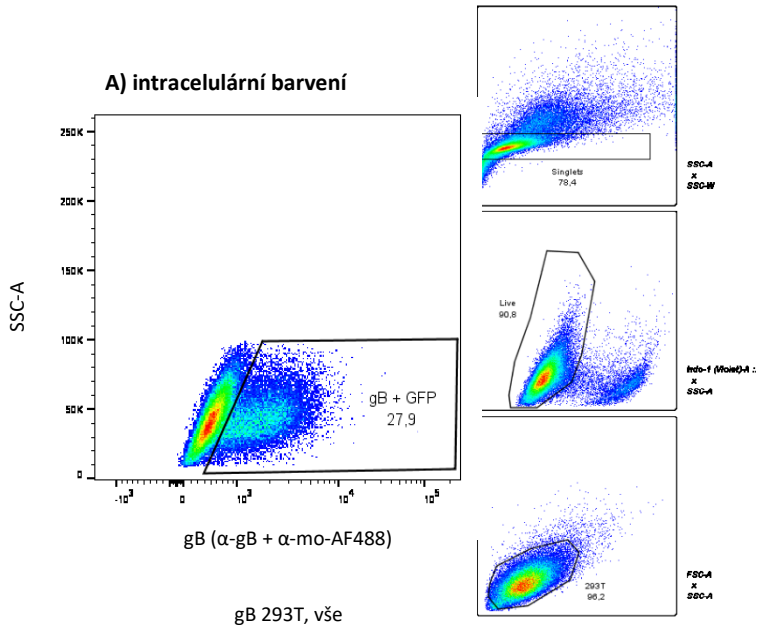
0,8% agarózový gel.



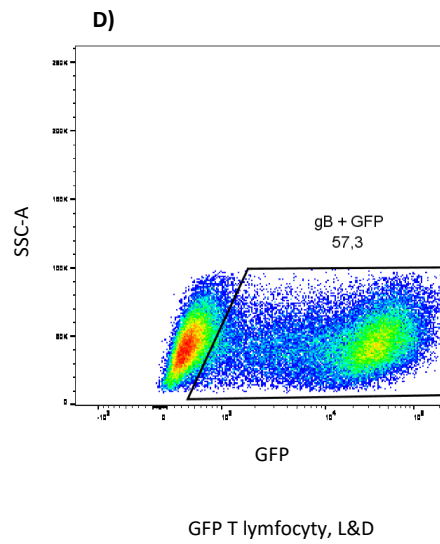
**Obrázek č. 38: Plazmid pWPXLd-gB.**

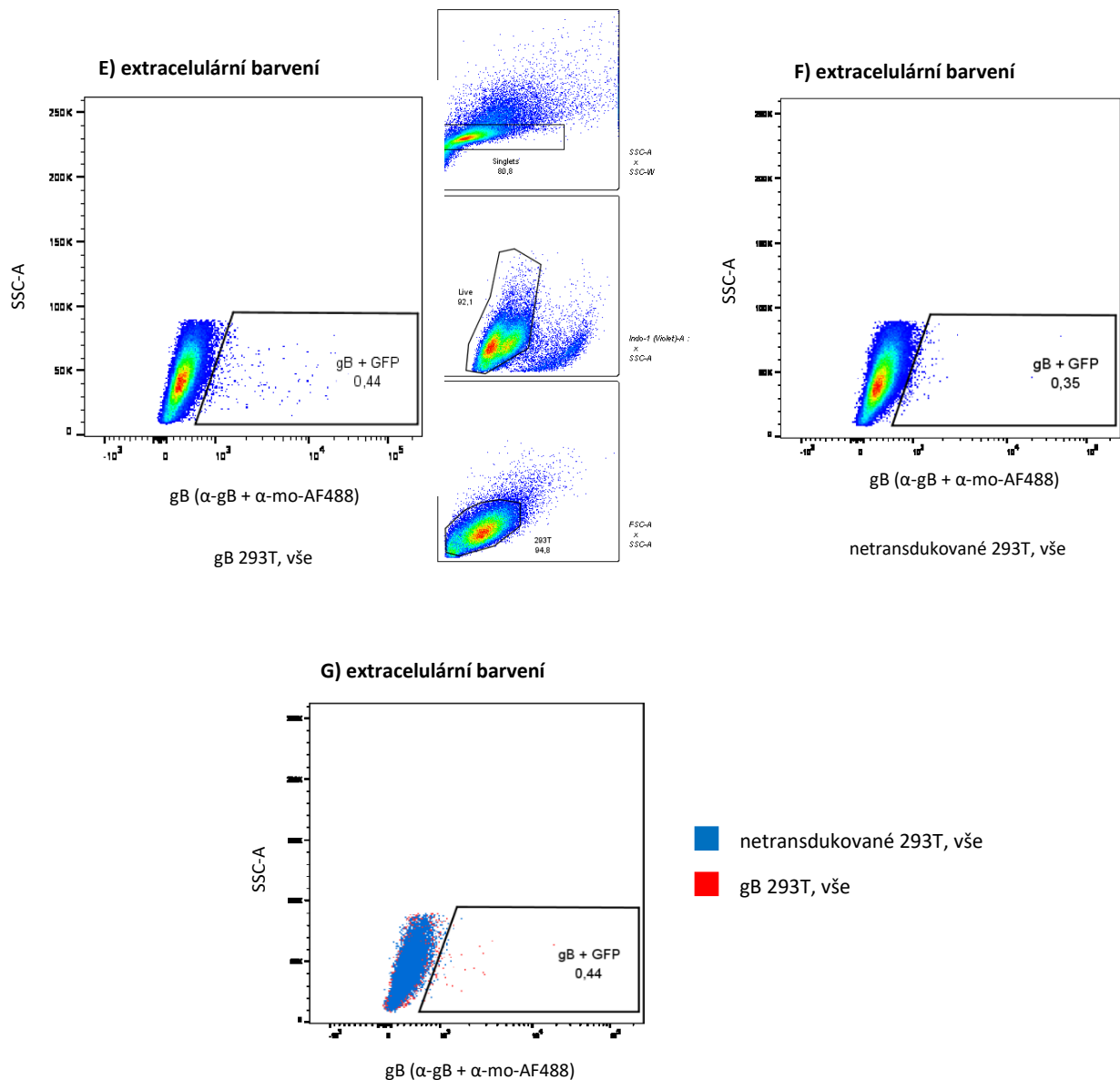
### **5.6.2.2 Transdukcce gB do buněčných linií**

Byly připraveny gB a GFP lentiviry, kterými byly transdukovány buňky 293T. Po 18 dnech kultivace byly buňky sklizeny a barveny extracelulárně nebo intracelulárně primární myší protilátkou proti gB ( $\alpha$ -gB) a sekundární kozí protilátkou proti myššímu IgG konjugovanou s Alexa Fluor 488 ( $\alpha$ -mo-AF488). Průtokovou cytometrií bylo detekováno ~27,4 % buněk s intracelulárním gB (viz Obrázek č. 39, A-C) a ~0,1 % buněk s povrchovým gB (viz Obrázek č. 39, E-G).



- netransdukovávané 293T, vše
- gB 293T, vše





**Obrázek č. 39: Extracelulární a intracelulární detekce gB v buňkách 293T transdukových lentiviry pomocí průtokové cytometrie.**

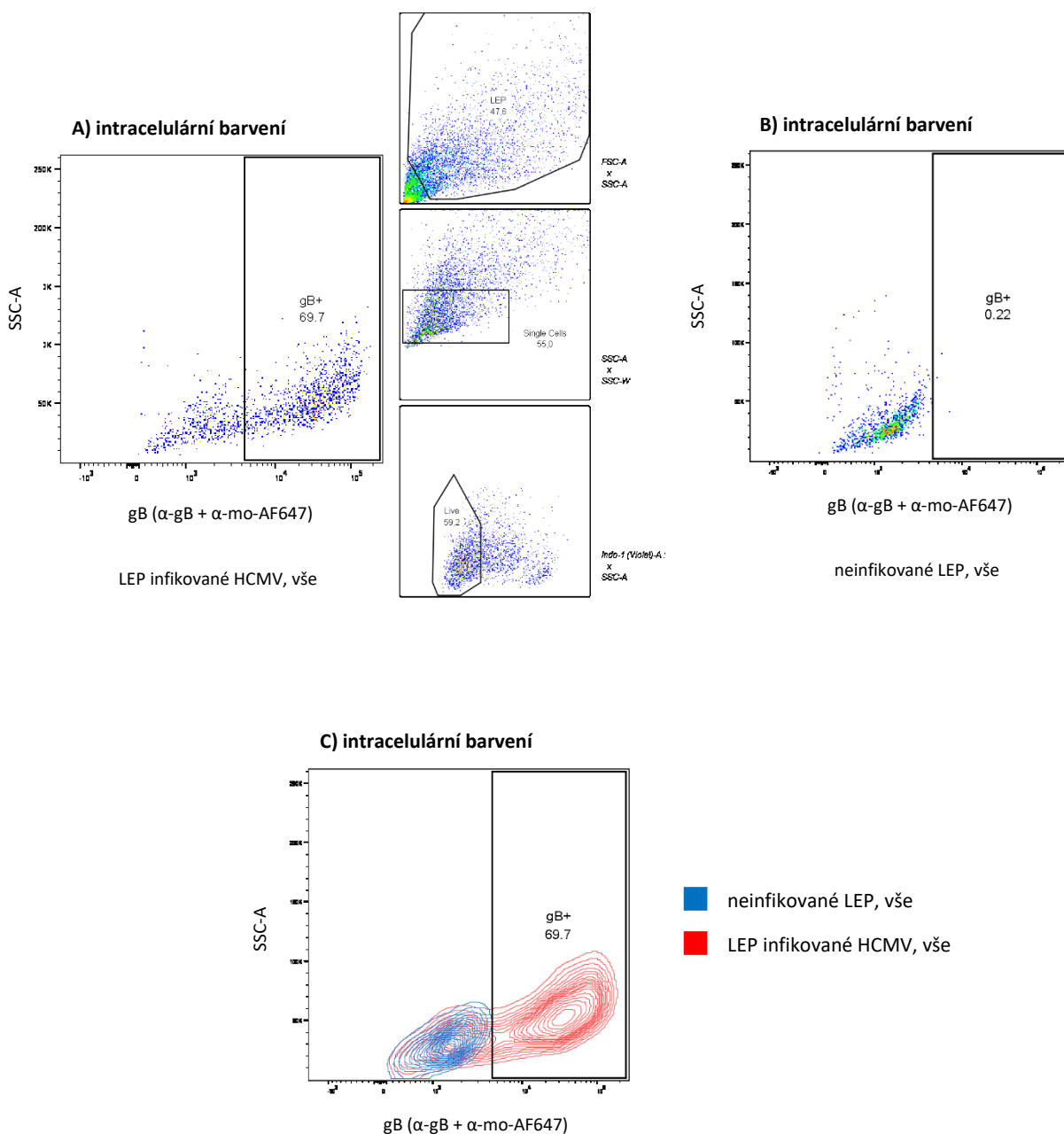
Buňky 293T byly transdukovány gB/GFP lentiviry. Následně byly pěstovány 18 dnů v CO<sub>2</sub> inkubátoru a poté změřeny na průtokovém cytometru. Byly barveny činidlem L&D a extracelulárně i intracelulárně protilátkami  $\alpha$ -gB (1 : 100) a  $\alpha$ -mo-AF488 (1 : 100). A) intracelulární detekce gB v buňkách transdukových gB lentiviry s gateovací strategií intracelulárních vzorků, kompletní barvení; B) kontrolní netransdukovávané buňky kompletně barvené intracelulárně; C) překrytí obrysových grafů A a B; D) detekce GFP v buňkách transdukových GFP lentiviry, barvení L&D; E) extracelulární detekce gB v buňkách transdukových gB lentiviry s gateovací strategií extracelulárních vzorků, kompletní barvení; F) kontrolní netransdukovávané buňky kompletně barvené extracelulárně; G) překrytí grafů E a F.

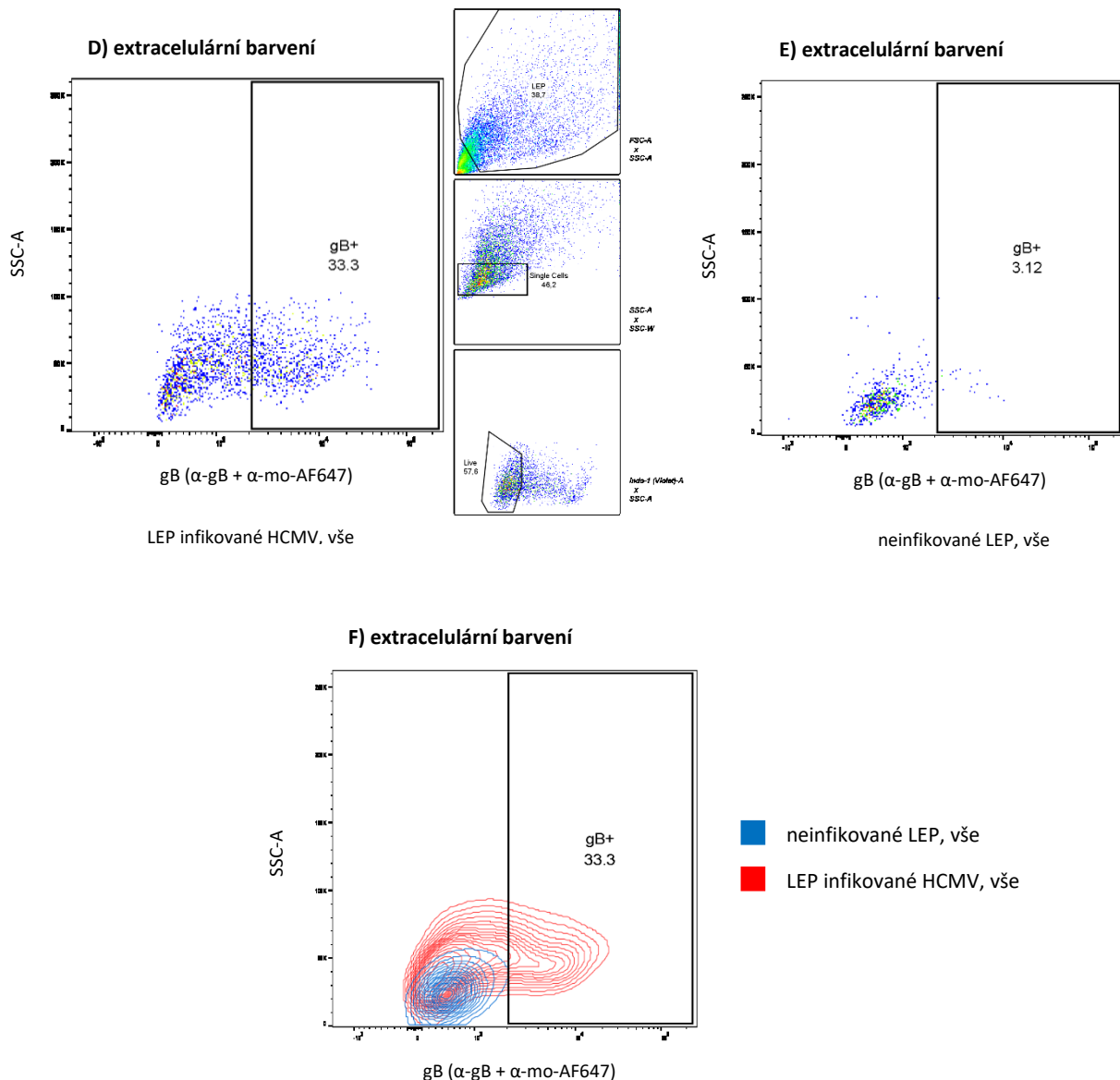
Dále bylo vyzkoušeno vnesení gB pomocí lentivirů do buněk K562 a HeLa, procento buněk s povrchovým gB však bylo stejně nízké jako u buněk 293T (data neukázána).

## 5.7 Infekce buněk LEP virem HCMV kmene Ad169

Vzhledem k obtížím s přípravou cílových buněk exprimujících povrchový gB bylo přistoupeno k práci se samotným virem HCMV kmene Ad169 (HCMV Ad169) a jím infikovanými buňkami LEP.

Buňky byly nasazeny na plastik a druhý den infikovány virem. 96 h.p.i. (časový interval určen optimalizací, viz kapitola 4.2.12) byly buňky sklizeny a barveny extracelulárně a intracelulárně primární protilátkou  $\alpha$ -gB a sekundární protilátkou  $\alpha$ -mo-AF647. Následně byly buňky změřeny na průtokovém cytometru. Intracelulární gB bylo nalezeno u  $\sim 69,5$  % infikovaných buněk (viz Obrázek č. 40, A-C), extracelulární barvení odhalilo gB na povrchu  $\sim 30$  % infikovaných buněk (viz Obrázek č. 40, D-F).





**Obrázek č. 40: Intracelulární a extracelulární detekce gB v buňkách LEP infikovaných virem HCMV Ad169.**

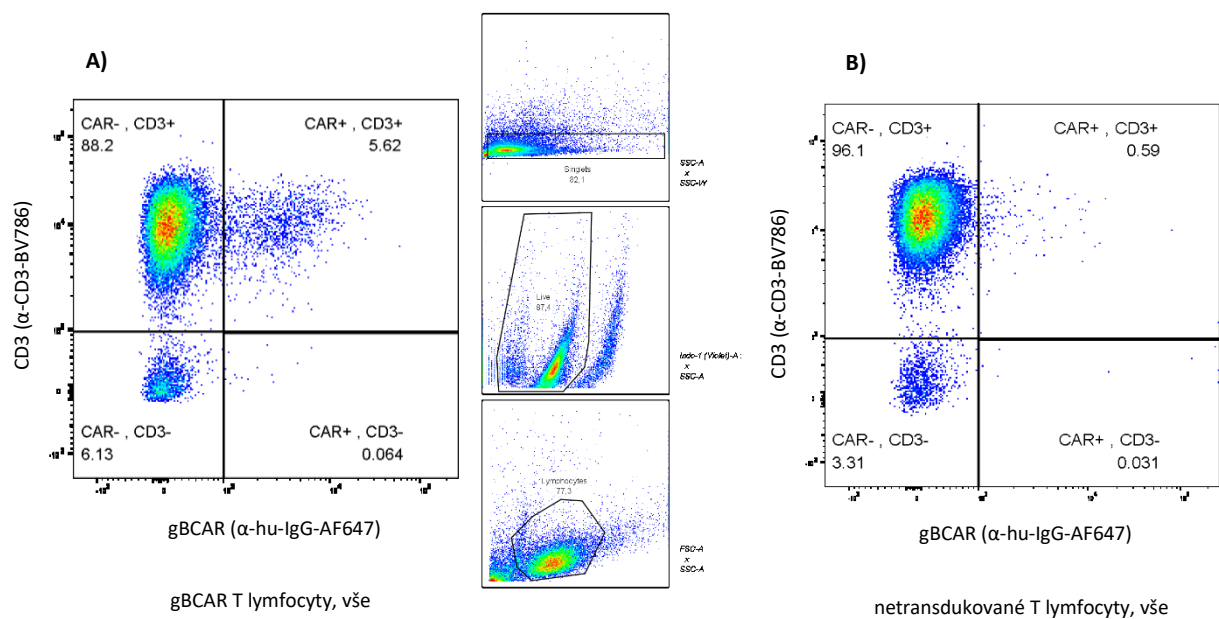
Buňky byly infikovány virem a 96 h.p.i. změřeny na průtokovém cytometru. Byly barveny činidlem L&D a intracelulárně i extracelulárně protilátkami α-gB (1 : 100) a α-mo-AF647 (1 : 200). A) intracelulární detekce gB v infikovaných buňkách LEP s gateovací strategií intracelulárních vzorků, kompletní barvení; B) kontrolní neinfikované buňky kompletně barvené intracelulárně; C) překrytí obrysových grafů A a B; D) extracelulární detekce gB v infikovaných buňkách LEP s gateovací strategií extracelulárních vzorků, kompletní barvení; E) kontrolní neinfikované buňky kompletně barvené extracelulárně; F) překrytí obrysových grafů D a E.

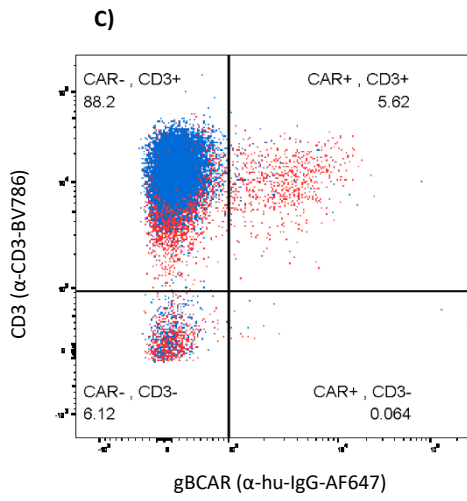
Protože detekce gB na povrchu infikovaných buněk byla úspěšná, bylo rozhodnuto použít je jako cílové buňky pro testování funkčnosti gBCAR.

## 5.8 Příprava gBCAR a CD19-CAR T lymfocytů pro funkční test

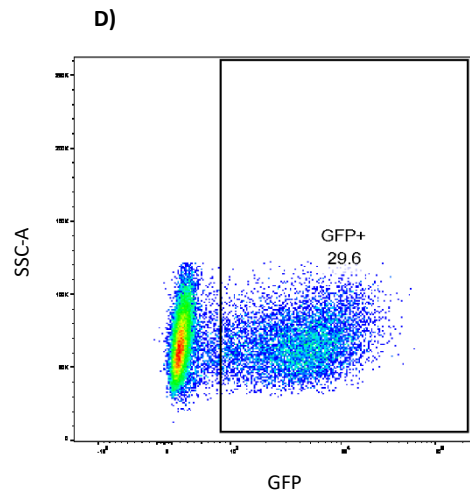
Na funkční test byly připraveny gBCAR a CD19-CAR T lymfocyty z BC 48 pomocí lentivirových vektorů. Před transdukcí byla vyzkoušena různá stimulace T lymfocytů (viz kapitola 4.2.9). Buňky byly po transdukcii pěstovány 25 dní v CO<sub>2</sub> inkubátoru a poté barveny extracelulárně protilátkami  $\alpha$ -CD3-BV786 a  $\alpha$ -hu-IgG-AF647 nebo  $\alpha$ -mo-AF647. Při barvení protilátkou  $\alpha$ -hu-IgG-AF647 byla provedena inkubace s 10% lidským sérem v pufru FACS.

Výsledky z průtokové cytometrie odhalily jako nejúčinnější způsob přípravy již dříve používaný postup bez předchozí stimulace T lymfocytů, který poskytl ~5 % gBCAR+ a ~3,1 % CD19-CAR+ buněk (viz Obrázek č. 41). Ve stimulovaném vzorku pěstovaném v IL-2 bylo detekováno 4,7 % gBCAR+ a 2,3 % CD19+ buněk, ve vzorku pěstovaném v IL-4 a IL-7 bylo nalezeno 3,8 % gBCAR+ a 2,1 % CD19+ buněk (data neukázána). Nestimulované T lymfocyty byly následně použity při testování funkčnosti gBCAR.

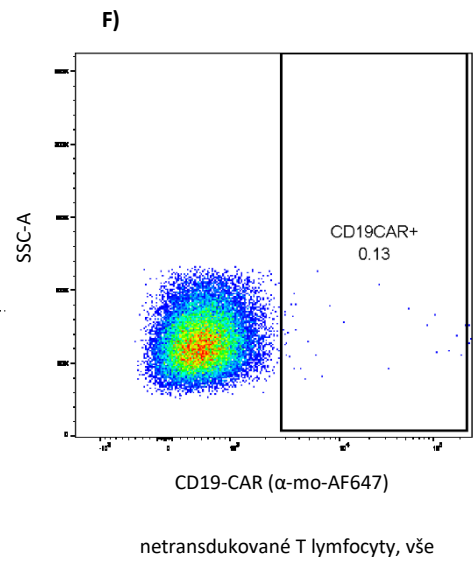
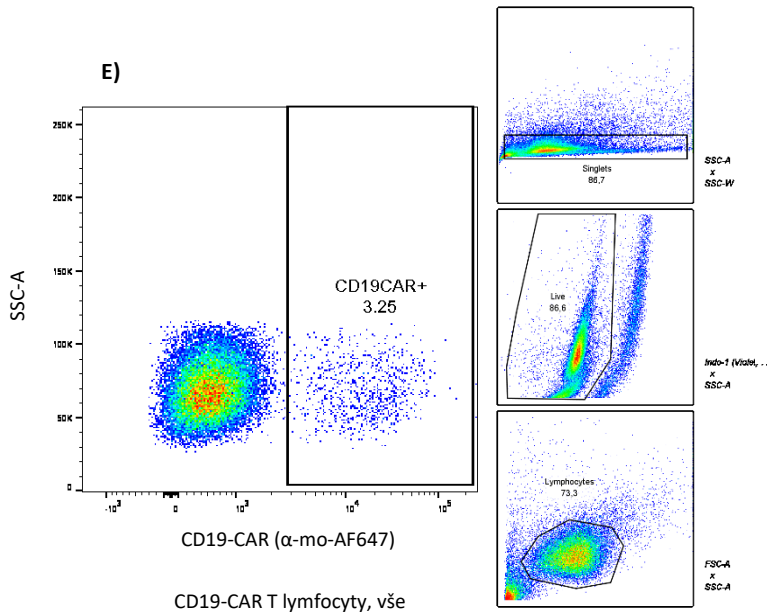


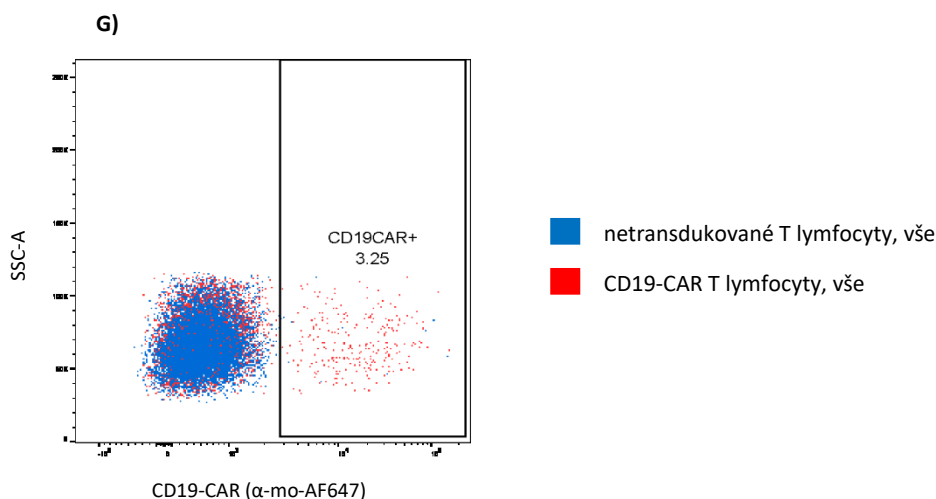


■ netransdukové T lymfocyty, vše  
 ■ gBCAR T lymfocyty, vše



GFP T lymfocyty, L&D





**Obrázek č. 41: Analýza nestimulovaných T lymfocytů nesoucích gBCAR nebo CD19-CAR pomocí průtokové cytometrie.**

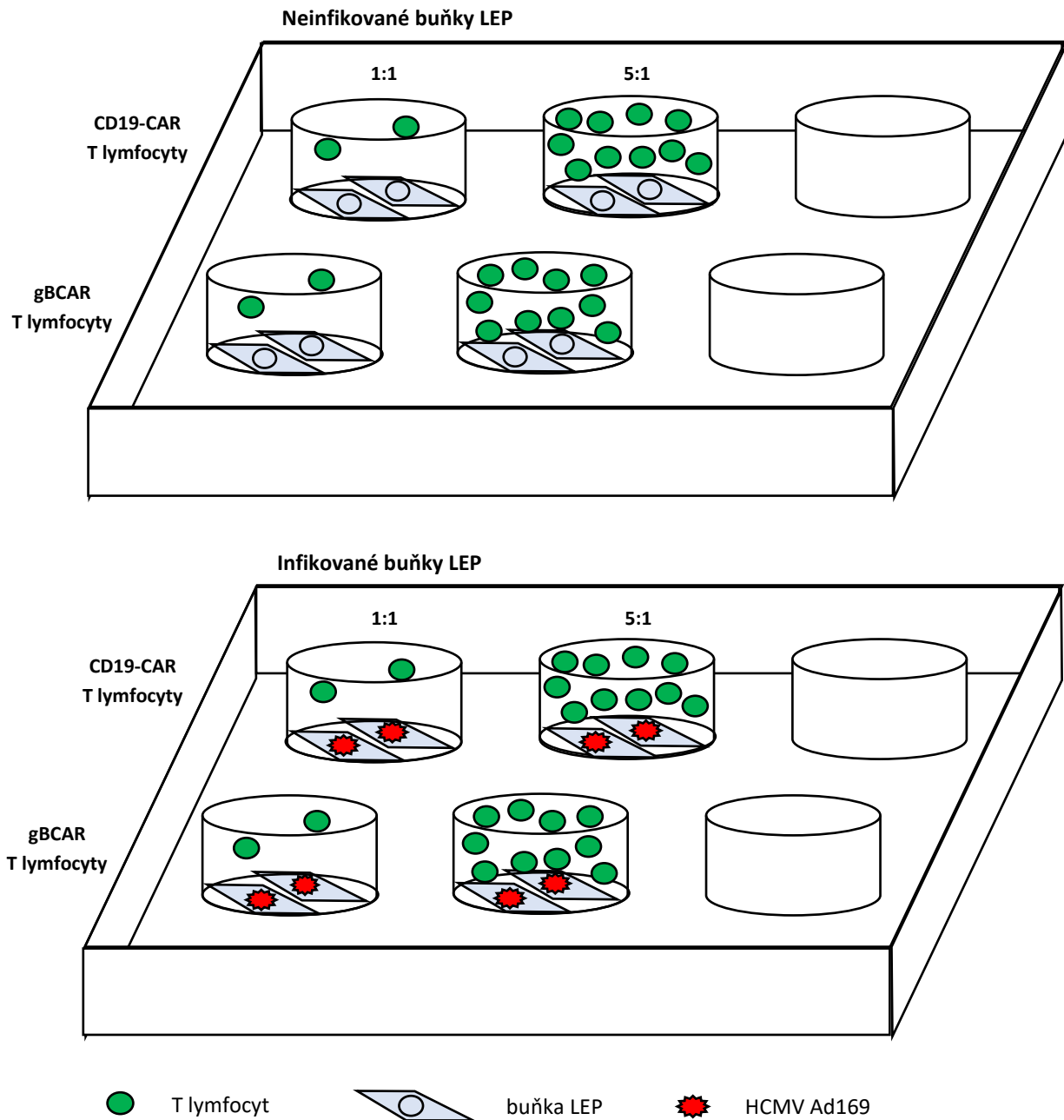
Buňky byly připraveny transdukcí gBCAR/CD19-CAR/GFP lentiviry bez předchozí stimulace. Následně byly pěstovány v médiu RPMI s IL-2. Byly barveny činidlem L&D a extracelulárně protilátkou  $\alpha$ -CD3-BV786 (1  $\mu$ l /  $10^6$  buněk). Dále byly barveny protilátkou  $\alpha$ -hu-IgG-AF647 pro detekci gBCAR (1 : 200) nebo protilátkou  $\alpha$ -mo-AF647 pro detekci CD19-CAR (1 : 500). A) detekce gBCAR v T lymfocytech transdukovaných gBCAR lentiviry s gateovací strategií pro gBCAR T lymfocyty, kompletní barvení; B) kontrolní netransdukované T lymfocyty kompletně barvené protilátkou  $\alpha$ -hu-IgG-AF647; C) překrytí grafů A a B; D) detekce GFP v T lymfocytech transdukovaných GFP lentiviry, barvení L&D; E) detekce CD19-CAR v T lymfocytech transdukovaných CD19-CAR lentiviry s gateovací strategií pro CD19-CAR T lymfocyty, kompletní barvení; F) kontrolní netransdukované T lymfocyty kompletně barvené protilátkou  $\alpha$ -mo-AF647; G) překrytí grafů E a F.

## 5.9 Funkční test T lymfocytů nesoucích gBCAR

Pro otestování funkčnosti gBCAR byla provedena inkubace gBCAR T lymfocytů s buňkami LEP infikovanými HCMV Ad169. Následně byla provedena analýza médií pro přítomnost IFN $\gamma$ .

### 5.9.1 Inkubace gBCAR T lymfocytů s buňkami LEP infikovanými HCMV Ad169

Na dvě 6-jamkové destičky byly po čtyřech jamkách nasazeny buňky LEP. Jedna destička byla druhý den infikována virem HCMV Ad169. 72 h.p.i. bylo od buněk odsáto médium MEM a byly k nim přidány gBCAR T lymfocyty nebo CD19-CAR T lymfocyty v 1,5 ml média RPMI podle schématu níže (Obrázek č. 42):



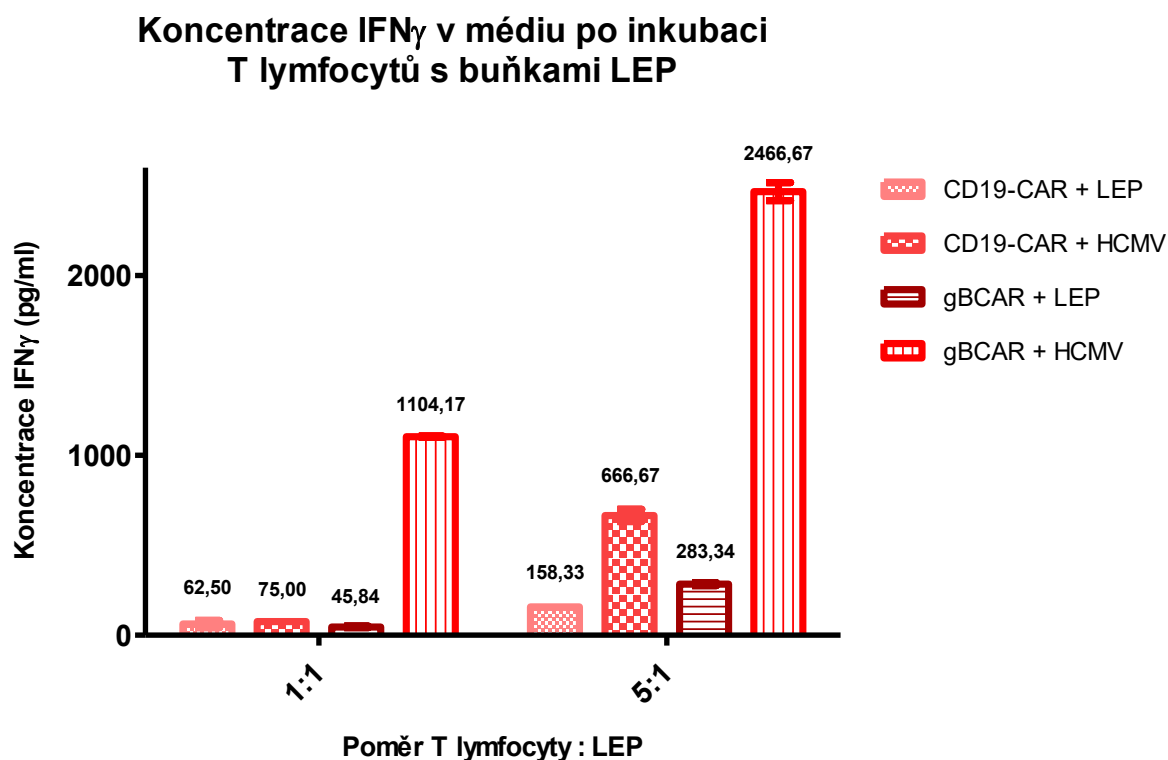
**Obrázek č. 42: Schéma inkubace gBCAR a CD19-CAR T lymfocytů s buňkami LEP infikovanými nebo neinfikovanými HCMV Ad169.**

Na dvě 6-jamkové destičky byly po čtyřech jamkách nasazeny buňky LEP v množství 412 000 buněk na jamku. Jedna destička byla druhý den infikována virem HCMV Ad169. 72 h.p.i. bylo od buněk odsáto médium MEM a byly k nim na 24 h přidány gBCAR T lymfocyty nebo CD19 T lymfocyty v 1,5 ml média RPMI. Při inkubaci 1:1 bylo použito 412 000 T lymfocytů na stejné množství buněk LEP, při inkubaci 5:1 bylo použito  $2,1 \times 10^6$  T lymfocytů.

Po 24h inkubaci bylo od buněk LEP odsáto médium s T lymfocyty do mikrozkupek. Ty byly následně centrifugovány a supernatanty byly analyzovány metodou ELISA pro zjištění množství  $IFN\gamma$ .

## 5.9.2 Určení koncentrace IFN $\gamma$ v médiích z inkubací pomocí metody ELISA

Supernatanty z inkubací T lymfocytů s buňkami LEP byly nanášeny na 96-jamkovou destičku v duplikátech v neředěné, 5 $\times$  ředěné a 10 $\times$  ředěné podobě a byly analyzovány metodou ELISA pro určení množství IFN $\gamma$  (viz Obrázek č. 43).



**Obrázek č. 43: Koncentrace IFN $\gamma$  v médiích z inkubací gBCAR a CD19-CAR T lymfocytů s buňkami LEP infikovanými nebo neinfikovanými HCMV Ad169.**

Média z inkubací byla ředěna 1 $\times$ , 5 $\times$  a 10 $\times$  a analyzována metodou ELISA pro přítomnost IFN $\gamma$ . Hodnoty v grafu byly vypočítány podle 10 $\times$  ředěných vzorků. V grafu jsou znázorněny průměry hodnot z duplikátů se střední chybou průměru (úsečka). V rámci skupin 1 : 1 nebo 5 : 1 byly rozdíly mezi množstvím IFN $\gamma$  v médiu gBCAR + HCMV a v ostatních médiích signifikantní s hodnotou  $p < 0,0001$  (dvoucestná ANOVA s Bonferroniho mnohonásobným porovnáním).

Funkční test byl zopakován ještě jednou s T lymfocyty připravenými z čerstvých PBMC (buňky viz Obrázek č. 31). Výsledky byly obdobné, sledovaly stejný trend a potvrdily závěr (data neukázána).

## 6 Diskuze

Cílem práce bylo zkonstruovat CAR proti gB HCMV a ověřit jeho funkčnost *in vitro*. gBCAR byl testován jako potenciální nová možnost terapie reaktivace HCMV u pacientů po HSCT. Hypotéza v pozadí práce byla tedy taková, že proteiny HCMV, které se vyskytují na povrchu infikovaných buněk, mohou být vhodnými cíli pro CAR a že T lymfocyty, které budou gBCAR exprimovat, dokáží infikované buňky rozpoznat a aktivovat své efektorové funkce.

### 6.1 Konstrukce a detekce gBCAR

gBCAR a základní lentivirový vektor pWPXLd-gBCAR se podařilo zkonstruovat bez větších problémů. V průběhu klonování bylo pouze nutné zařadit navíc krok s vložením gBCAR do pBK-CMV plazmidu pro získání vhodných restričních míst, protože v původním plánu nebyla vzata do úvahy nutnost vyštěpení GFP z původního pWPXLd plazmidu.

Protože produkce plazmidu v bakteriálním kmeni XL1-Blue byla nízká, byl plazmid vnesen do kmene Stbl3™, který je upraven pro množení plazmidů obsahujících repetitivní sekvence tím, že má sníženou frekvenci rekombinace. Tento krok zajistil produkci plazmidu ve vysokém množství.

gBCAR v transfekovaných 293T buňkách byl pomocí protilátky  $\alpha$ -CD3 $\zeta$  snadno detekován metodou Western blot i průtokovou cytometrií.

Problém nastal při hledání vhodné protilátky pro povrchovou detekci gBCAR. Na Western blotu byly vyzkoušeny dvě různé protilátky proti epitopu FLAG (DYKDDDDK), který se nachází na C-konci scFv části protilátky. Protilátky poskytovaly silné pozadí a ani jednou z nich se nepodařilo gBCAR detekovat. Za silným pozadím může stát skutečnost, že protilátka nebyla optimálně naředěna, nebo že se krátký epitop FLAG přirozeně vyskytuje i v jiných buněčných proteinech a protilátka se na ně tedy vázala. Epitop mohl být také neočekávaně poškozen, protože gBCAR nebyl po konstrukci sekvenován.

Dále byla vyzkoušena protilátka proti kappa řetězci, u které nebylo příliš překvapivé, že gBCAR nedokázala detekovat, protože pravděpodobně cílí na konstantní část lehkého řetězce  $\kappa$ , která se ovšem v scFv nenachází (ten obsahuje pouze variabilní části lehkého a těžkého řetězce).

Protilátky proti lehkému a těžkému řetězci lidského IgG fungovaly poměrně dobře, nakonec byla pro detekci zvolena oslí polyklonální protilátka. Díky polyklonalitě vykazovala v některých případech silnější pozadí při měření na průtokovém cytometru, proto jsme začali používat pro vyřazení protilátky po barvení FACS pufr s lidským sérem.

Pozitivním zjištěním bylo, že gBCAR byl detekován na povrchu a nebyl zadržován uvnitř buněk.

## 6.2 Vnášení gBCAR do T lymfocytů

### 6.2.1 Příprava lentivirů a transdukce

Nejběžnějším způsobem přípravy CAR T lymfocytů je transdukce pomocí lentivirových vektorů (Milone & O'Doherty, 2018). Lentiviry jsou kvůli bezpečnosti připravovány kotransfekcí několika plazmidů, v našem případě tří, z nichž jeden kóduje gen pro virový obalový glykoprotein, druhý pro kapsidový protein a virovou polymerázu a do třetího se vkládá gen zájmu.

gBCAR jsme vnášeli převážně do zamražených PBMC dárců ÚHKT, protože u nich známe HCMV serostatus a máme jich dostatečné zásoby pro provádění testování. Při případném použití v klinice by pak byly modifikovaly čerstvé PBMC dárců. Nezaznamenali jsme rozdíl v účinnosti transdukce u rozmražených a čerstvých PBMC.

Existuje mnoho způsobů přípravy lentivirových částic (Merten *et al.*, 2016). My jsme vycházeli z protokolu používaného v laboratoři MUDr. Otáhala, Ph.D. Protokol měl být co nejméně náročný na provedení a přístrojové vybavení.

Častou součástí preparace lentivirů je ultracentrifugace, která slouží k zahuštění lentivirových částí do menšího objemu. Ultracentrifugace je ale poměrně náročná na provedení. V našem případě jsme navíc používali celý objem supernatantu, který byl získán, tj. 1 ml a 1 ml, takže koncentrování z většího objemu nebylo potřeba. Proto jsme používali jen běžnou centrifugaci pro odstranění produkčních 293T buněk. Lentivirový supernatant je dále možné přefiltrovat, tomuto kroku jsme se však chtěli vyhnout z důvodu ztráty lentivirů filtrací. Protože nám však gBCAR T lymfocyty při přípravě z čerstvých lentivirových supernatantů často přerůstaly 293T buňkami, které se centrifugací nepodařilo úplně odstranit, začali jsme lentivirový supernatant před použitím přemrazovat na -80 °C. Dále se už problém s přerůstáním buněk nevyskytoval.

Při transdukci lentivirů jsme používali polybren. Polybren je polymer, který snižuje odpuzování membrány buňky a viru neutralizací náboje. Zvyšuje tedy nespecifickou adsorpci viru na buněčnou membránu a tím i účinnost transdukce (Davis *et al.*, 2002). Pro některé buňky však může být toxický.

V našem případě nebylo vnášení gBCAR konstruktů do dárcovských PBMC příliš účinné, efektivita se pohybovala pouze kolem 10 %. Tým MUDr. Pavla Otáhala, Ph.D., dosahoval vyšší účinnosti vnášení CD19-CAR (osobní komunikace), ale je třeba vzít v úvahu, že ve směsi PBMC, která je transdukována, se nachází rovněž B lymfocyty, které mají na svém povrchu cílovou molekulu CD19 a dokáží tak CD19-CAR T lymfocyty specificky stimulovat k expanzi.

Limitující krok při přípravě lentivirů se nepodařilo zjistit. GFP transdukce vždy fungovaly lépe a dávaly výtěžky okolo 30-40 % a o účinnosti transdukce gBCAR lentiviry tedy nepodávaly

reálný obraz. Za úvahu by stálo vyzkoušet některou jinou metodu kvantifikace lentivirů, např. určení koncentrace kapsidového proteinu p24 nebo RNA (Geraerts *et al.*, 2006). Pro zlepšení transdukce by bylo zřejmě vhodné vyzkoušet přípravu lentivirového média ve větším objemu a jeho zakoncentrování ultracentrifugací nebo využít místo polybrenu RetroNectin® (Takara). RetroNectin® je rekombinantní fragment lidského fibronektinu, který zvyšuje kolokalizaci suspenzních buněk a retrovirů vazbou viru a buněčného receptoru, čímž významně podporuje účinnost transdukce a zdá se, že je také méně toxický než polybren (Lee *et al.*, 2009).

Další variantou je spokojit se s nižší účinností a zvýšit procento gBCAR+ T lymfocytů až v kroku expanze specifickou stimulací právě těchto T lymfocytů (viz dále).

### 6.2.2 Systém piggyBac

Vzhledem k poměrně nízké účinnosti vnášení gBCAR do T lymfocytů pomocí lentivirových vektorů jsme se rozhodli vyzkoušet transpozonový systém piggyBac, který se již pozitivně osvědčil v několika studiích s CAR T lymfocyty (Nakazawa *et al.*, 2011; Woodard & Wilson, 2015) a je také s úspěchem používán v laboratoři doktora Otáhala (Ptáčková *et al.*, 2018). Je v něm využito enzymu transpozázy, která rozpoznává repetitivní sekvence v transpozonovém nosičovém plazmidu s genem zájmu a způsobí integraci tohoto genu náhodně do genomu buňky (Woodard & Wilson, 2015). Tento systém přípravy je vhodnější z hlediska následného použití v klinice než lentivirové vektory, u kterých hrozí vznik replikačně kompetentního viru.

Nevýhodou systému používaného na ÚHKT je jeho finanční náročnost, neboť k vnášení plazmidů do buněk je využívána elektroporace na přístroji Neon, jehož veškeré příslušenství včetně elektroporačních kyvet je jednorázové a velmi drahé. Co se týká vlastních buněk, během elektroporace jich velká část zahyne, počáteční expanze tedy trvá déle, a zpočátku jsou buňky velmi náchylné na podředění.

Nám se příprava životaschopných expandujících gBCAR T lymfocytů pomocí systému piggyBac podařila pouze u některých vzorků z čerstvých PBMC. Byla provedena i elektroporace do rozmražených PBMC a do PBMC rozmražených a následně stimulovaných pepmixem HAdV5, ani v jednom z těchto případů však buňky nepřežily. Účinnost vnášení konstruktů byla u piggyBac systému výrazně nižší než u lentivirů, buňky málo expandovaly a silně umíraly. Proto jsme se i z časových důvodů rozhodli pro účely testování gBCAR T lymfocytů vrátit k použití vyzkoušených a levnějších lentivirových vektorů.

V případě, že by se gBCAR v dalších testech ukázal jako funkční, bylo by možné po nutné optimalizaci přejít na transpozonový systém namísto lentivirových vektorů vzhledem k jeho klinické příznivosti.

### 6.3 Expanze gBCAR T lymfocytů

Pro expanzi je běžně používána kombinace  $\alpha$ -CD3 a  $\alpha$ -CD28 protilátek, kdy první z nich dodá aktivační signál (první signál, vazba na TCR) a druhá signál kostimulační (druhý signál, vazba na kostimulační molekulu). Tato kombinace působí silnou nespecifickou expanzi všech přítomných T lymfocytů bez ohledu na jejich specifitu (Trickett & Kwan, 2003; Ptáčková *et al.*, 2018).

Při přípravě CAR T lymfocytů je však žádoucí expandovat především T lymfocyty nesoucí CAR. Při přípravě nejpoužívanějších CD19-CAR T lymfocytů je specifická stimulace působena B lymfocyty přítomnými ve směsi PBMC, které nesou na svém povrchu CD19 antigen (Ptáčková *et al.*, 2018). B lymfocyty jsou zároveň samy o sobě přirozeně antigen-prezentující buňky, neboť mají na svém povrchu kostimulační molekuly (CD40, CD80, CD86 apod.) (Rodríguez-Pinto, 2005). Je tedy pravděpodobné, že B lymfocyty pomocí těchto molekul dodávají CD19-CAR T lymfocytům silný přirozený kostimulační signál, čímž je efektivně stimulují k expanzi, což přispívá k celkové vysoké úspěšnosti CD19-CAR terapie.

U našeho gBCAR výhoda přirozené stimulace není, chtěli jsme proto vyzkoušet stimulaci gBCAR T lymfocytů pomocí  $\alpha$ -hu-IgG-AF647 protilátky navázané na destičku, která se však neukázala jako příliš efektivní. Při použití samotné protilátky  $\alpha$ -hu-IgG-AF647 většina buněk nepřežila. Kombinací protilátek  $\alpha$ -CD3,  $\alpha$ -CD28 a  $\alpha$ -hu-IgG-AF647 bylo sice dosaženo procentuálně nejvyššího zastoupení gBCAR+ T lymfocytů, ale jen v řádu desetin procent v porovnání s  $\alpha$ -CD3 a  $\alpha$ -CD28 stimulací.

Podle vysokého procenta mrtvých buněk se tedy zdá, že samotná protilátka gBCAR T lymfocyty zabíjí. Je možné, že se protilátka váže na molekulu gBCAR příliš silně a působí hyperaktivaci T lymfocytů bez dostatečné kostimulace, což vede k apoptóze buněk. V kombinaci s  $\alpha$ -CD3 a  $\alpha$ -CD28 protilátkami buňky přežívaly a gBCAR+ buněk bylo více, ale efekt  $\alpha$ -hu-IgG-AF647 protilátky byl v tomto případě nejspíš zastíněn masivní  $\alpha$ -CD3 stimulací. Problém s touto protilátkou může být také v tom, že fluorochrom AF647 brání její vazbě na destičku, a její efekt se tedy ve skutečnosti neprojevuje, protože není přítomna v dostatečném množství, a rozdíly mezi jednotlivými inkubacemi jsou tedy dány pouze náhodnou chybou. Stimulace pomocí protilátky  $\alpha$ -hu-IgG-AF647 byla navíc prováděna po přípravě T lymfocytů pomocí systému piggyBac, která se nám obecně příliš nedařila, takže z ní nelze o vlivu protilátky vyvozovat jednoznačné závěry.

Pro zlepšení stimulace gBCAR+ T lymfocytů k expanzi připadají v úvahu tři varianty:

1. Vyzkoušet jinou protilátku proti lidskému IgG bez konjugátu, pro zajištění kostimulace v kombinaci s  $\alpha$ -CD28 protilátkou.

2. Použít celý syntetický antigen gB nebo jen peptidu z gBCAR-interakční části navázaného na destičku společně s  $\alpha$ -CD28 protilátkou pro kostimulaci. Tyto dva způsoby by mohly být dostatečně účinné, a přitom vhodné pro čistou produkci buněk pro pacienty.
3. Použít transfekované buňky produkující gB jako „stimulantu“ pro T lymfocyty. Nejlepší by byla transfekovaná linie B lymfocytů (např. Ramos) pro přítomnost kostimulačních molekul. Stimulace pomocí buněk by mohl být účinnější než stimulace molekulami, po expanzi by ovšem bylo nutné z preparace odstranit gB+ buňky, což by mohlo představovat překážku pro produkci gBCAR T lymfocytů pro klinické použití.

Při měření buněk na průtokovém cytometru bylo rovněž obecně zjištěno velké množství mrtvých gBCAR+ buněk. Veškerých gBCAR+ buněk bylo 40 %, ale živých pouze 14 %. Přestože část z těchto 40 % bude jistě detekována nespecifickou vazbou protilátky, zdá se, že gBCAR+ buňky nadměrně umírají a exprese gBCAR pro ně tedy představuje zátěž. Výhodu pro přežívání a expanzi by mohla poskytnout právě přítomnost antigenu gB nebo  $\alpha$ -gBCAR protilátky.

CAR T lymfocyty jsme pěstovali standardně v IL-2. Vyzkoušeli jsme také kombinaci IL-4 a IL-7, kterou tým doktora Otáhala identifikoval jako výhodnou pro expanzi CD19-CAR T lymfocytů (Ptáčková *et al.*, 2018). V našem případě však neposkytla větší výtěžek gBCAR T lymfocytů ani jejich lepší expanzi ve srovnání s pěstováním v IL-2, což bylo pravděpodobně způsobeno rozdílným CAR konstruktem, a proto také odlišným způsobem stimulace [ve studii Ptáčková *et al.* (2018) byla stimulace prováděna pouze endogenními B lymfocyty bez protilátek  $\alpha$ -CD3 a  $\alpha$ -CD28]. Navíc jsme využívali při porovnání efektu IL-2 a IL-4 + IL-7 i jiný způsob modifikace T lymfocytů, tj. pomocí lentivirů, kdežto Ptáčková *et al.* (2018) využívali elektroporaci plazmidy systému piggyBac.

## 6.4 Cílové buňky

Příprava cílových buněk exprimujících povrchový gB se nezdařila pomocí transfekcí ani lentivirových transdukcí. Po transdukcích bylo intracelulárně nalezeno velké množství gB, avšak gB nebylo možné detekovat extracelulárně.

Podle literatury je gB během replikačního cyklu HCMV i při samostatné transfekci silně lokalizováno v membránovém cytoplazmatickém kompartmentu odvozeném od *trans*-Golgiho aparátu a endosomů/sekretorických váčků (Sanchez *et al.*, 2000; Jarvis *et al.*, 2002; Homman-Loudiyi *et al.*, 2003), V tomto kompartmentu viriony HCMV získávají obal pučením do intracelulárních váčků (přehled replikačního cyklu HCMV Jean Beltran & Cristea, 2014). Množství gB se ovšem dostává i na buněčný povrch, odkud je endocyticky internalizováno zpět do membránového kompartmentu (Radsak *et al.*, 1996; Jarvis *et al.*, 2002). Lokalizace gB je

ovlivněna sekvencemi v cytoplazmatické části molekuly, především fosforylací serinu na pozici 900, která působí akumulaci gB intracelulárně (Crump *et al.*, 2003; Jarvis *et al.*, 2004). Naopak mutované gB bez cytoplazmatické domény se akumuluje na buněčné membráně (Hegde *et al.*, 2005).

V námi používaných 293T buňkách tedy zřejmě docházelo k silné internalizaci gB. Ve studiích s prvním zkonstruovaným gB specifickým CAR (gB-cIR) byly také použity 293T buňky, které vykazovaly povrchovou expresi gB, ale produkovaný protein byl fúzním produktem, ve kterém byla cytoplazmatická a transmembránová část gB nahrazena odpovídajícími částmi molekuly EpCAM (Proff *et al.*, 2016).

Rozhodli jsme se tedy použít jako cílové buňky přímo buňky LEP infikované virem HCMV Ad169. Testy na těchto buňkách se provádějí obtížněji, ale jsou průkaznější a představují oproti transfekovaným buňkám méně umělého systému. Zároveň však v současné době v laboratoři pracujeme na konstrukci gB bez cytoplazmatické části, která je nahrazena krátkou adaptorovou sekvencí. Takto upravený gB by měl být stabilně exprimován na povrchu transfekovaných buněk a mělo by tak být možné snadno vyzkoušet cytotoxický test nebo expanzi gBCAR T lymfocytů pomocí gB+ buněk.

## 6.5 Funkční testy

Podle testu na produkci IFN $\gamma$  po inkubaci gBCAR T lymfocytů s infikovanými buňkami se zdá, že gBCAR T lymfocyty dokáží cílové buňky specificky rozpoznat a spustit produkci cytokinů. Tuto hypotézu ovšem bude ještě nutné ověřit v dalších testech. Těmi může být detekce intracelulárních cytokinů (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ) pro určení, zda jsou produkujícími buňkami opravdu T lymfocyty, měření aktivačních markerů T lymfocytů a v neposlední řadě také cytotoxický test.

V naší práci nebyl cytotoxický test proveden, protože LEP buňky, na kterých je HCMV v naší laboratoři pěstován, jsou nepraktické pro cytotoxický test hodnocený na průtokovém cytometru, který je zaveden v naší laboratoři. LEP rostou pomalu (doba zdvojení cca. 6 dní), při snaze o uvolnění z podložky a běžné manipulaci rychle umírají a rozpadají se.

Nejsnazší by bylo provést test na suspenzních buňkách transfekovaných gB, např. na K562 linii. K tomuto účelu proto v laboratoři aktuálně připravujeme gB bez internalizační sekvence (viz výše). Jelikož však podle studií Full *et al.* (2010) a Proff *et al.* (2016) CAR zabíjel gB transfekované buňky, ale ne buňky infikované samotným virem HCMV, bylo by průkaznější provést cytotoxický test přímo na buňkách infikovaných HCMV. Pro cytotoxický test na těchto adherentních buňkách by mohlo být použito značení buněk pomocí europia (Eu) (Blomberg *et al.*, 1996), kolorimetrická esej na metabolickou aktivitu buněk (např. XTT Cell Viability Assay, Thermo Fisher Scientific) nebo nový přístroj Seahorse XFP (Agilent) zakoupený na ÚHKT, který

dokáže měřit v čase změnu metabolické aktivity buněk (spotřebu kyslíku a okyselení extracelulárního prostředí), a tedy i jejich umírání.

## 6.6 Srovnání s předchozími studii CAR proti gB HCMV

První CAR proti gB HCMV (gB-cIR) byl vyvinut v roce 2010 (Full *et al.*, 2010). Do T lymfocytů byl vnášen pomocí lentivirových vektorů nebo elektroporací RNA. Při inkubaci CAR T lymfocytů s HCMV Ad169 infikovanými HFF byla pozorována zvýšená produkce IFN $\gamma$  a TNF $\alpha$  T lymfocyty, dále degranulace T lymfocytů pomocí detekce molekuly CD107 na jejich povrchu a také specifická lyze 293T buněk exprimujících gB.

V průběhu našich experimentů byla publikována navazující studie stejné skupiny, ve které výzkumníci provedli testy na buňkách infikovaných HCMV a jejímž závěrem bylo, že HCMV-infikované buňky jsou rezistentní vůči lyzi gB-cIR T lymfocyty i HCMV-specifickými přirozenými T lymfocyty (Proff *et al.*, 2016). Jako příčina této inhibice byly identifikovány virové proteiny UL37x1 a UL36. gB-cIR T lymfocyty v přítomnosti infikovaných buněk produkovaly cytokiny a degranulovaly, ale nedokázaly infikované buňky zabít. Stejný blok cytotoxicity byl ovšem pozorován i při použití HCMV-specifických T lymfocytů a kmenů HCMV deficientních na inhibitory antigenní prezentace.

Konstrukty použité v těchto studiích se velmi liší od našeho gBCAR. scFv v gB-cIR byl odvozen z myši protilátky 27-287 bez neutralizační aktivity zacílené na antigenní doménu AD-1 gB (AMK 608-625) (Utz *et al.*, 1989). Náš gBCAR oproti tomu obsahoval scFv odvozený od lidské protilátky ITC88 s neutralizační aktivitou zacílené na antigenní doménu AD-2 (Ohlin *et al.*, 1993; Lantto *et al.*, 2002). CAR mohou být odvozeny od protilátek bez neutralizační aktivity, nicméně neutralizační protilátky jsou zpravidla zacíleny na funkčně méně důležité epitopy, které jsou proto variabilnější mezi různými kmeny viru a snadněji podléhají mutacím. To je právě případ domény AD-1, která je sice silně imunogenní, ale zároveň variabilní. Námí použitý scFv naproti tomu cílí na vysoce konzervovanou oblast AD-2, což mu dává výhodu univerzálního použití na řadu izolátů HCMV s menším rizikem vzniku únikových variant viru (Meyer *et al.*, 1992).

CAR se dále liší v kostimulačních doménách. První gB-cIR obsahuje kostimulační a zároveň transmembránovou doménu CD28, náš konstrukty využívá CD8 $\alpha$  transmembránové domény a 4-1BB kostimulační domény. Aktivační doména je v obou konstruktech stejná (CD3 $\zeta$ ). U kostimulačních domén nelze jednoznačně říci, která je nejlepší, ale bylo pozorováno, že doména CD28 může způsobit vyčerpání T lymfocytů díky tonické signalizaci z CAR (Long *et al.*, 2015). CAR T lymfocyty s 4-1BB doménou se zdají být v tomto ohledu lepší, déle perzistují v těle a mají vyšší účinnost než CAR s CD28 doménou (Milone *et al.*, 2009).

Co se týče funkčních esejí, prozatím jsme s naším konstruktem provedli pouze detekci IFN $\gamma$ , takže srovnání s gB-cIR není v tomto směru možné udělat.

HCMV je sice virus specializovaný na únik před imunitním systémem, snižuje expresi MHC I a MHC II a působí na další imunitní mechanismy. UL36 a UL37x1 proteiny byly v jiných studiích detekovány jako proteiny zabraňující apoptóze infikovaných buněk (Reboredo *et al.*, 2004; Chaudhry *et al.*, 2017). Je tedy možné, že blokují i apoptózu vyvolanou cytotoxickými T lymfocyty a negativně ovlivňují funkci CAR T lymfocytů. Nezdá se ovšem pravděpodobné, že by virus dokázal zabraňovat funkci přirozených CMV-specifických T lymfocytů až takto dramaticky, protože virus je široce rozšířený v lidské populaci, a přitom nepůsobí imukompetentním jedincům problémy. Navíc se již v praxi osvědčila adoptivní terapie pomocí HCMV-specifických T lymfocytů.

Problém studie Proff *et al.* (2016) může být také v tom, že při cytotoxických testech byly používány pouze CD8+ T lymfocyty. Podle mnoha studií jsou však pro kontrolu infekce důležité také CD4+ T lymfocyty, které mohou nejen poskytnout „pomoc“ CD8+ T lymfocytům, ale existují také cytotoxické CD4+ T lymfocyty, které se na myším modelu ukázaly jako důležité pro zvládnutí infekce (Verma *et al.*, 2016). Tyto lymfocyty také rozeznávají fragmenty gB vázané na MHC II molekulách (Hegde *et al.*, 2005). Pro účinné zabíjení infikovaných buněk tedy může být v důsledku důležité modifikovat pomocí CAR také CD4+ T lymfocyty.

## 6.7 Závěr a plány do budoucna

Zdá se tedy, že gB vyskytující se na povrchu infikovaných buněk, může být vhodným cílem pro CAR a že modifikované T lymfocyty dokáží infikované buňky rozpoznat a aktivovat produkci cytokinů. V blízké budoucnosti bychom rádi provedli další testování funkce gBCAR a potvrdili nebo vyvrátili závěry studie Proff *et al.* (2016). Chtěli bychom:

- připravit cílové gB+ buňky transfekcí mutantního gB bez cytoplazmatické části a ty poté využít pro cytotoxický test nebo pro stimulaci expanze gBCAR T lymfocytů,
- vyzkoušet stimulaci expanze gBCAR T lymfocytů syntetickým gB a  $\alpha$ -CD28 protilátkou,
- s využitím HCMV kódujícího gen pro GFP provést inkubace infikovaných buněk s gBCAR T lymfocyty a pozorovat vývoj GFP center v porovnání s kontrolami, tedy zjistit, zda virus inhibuje množení a šíření viru,
- intracelulárně detekovat IFN $\gamma$  a další cytokiny po inkubaci gBCAR T lymfocytů s infikovanými buňkami, abychom zjistili, zda jsou produkovány specificky gBCAR T lymfocyty,
- provést cytotoxický test na transfekovaných buňkách nesoucích mutantní gB a na LEP buňkách infikovaných HCMV.

V současné době se v laboratoři pracuje také na vývoji CAR proti HCMV glykoproteinu UL11. Konstrukt je v současnosti ve fázi přípravy monoklonální protilátky, protože proti UL11 neexistuje publikovaná protilátková sekvence. Poznatků získaných během vývoje gBCAR bychom rádi využili také pro přípravu dalších HCMV-specifických CAR.

## 7 Souhrn

Záměrem této práce bylo zkonstruovat chimérický antigenní receptor (CAR) proti glykoproteinu (gB) lidského cytomegaloviru (HCMV) a *in vitro* ověřit jeho funkčnost. gBCAR byl vyvíjen jako potenciální nový přístup k léčbě HCMV reaktivace u pacientů po transplantaci krvetvorných buněk.

Tzv. gBCAR se podařilo zkonstruovat pomocí publikovaného scFv lidské protilátky proti gB a signalizační části z CD19-CAR vyvinutého na ÚHKT. Exprese gBCAR v buněčných liniích byla ověřena pomocí Wester blotu a průtokové cytometrie.

Pro vnášení do dárcovských T lymfocytů byly použity lentivirové vektory, díky kterým bylo dosaženo průměrné efektivity vnášení 10 %. Pomocí průtokové cytometrie byla potvrzena povrchová exprese gBCAR. T lymfocyty byly dále úspěšně expandovány v médiu RPMI s IL-2. Byl vyzkoušen také novější přístup tranfekce pomocí transpozonového systému piggyBac.

Jako cílové buňky byly nejprve zamýšleny buněčné linie transfekované gB, ale vzhledem k problémům se zadržováním gB intracelulárně byly nakonec použity HCMV-infikované buňky LEP, u kterých byla potvrzena exprese povrchového gB.

Z funkčních testů byla provedena inkubace T lymfocytů s infikovanými buňkami a analýza média na IFN $\gamma$  metodou ELISA. U experimentálních inkubací gBCAR T lymfocytů s infikovanými LEP buňkami byla pozorována mnohonásobně vyšší koncentrace IFN $\gamma$  v porovnání s kontrolami.

gBCAR je tedy v modifikovaných T lymfocytech exprimován a z daných výsledků vyvozujeme, že dodává T lymfocytům schopnost reagovat na HCMV-infikované buňky. Budou však potřeba další funkční testy, které tento předpoklad potvrdí. Také je potřeba pečlivě vzít v úvahu výsledky studie Proff *et al.* (2016), která hovoří o nefunkčnosti CAR proti gB. Je zde rovněž prostor pro optimalizaci vnášení gBCAR do T lymfocytů a pro optimalizace expanzí gBCAR T lymfocytů. Touto prací byly položeny základy pro další možný vývoj HCMV-specifických CAR na ÚHKT.

## 8 Použitá literatura

- Ali, A., Kitchen, S.G., Chen, I.S.Y., Ng, H.L., Zack, J.A., & Yang, O.O. (2016). HIV-1-specific chimeric antigen receptors based on broadly neutralizing antibodies. *Journal of Virology* 90 (15), 6999–7006.
- Annenkov, A., & Chernajovsky, Y. (2000). Engineering mouse T lymphocytes specific to type II collagen by transduction with a chimeric receptor consisting of a single chain Fv and TCR zeta. *Gene Therapy* 7 (8), 714–722.
- Benson, D.A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., & Sayers, E.W. (2012). GenBank. *Nucleic Acids Research* 41 (D1), D36–D42.
- Biron, K.K. (2006). Antiviral drugs for cytomegalovirus diseases. *Antiviral Research* 71 (2–3), 154–163.
- Blomberg, K., Hautala, R., Lövgren, J., Mukkala, V.M., Lindqvist, C., & Akerman, K. (1996). Time-resolved fluorometric assay for natural killer activity using target cells labelled with a fluorescence enhancing ligand. *Journal of Immunological Methods* 193 (2), 199–206.
- Bohne, F., Chmielewski, M., Ebert, G., Wiegmann, K., Kürschner, T., Schulze, A., Urban, S., Krönke, M., Abken, H., & Protzer, U. (2008). T cells redirected against hepatitis B virus surface proteins eliminate infected hepatocytes. *Gastroenterology* 134 (1), 239–247.
- Britt, W.J. (1984). Neutralizing antibodies detect a disulfide-linked glycoprotein complex within the envelope of human cytomegalovirus. *Virology* 135 (2), 369–378.
- Britt, W.J., & Auger, D. (1986). Synthesis and processing of the envelope gp55-116 complex of human cytomegalovirus. *Journal of Virology* 58 (1), 185–191.
- Brockner, T. (2000). Chimeric Fv-zeta or Fv-epsilon receptors are not sufficient to induce activation or cytokine production in peripheral T cells. *Blood* 96 (5), 1999–2001.
- Burke, H.G., & Heldwein, E.E. (2015). Crystal structure of the human cytomegalovirus glycoprotein B. *PLoS Pathogens* 11 (10), 1–21.
- Cannon, M.J., Schmid, D.S., & Hyde, T.B. (2010). Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Reviews in Medical Virology* 20 (4), 202–213.
- Crump, C.M., Hung, C.-H., Thomas, L., Wan, L., & Thomas, G. (2003). Role of PACS-1 in trafficking of human cytomegalovirus glycoprotein B and virus production. *Journal of Virology* 77 (20), 11105–11113.
- Dargan, D.J., Jamieson, F.E., MacLean, J., Dolan, A., Addison, C., & McGeoch, D.J. (1997). The published DNA sequence of human cytomegalovirus strain AD169 lacks 929 base pairs affecting genes UL42 and UL43. *Journal of Virology* 71 (12), 9833–9836.
- Davies, D., Foster, J., Van Der Stegen, S.J.C., Parente-Pereira, A.C., Chiapero-Stanke, L., Delinassios, G.J., Burbridge, S.E., Kao, V., Liu, Z., Bosshard-Carter, L., *et al.* (2012). Flexible targeting of ErbB dimers that drive tumorigenesis by using genetically engineered T cells. *Molecular Medicine* 18 (4), 1.
- Davis, H.E., Morgan, J.R., & Yarmush, M.L. (2002). Polybrene increases retrovirus gene transfer efficiency by enhancing receptor-independent virus adsorption on target cell membranes. *Biophysical Chemistry* 97 (2–3), 159–172.
- Deeks, S.G., Wagner, B., Anton, P.A., Mitsuyasu, R.T., Scadden, D.T., Huang, C., Macken, C., Richman, D.D., Christopherson, C., June, C.H., *et al.* (2002). A phase II randomized study of HIV-specific T-cell gene

- therapy in subjects with undetectable plasma viremia on combination antiretroviral therapy. *Molecular Therapy* 5 (6), 788–797.
- Einsele, H., Roosnek, E., Rufer, N., Sinzger, C., Riegler, S., Löffler, J., Grigoleit, U., Moris, A., Rammensee, H.-G., Kanz, L., *et al.* (2002). Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood* 99 (11), 3916–3922.
- FDA - U.S. Food and Drug Administration (2017). FDA approval brings first gene therapy to the United States. In: *U.S. Food and Drug Administration* [online]. Silver Spring, MD, U.S.: U.S. Department of Health and Human Services [cit. 2018-04-22]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm574058.htm>
- FDA - U.S. Food and Drug Administration (2017). FDA approves CAR-T cell therapy to treat adults with certain types of large B-cell lymphoma. In: *U.S. Food and Drug Administration* [online]. Silver Spring, MD, U.S.: U.S. Department of Health and Human Services [cit. 2018-04-22]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm581216.htm>
- Finney, H.M., Lawson, A.D., Bebbington, C.R., & Weir, A.N. (1998). Chimeric receptors providing both primary and costimulatory signaling in T cells from a single gene product. *Journal of Immunology* 161 (6), 2791–2797.
- Frange, P., & Leruez-Ville, M. (2018). Maribavir, brincidofovir et létermovir: nouveaux antiviraux développés pour le traitement des infections à cytomégalo­virus. *Medecine et Maladies Infectieuses*.
- Frey, N. (2017). Cytokine release syndrome: Who is at risk and how to treat. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 30 (4), 336–340.
- Full, F., Lehner, M., Thonn, V., Goetz, G., Scholz, B., Kaufmann, K.B., Mach, M., Abken, H., Holter, W., & Ensser, A. (2010). T cells engineered with a cytomegalovirus-specific chimeric immunoreceptor. *Journal of Virology* 84 (8), 4083–4088.
- Gattinoni, L., Lugli, E., Ji, Y., Pos, Z., Paulos, C.M., Quigley, M.F., Almeida, J.R., Gostick, E., Yu, Z., Carpenito, C., *et al.* (2011). A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nature Medicine* 17 (10), 1290–1297.
- Gattinoni, L., Speiser, D.E., Lichterfeld, M., & Bonini, C. (2017). T memory stem cells in health and disease. *Nature Medicine* 23 (1), 18–27.
- Geraerts, M., Willems, S., Baekelandt, V., Debyser, Z., & Gijssbers, R. (2006). Comparison of lentiviral vector titration methods. *BMC Biotechnology* 6 34.
- Geyer, M.B., & Brentjens, R.J. (2016). Current clinical applications of chimeric antigen receptor (CAR) modified T cells. *Cytotherapy* 18 (11), 1393–1409.
- Gill, S., Maus, M. V., & Porter, D.L. (2016). Chimeric antigen receptor T cell therapy: 25 years in the making. *Blood Reviews* 30 (3), 157–167.
- Göhring, K., Hamprecht, K., & Jahn, G. (2015). Antiviral drug- and multidrug resistance in cytomegalovirus infected SCT patients. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 13 153–159.
- Grada, Z., Hegde, M., Byrd, T., Shaffer, D.R., Ghazi, A., Brawley, V.S., Corder, A., Schönfeld, K., Koch, J., Dotti, G., *et al.* (2013). TanCAR: A novel bispecific chimeric antigen receptor for cancer immunotherapy. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 2 e105.
- Gross, G., Waks, T., & Eshhar, Z. (1989). Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules

as functional receptors with antibody-type specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86 (24), 10024–10028.

- Hanley, P.J., Melenhorst, J.J., Nikiforow, S., Scheinberg, P., Blaney, J.W., Demmler-Harrison, G., Cruz, C.R., Lam, S., Krance, R.A., Leung, K.S., *et al.* (2015). CMV-specific T cells generated from naïve T cells recognize atypical epitopes and may be protective in vivo. *Science Translational Medicine* 7 (285), 285ra63.
- Heczey, A., & Louis, C.U. (2013). Advances in chimeric antigen receptor immunotherapy for neuroblastoma. *Discovery Medicine* 16 (90), 287–294.
- Hegde, N.R., Dunn, C., Lewinsohn, D.M., Jarvis, M.A., Nelson, J.A., & Johnson, D.C. (2005). Endogenous human cytomegalovirus gB is presented efficiently by MHC class II molecules to CD4<sup>+</sup> CTL. *Journal of Cell Biology* 171 (2), 1109–1119.
- Heslop, H.E., Ng, C.Y.C., Li, C., Smith, C.A., Loftin, S.K., Krance, R.A., Brenner, M.K., & Rooney, C.M. (1996). Long-term restoration of immunity against Epstein–Barr virus infection by adoptive transfer of gene-modified virus-specific T lymphocytes. *Nature Medicine* 2 (5), 551–555.
- Homman-Loudiyi, M., Hultenby, K., Britt, W., & Söderberg-Nauclér, C. (2003). Envelopment of human cytomegalovirus occurs by budding into Golgi-derived vacuole compartments positive for gB, Rab 3, trans-golgi network 46, and mannosidase II. *Journal of Virology* 77 (5), 3191–3203.
- Chan, S.T., & Logan, A.C. (2017). The clinical impact of cytomegalovirus infection following allogeneic hematopoietic cell transplantation: Why the quest for meaningful prophylaxis still matters. *Blood Reviews* 31 (3), 173–183.
- Chandramouli, S., Ciferri, C., Nikitin, P.A., Caló, S., Gerrein, R., Balabanis, K., Monroe, J., Hebner, C., Lilja, A.E., Settembre, E.C., *et al.* (2015). Structure of HCMV glycoprotein B in the postfusion conformation bound to a neutralizing human antibody. *Nature Communications* 6 (1), 8176.
- Chaudhry, M.Z., Kasmampour, B., Plaza-Sirvent, C., Bajagic, M., Casalegno Garduño, R., Borkner, L., Lenac Roviš, T., Scrima, A., Jonjic, S., Schmitz, I., *et al.* (2017). UL36 Rescues Apoptosis Inhibition and In vivo Replication of a Chimeric MCMV Lacking the M36 Gene. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7 312.
- Chmielewski, M., Hombach, A.A., & Abken, H. (2014). Of CARs and TRUCKs: chimeric antigen receptor (CAR) T cells engineered with an inducible cytokine to modulate the tumor stroma. *Immunological Reviews* 257 (1), 83–90.
- Isaacson, M.K., & Compton, T. (2009). Human cytomegalovirus glycoprotein B is required for virus entry and cell-to-cell spread but not for virion attachment, assembly, or egress. *Journal of Virology* 83 (8), 3891–3903.
- Jackson, S.E., Mason, G.M., & Wills, M.R. (2011). Human cytomegalovirus immunity and immune evasion. *Virus Research* 157 (2), 151–160.
- Jarvis, M.A., Fish, K.N., Söderberg-Naucler, C., Streblow, D.N., Meyers, H.L., Thomas, G., & Nelson, J.A. (2002). Retrieval of human cytomegalovirus glycoprotein B from cell surface is not required for virus envelopment in astrocytoma cells. *Journal of Virology* 76 (10), 5147–5155.
- Jarvis, M.A., Jones, T.R., Drummond, D.D., Smith, P.P., Britt, W.J., Nelson, J.A., & Baldick, C.J. (2004). Phosphorylation of human cytomegalovirus glycoprotein B (gB) at the acidic cluster casein kinase 2

- site (Ser900) is required for localization of gB to the trans-Golgi network and efficient virus replication. *Journal of Virology* 78 (1), 285–293.
- Jean Beltran, P.M., & Cristea, I.M. (2014). The life cycle and pathogenesis of human cytomegalovirus infection: lessons from proteomics. *Expert Review of Proteomics* 11 (6), 697–711.
- Kleiveland C.R. (2015). Peripheral Blood Mononuclear Cells. In: Verhoeckx K. et al. (eds) *The Impact of Food Bioactives on Health*, 161-167. Springer, Cham. Online ISBN 978-3-319-16104-4.
- Kniess, N., Mach, M., Fay, J., & Britt, W.J. (1991). Distribution of linear antigenic sites on glycoprotein gp55 of human cytomegalovirus. *Journal of Virology* 65 (1), 138–146.
- Kochenderfer, J.N., Dudley, M.E., Feldman, S.A., Wilson, W.H., Spaner, D.E., Maric, I., Stetler-Stevenson, M., Phan, G.Q., Hughes, M.S., Sherry, R.M., et al. (2012). B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells. *Blood* 119 (12), 2709–2720.
- Kochenderfer, J.N., & Rosenberg, S.A. (2013). Treating B-cell cancer with T cells expressing anti-CD19 chimeric antigen receptors. *Nature Reviews Clinical Oncology* 10 (5), 267–276.
- Kong, S., Sengupta, S., Tyler, B., Bais, A.J., Ma, Q., Doucette, S., Zhou, J., Sahin, A., Carter, B.S., Brem, H., et al. (2012). Suppression of human glioma xenografts with second-generation IL13R-specific chimeric antigen receptor-modified T cells. *Clinical Cancer Research* 18 (21), 5949–5960.
- Koszinowski, U.H., Reddehase, M.J., Keil, G.M., Volkmer, H., Jonjic, S., Messerle, M., del Val, M., Mutter, W., Münch, K., & Bühler, B. (1987). Molecular analysis of herpesviral gene products recognized by protective cytolytic T lymphocytes. *Immunology Letters* 16 (3–4), 185–192.
- Krebs, K., Böttinger, N., Huang, L., Chmielewski, M., Arzberger, S., Gasteiger, G., Jäger, C., Schmitt, E., Bohne, F., Aichler, M., et al. (2013). T cells expressing a chimeric antigen receptor that binds hepatitis B virus envelope proteins control virus replication in mice. *Gastroenterology* 145 (2), 456–465.
- Kroutilová, Marie. *Molekuly podílející se na úniku před imunitním systémem kódované genovou oblastí US2-US11 lidského cytomegaloviru*. Praha, 2015. Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze.
- Lantto, J., Lindroth, Y., & Ohlin, M. (2002). Non-germ-line encoded residues are critical for effective antibody recognition of a poorly immunogenic neutralization epitope on glycoprotein B of human cytomegalovirus. *European Journal of Immunology* 32 (6), 1659–1669.
- Lantto, J., Fletcher, J.M., & Ohlin, M. (2003). Binding characteristics determine the neutralizing potential of antibody fragments specific for antigenic domain 2 on glycoprotein b of human cytomegalovirus. *Virology* 305 (1), 201–209.
- Lee, H.-J., Lee, Y.-S., Kim, H.-S., Kim, Y.-K., Kim, J.-H., Jeon, S.-H., Lee, H.-W., Kim, S., Miyoshi, H., Chung, H.-M., et al. (2009). Retronectin enhances lentivirus-mediated gene delivery into hematopoietic progenitor cells. *Biologicals* 37 (4), 203–209.
- Leen, A.M., Bollard, C.M., Mendizabal, A.M., Shpall, E.J., Szabolcs, P., Antin, J.H., Kapoor, N., Pai, S.-Y., Rowley, S.D., Kebriaei, P., et al. (2013). Multicenter study of banked third-party virus-specific T cells to treat severe viral infections after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 121 (26), 5113–5123.
- Leibman, R.S., Richardson, M.W., Ellebrecht, C.T., Maldini, C.R., Glover, J.A., Secreto, A.J., Kulikovskaya, I., Lacey, S.F., Akkina, S.R., Yi, Y., et al. (2017). Supraphysiologic control over HIV-1 replication mediated by CD8 T cells expressing a re-engineered CD4-based chimeric antigen receptor. *PLoS*

*Pathogens* 13 (10), e1006613.

- Long, A.H., Haso, W.M., Shern, J.F., Wanhainen, K.M., Murgai, M., Ingaramo, M., Smith, J.P., Walker, A.J., Kohler, M.E., Venkateshwara, V.R., *et al.* (2015). 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors. *Nature Medicine* 21 (6), 581–590.
- Masiero, S., Del Vecchio, C., Gavioli, R., Mattiuzzo, G., Cusi, M.G., Micheli, L., Gennari, F., Siccardi, A., Marasco, W.A., Palù, G., *et al.* (2005). T-cell engineering by a chimeric T-cell receptor with antibody-type specificity for the HIV-1 gp120. *Gene Therapy* 12 (4), 299–310.
- Merten, O.W., Hebben, M., & Bovolenta, C. (2016). Production of lentiviral vectors. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development* 3 16017.
- Meyer, H., Sundqvist, V.-A., Pereira, L., & Mach, M. (1992). Glycoprotein gp116 of human cytomegalovirus contains epitopes for strain-common and strain-specific antibodies. *Journal of General Virology* 73 (9), 2375–2383.
- Milone, M.C., Fish, J.D., Carpenito, C., Carroll, R.G., Binder, G.K., Teachey, D., Samanta, M., Lakhali, M., Gloss, B., Danet-Desnoyers, G., *et al.* (2009). Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy in vivo. *Molecular Therapy* 17 (8), 1453–1464.
- Milone, M.C., & O'Doherty, U. (2018). Clinical use of lentiviral vectors. *Leukemia* 1–13.
- Mitsuyasu, R.T., Anton, P.A., Deeks, S.G., Scadden, D.T., Connick, E., Downs, M.T., Bakker, A., Roberts, M.R., June, C.H., Jalali, S., *et al.* (2000). Prolonged survival and tissue trafficking following adoptive transfer of CD4zeta gene-modified autologous CD4(+) and CD8(+) T cells in human immunodeficiency virus-infected subjects. *Blood* 96 (3), 785–793.
- Müller L., Hamprecht K., Pawelec G. (2017). The Role of CMV in Immunosenescence. In: Bueno V., Lord J., Jackson T. (eds) *The Ageing Immune System and Health*, 53-68. Springer, Cham. Online ISBN 978-3-319-43365-3.
- Murphy, E., Rigoutsos, I., Shibuya, T., & Shenk, T.E. (2003a). Reevaluation of human cytomegalovirus coding potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (23), 13585–13590.
- Murphy, E., Yu, D., Grimwood, J., Schmutz, J., Dickson, M., Jarvis, M.A., Hahn, G., Nelson, J.A., Myers, R.M., & Shenk, T.E. (2003b). Coding potential of laboratory and clinical strains of human cytomegalovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (25), 14976–14981.
- Nakazawa, Y., Huye, L.E., Salsman, V.S., Leen, A.M., Ahmed, N., Rollins, L., Dotti, G., Gottschalk, S.M., Wilson, M.H., & Rooney, C.M. (2011). PiggyBac-mediated cancer immunotherapy using EBV-specific cytotoxic T-cells expressing HER2-specific chimeric antigen receptor. *Molecular Therapy* 19 (12), 2133–2143.
- Nemeckova, S., Krystofova, J., Babiarova, K., Hainz, P., Musil, J., Sroller, V., Maly, M., & Stastna-Markova, M. (2016a). Reconstitution of cytomegalovirus-specific T-cell response in allogeneic hematopoietic stem cell recipients: the contribution of six frequently recognized, virus-encoded ORFs. *Transplant Infectious Disease* 18 (3), 381–389.
- Nemeckova, S., Sroller, V., & Stastna-Markova, M. (2016b). Evolution of human cytomegalovirus-seronegative donor-/seropositive recipient high-risk combination frequency in allogeneic hematopoietic stem cell transplantations at Institute of Hematology and Blood Transfusion during

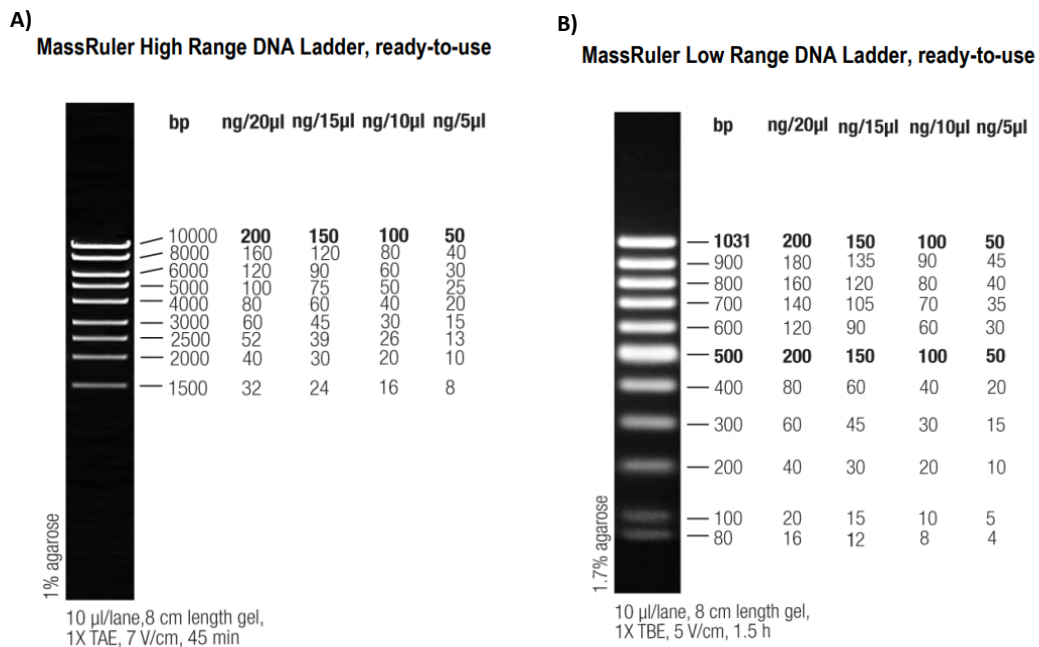
- 1995-2014. *Transplant Infectious Disease* 18 (2), 297–301.
- Nicholson, E., & Peggs, K.S. (2015). Cytomegalovirus-specific T-cell therapies: current status and future prospects. *Immunotherapy* 7 (2), 135–146.
- Ohlin, M., Sundqvist, V.A., Mach, M., Wahren, B., & Borrebaeck, C.A. (1993). Fine specificity of the human immune response to the major neutralization epitopes expressed on cytomegalovirus gp58/116 (gB), as determined with human monoclonal antibodies. *Journal of Virology* 67 (2), 703–710.
- Ohlin, M., & Söderberg-Nauclér, C. (2015). Human antibody technology and the development of antibodies against cytomegalovirus. *Molecular Immunology* 67 (2), 153–170.
- Otáhal, P., Průčková, D., Král, V., Fabry, M., Vočková, P., Latečková, L., Trněný, M., & Klener, P. (2016). Lenalidomide enhances antitumor functions of chimeric antigen receptor modified T cells. *Oncotarget* 7 (4), e1115940.
- Pöttsch, S., Spindler, N., Wieggers, A.-K., Fisch, T., Rücker, P., Sticht, H., Grieb, N., Baroti, T., Weisel, F., Stamminger, T., *et al.* (2011). B cell repertoire analysis identifies new antigenic domains on glycoprotein B of human cytomegalovirus which are target of neutralizing antibodies. *PLoS Pathogens* 7 (8), e1002172.
- Proff, J., Walterskirchen, C., Brey, C., Geyeregger, R., Full, F., Ensser, A., Lehner, M., & Holter, W. (2016). Cytomegalovirus-infected cells resist T cell mediated killing in an HLA-recognition independent manner. *Frontiers in Microbiology* 7 (JUN), 844.
- Ptáčková, P., Musil, J., Štach, M., Lesný, P., Němečková, Š., Král, V., Fábry, M., & Otáhal, P. (2018). A new approach to CAR T-cell gene engineering and cultivation using piggyBac transposon in the presence of IL-4, IL-7 and IL-21. *Cytotherapy* 20 (4), 507–520.
- Pule, M.A., Savoldo, B., Myers, G.D., Rossig, C., Russell, H. V., Dotti, G., Huls, M.H., Liu, E., Gee, A.P., Mei, Z., *et al.* (2008). Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. *Nature Medicine* 14 (11), 1264–1270.
- Pulè, M.A., Straathof, K.C., Dotti, G., Heslop, H.E., Rooney, C.M., & Brenner, M.K. (2005). A chimeric T cell antigen receptor that augments cytokine release and supports clonal expansion of primary human T cells. *Molecular Therapy* 12 (5), 933–941.
- Quinnan, G. V., Kirmani, N., Rook, A.H., Manischewitz, J.F., Jackson, L., Moreschi, G., Santos, G.W., Saral, R., & Burns, W.H. (1982). Cytotoxic t cells in cytomegalovirus infection: HLA-restricted T-lymphocyte and non-T-lymphocyte cytotoxic responses correlate with recovery from cytomegalovirus infection in bone-marrow-transplant recipients. *New England Journal of Medicine* 307 (1), 7–13.
- Radsak, K., Eickmann, M., Mockenhaupt, T., Bogner, E., Kern, H., Eis-Hübinger, A., & Reschke, M. (1996). Retrieval of human cytomegalovirus glycoprotein B from the infected cell surface for virus envelopment. *Archives of Virology* 141 (3–4), 557–572.
- Reboredo, M., Greaves, R.F., & Hahn, G. (2004). Human cytomegalovirus proteins encoded by UL37 exon 1 protect infected fibroblasts against virus-induced apoptosis and are required for efficient virus replication. *Journal of General Virology* 85 (12), 3555–3567.
- Reddehase, M.J. (2016). Mutual interference between cytomegalovirus and reconstitution of protective immunity after hematopoietic cell transplantation. *Frontiers in Immunology* 7 (AUG), 294.
- Reddehase, M.J., Weiland, F., Münch, K., Jonjic, S., Lüske, A., & Koszinowski, U.H. (1985). Interstitial murine

- cytomegalovirus pneumonia after irradiation: characterization of cells that limit viral replication during established infection of the lungs. *Journal of Virology* 55 (2), 264–273.
- Reusser, P., Riddell, S.R., Meyers, J.D., & Greenberg, P.D. (1991). Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood* 78 (5), 1373–1380.
- Riddell, S.R., Watanabe, K.S., Goodrich, J.M., Li, C.R., Agha, M.E., & Greenberg, P.D. (1992). Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science* 257 (5067), 238–241.
- Roberts, M.R., Qin, L., Zhang, D., Smith, D.H., Tran, A.C., Dull, T.J., Groopman, J.E., Capon, D.J., Byrn, R.A., & Finer, M.H. (1994). Targeting of human immunodeficiency virus-infected cells by CD8+ T lymphocytes armed with universal T-cell receptors. *Blood* 84 (9), 2878–2889.
- Rodríguez-Pinto, D. (2005). B cells as antigen presenting cells. *Cellular Immunology* 238 (2), 67–75.
- Romeo, C., & Seed, B. (1991). Cellular immunity to HIV activated by CD4 fused to T cell or Fc receptor polypeptides. *Cell* 64 (5), 1037–1046.
- Rossig, C., Bollard, C.M., Nuchtern, J.G., Rooney, C.M., & Brenner, M.K. (2002). Epstein-Barr virus-specific human T lymphocytes expressing antitumor chimeric T-cell receptors: potential for improved immunotherapy. *Blood* 99 (6), 2009–2016.
- Sanchez, V., Greis, K.D., Sztul, E., & Britt, W.J. (2000). Accumulation of virion tegument and envelope proteins in a stable cytoplasmic compartment during human cytomegalovirus replication: characterization of a potential site of virus assembly. *Journal of Virology* 74 (2), 975–986.
- Sautto, G.A., Wisskirchen, K., Clementi, N., Castelli, M., Diotti, R.A., Graf, J., Clementi, M., Burioni, R., Protzer, U., & Mancini, N. (2016). Chimeric antigen receptor (CAR)-engineered T cells redirected against hepatitis C virus (HCV) E2 glycoprotein. *Gut* 65 (3), 512–523.
- Savoldo, B., Rooney, C.M., Di Stasi, A., Abken, H., Hombach, A., Foster, A.E., Zhang, L., Heslop, H.E., Brenner, M.K., & Dotti, G. (2007). Epstein Barr virus specific cytotoxic T lymphocytes expressing the anti-CD30 artificial chimeric T-cell receptor for immunotherapy of Hodgkin disease. *Blood* 110 (7), 2620–2630.
- Savoldo, B., Ramos, C.A., Liu, E., Mims, M.P., Keating, M.J., Carrum, G., Kamble, R.T., Bollard, C.M., Gee, A.P., Mei, Z., *et al.* (2011). CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients. *The Journal of Clinical Investigation* 121 (5), 1822–1826.
- Sharma, S., Wisner, T.W., Johnson, D.C., & Heldwein, E.E. (2013). HCMV gB shares structural and functional properties with gB proteins from other herpesviruses. *Virology* 435 (2), 239–249.
- Schleiss, M.R. (2016). Cytomegalovirus vaccines under clinical development. *Journal of Virus Eradication* 2 (4), 198–207.
- Scholler, J., Brady, T.L., Binder-Scholl, G., Hwang, W.T., Plesa, G., Hege, K.M., Vogel, A.N., Kalos, M., Riley, J.L., Deeks, S.G., *et al.* (2012). Decade-long safety and function of retroviral-modified chimeric antigen receptor T cells. *Science Translational Medicine* 4 (132), 132ra53–132ra53.
- Speckner, A., Glykofrydes, D., Ohlin, M., & Mach, M. (1999). Antigenic domain 1 of human cytomegalovirus glycoprotein B induces a multitude of different antibodies which, when combined, results in

- incomplete virus neutralization. *Journal of General Virology* 80 2183–2191.
- Talbot, S.J., Blair, N.F., McGill, N., Ligertwood, Y., Dutia, B.M., & Johannessen, I. (2013). An influenza virus M2 protein specific chimeric antigen receptor modulates influenza A/WSN/33 H1N1 infection in vivo. *The Open Virology Journal* 7 28–36.
- Trickett, A., & Kwan, Y.L. (2003). T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads. *Journal of Immunological Methods* 275 (1–2), 251–255.
- Utz, U., Britt, W., Vugler, L., & Mach, M. (1989). Identification of a neutralizing epitope on glycoprotein gp58 of human cytomegalovirus. *Journal of Virology* 63 (5), 1995–2001.
- Vanarsdall, A.L., & Johnson, D.C. (2012). Human cytomegalovirus entry into cells. *Current Opinion in Virology* 2 (1), 37–42.
- Verma, S., Weiskopf, D., Gupta, A., McDonald, B., Peters, B., Sette, A., & Benedict, C.A. (2016). Cytomegalovirus-Specific CD4 T Cells Are Cytolytic and Mediate Vaccine Protection. *Journal of Virology* 90 (2), 650–658.
- Vey, M., Schäfer, W., Reis, B., Ohuchi, R., Britt, W., Garten, W., Klenk, H.D., & Radsak, K. (1995). Proteolytic processing of human cytomegalovirus glycoprotein B (gpUL55) is mediated by the human endoprotease furin. *Virology* 206 (1), 746–749.
- Walker, R.E., Bechtel, C.M., Natarajan, V., Baseler, M., Hege, K.M., Metcalf, J.A., Stevens, R., Hazen, A., Blaese, R.M., Chen, C.C., *et al.* (2000). Long-term in vivo survival of receptor-modified syngeneic T cells in patients with human immunodeficiency virus infection. *Blood* 96 (2), 467–474.
- Walter, E.A., Greenberg, P.D., Gilbert, M.J., Finch, R.J., Watanabe, K.S., Thomas, E.D., & Riddell, S.R. (1995). Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *New England Journal of Medicine* 333 (16), 1038–1044.
- Weekes, M.P., Tomasec, P., Huttlin, E.L., Fielding, C.A., Nusinow, D., Stanton, R.J., Wang, E.C.Y., Aicheler, R., Murrell, I., Wilkinson, G.W.G., *et al.* (2014). Quantitative temporal viromics: an approach to investigate host-pathogen interaction. *Cell* 157 (6), 1460–1472.
- Wille, P.T., Wisner, T.W., Ryckman, B., & Johnson, D.C. (2013). Human cytomegalovirus (HCMV) glycoprotein gB promotes virus entry in trans acting as the viral fusion protein rather than as a receptor-binding protein. *mBio* 4 (3), e00332-13-e00332-13.
- Woodard, L.E., & Wilson, M.H. (2015). piggyBac-ing models and new therapeutic strategies. *Trends in Biotechnology* 33 (9), 525–533.
- Zhao, Y., Zheng, Z., Cohen, C.J., Gattinoni, L., Palmer, D.C., Restifo, N.P., Rosenberg, S.A., & Morgan, R.A. (2006). High-efficiency transfection of primary human and mouse T lymphocytes using RNA electroporation. *Molecular Therapy* 13 (1), 151–159.
- Zhen, A., Kamata, M., Rezek, V., Rick, J., Levin, B., Kasparian, S., Chen, I.S., Yang, O.O., Zack, J.A., & Kitchen, S.G. (2015). HIV-specific immunity derived from chimeric antigen receptor-engineered stem cells. *Molecular Therapy* 23 (8), 1358–1367.
- van Zuylen, W.J., Hamilton, S.T., Naing, Z., Hall, B., Shand, A., & Rawlinson, W.D. (2014). Congenital cytomegalovirus infection: Clinical presentation, epidemiology, diagnosis and prevention. *Obstetric Medicine* 7 (4), 140–146.

## 9 Přílohy

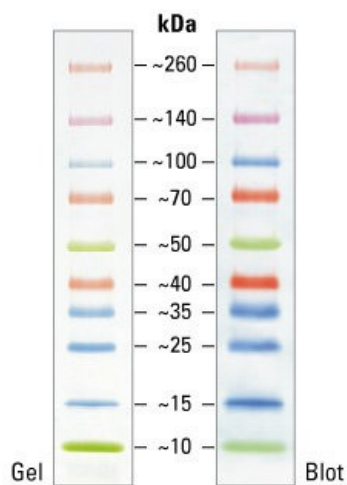
### 9.1 Profily standardů molekulových hmotností DNA



**Obrázek č. I: Standardy molekulových hmotností DNA (Thermo Fisher Scientific)**

A) MassRuler High Range DNA Ladder, ready-to-use, B) MassRuler Low Range DNA Ladder, ready-to-use. Obrázky převzaty z: A) <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/SM0393> [15. 4. 2018], B) <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/SM0383> [15. 4. 2018].

### 9.2 Profil standardu molekulové hmotnosti proteinů



**Obrázek č. II: Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder**

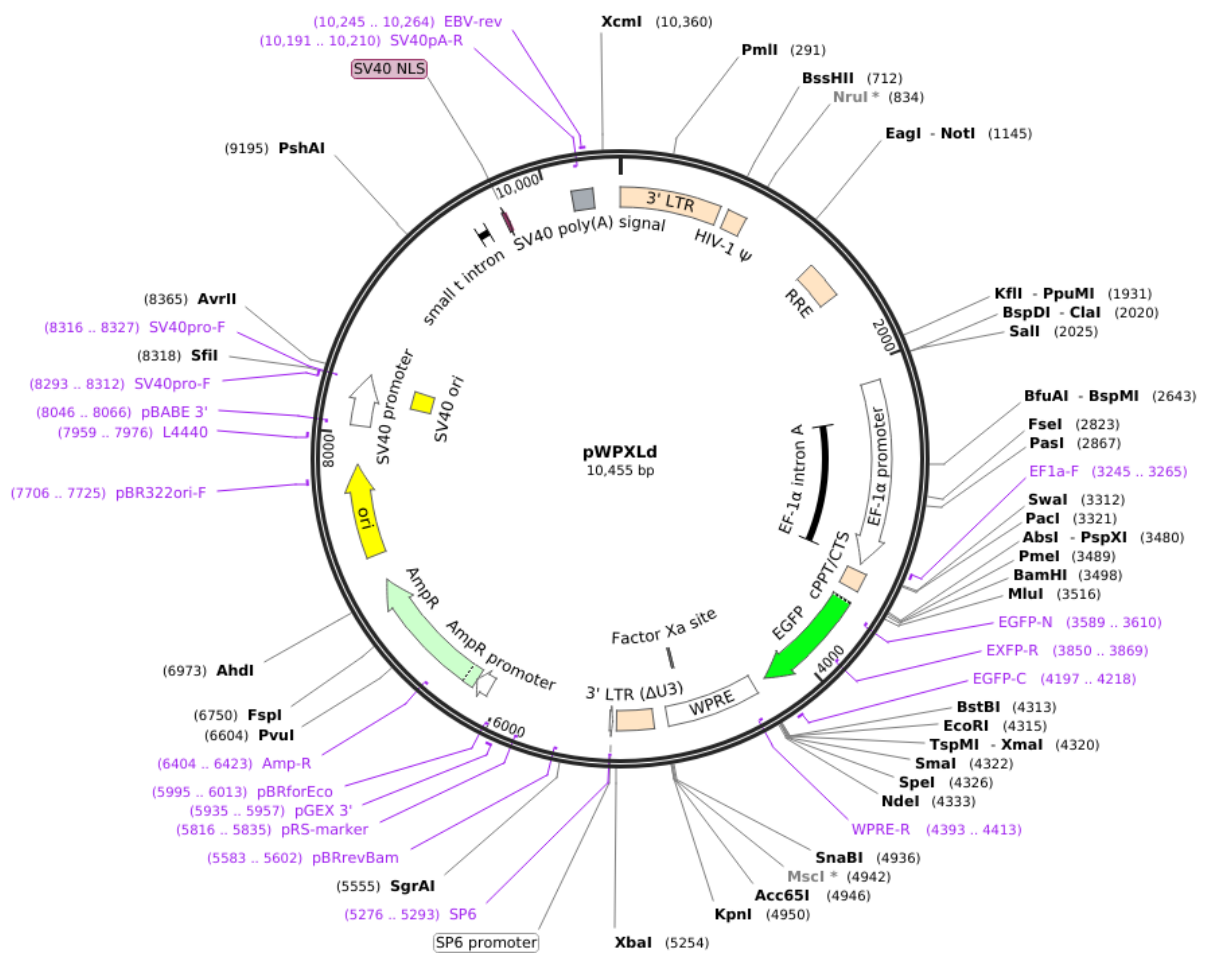
Obrázek převzat z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/26634> [15. 4. 2018].

## 9.3 Mapy plazmidových vektorů

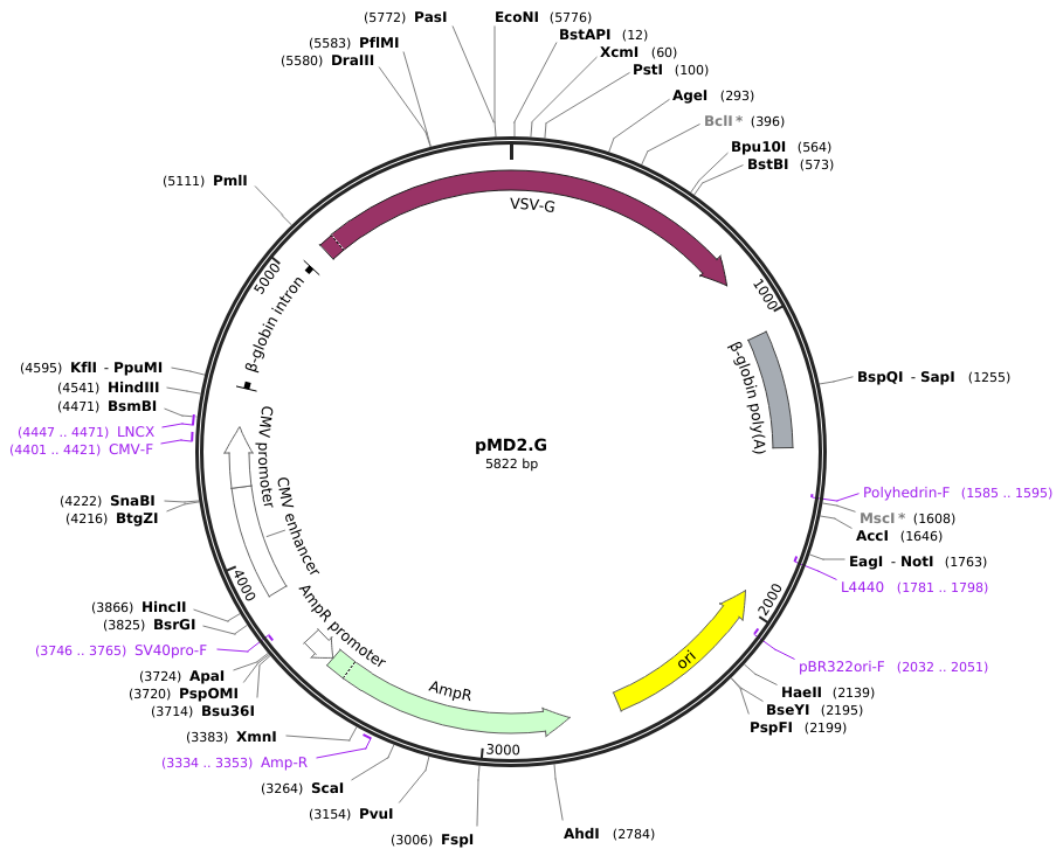
Mapy lentivirových vektorů byly staženy z databáze Addgene (<https://www.addgene.org/>, 24. 4. 2018). Mapy vektorů piggyBac a pBK-CMV byly vizualizovány v programu SnapGene podle sekvencí poskytnutých MUDr. Pavlem Otáhalem, Ph.D., a RNDr. Janem Musilem, Ph.D.

### 9.3.1 Lentivirové vektory

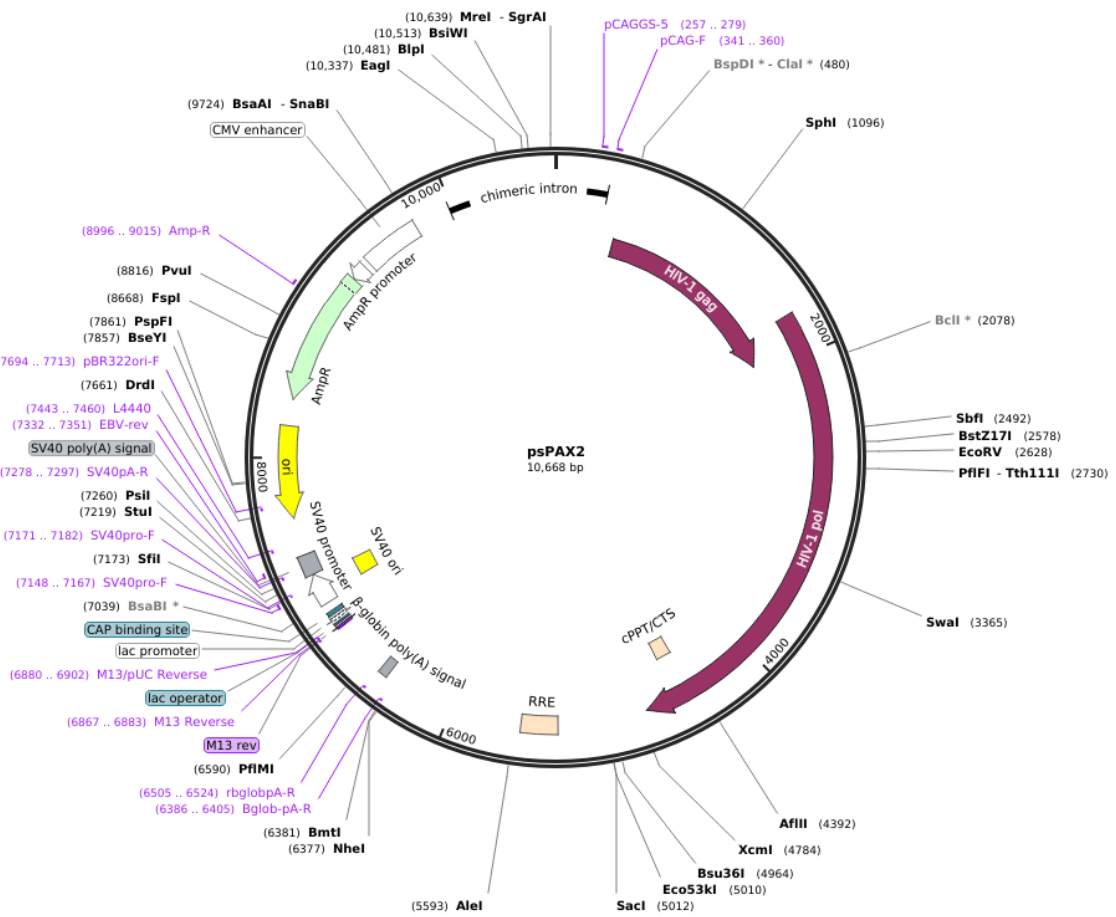
#### 9.3.1.1 pWPXLd



### 9.3.1.2 pMD2.G

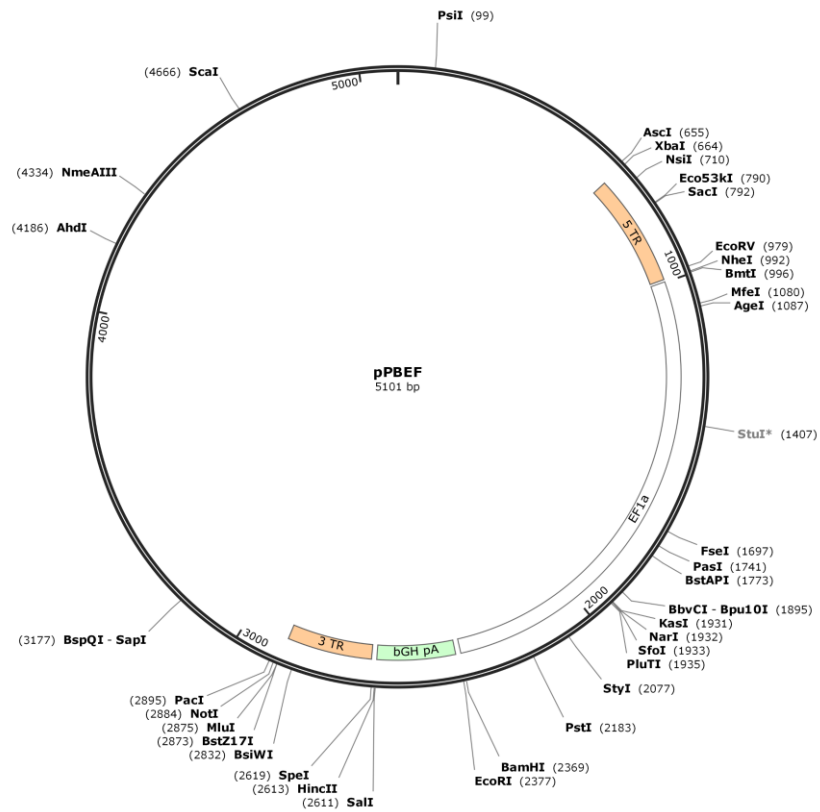


### 9.3.1.3 psPAX2

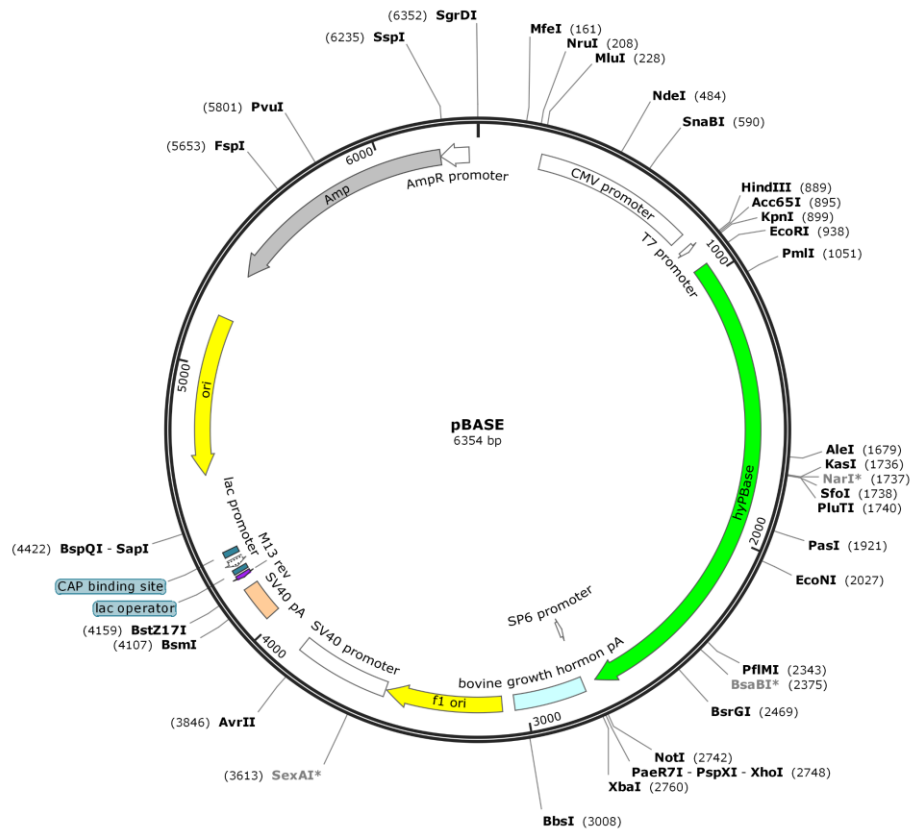


## 9.3.2 Plazmidy piggyBac transpozonového systému

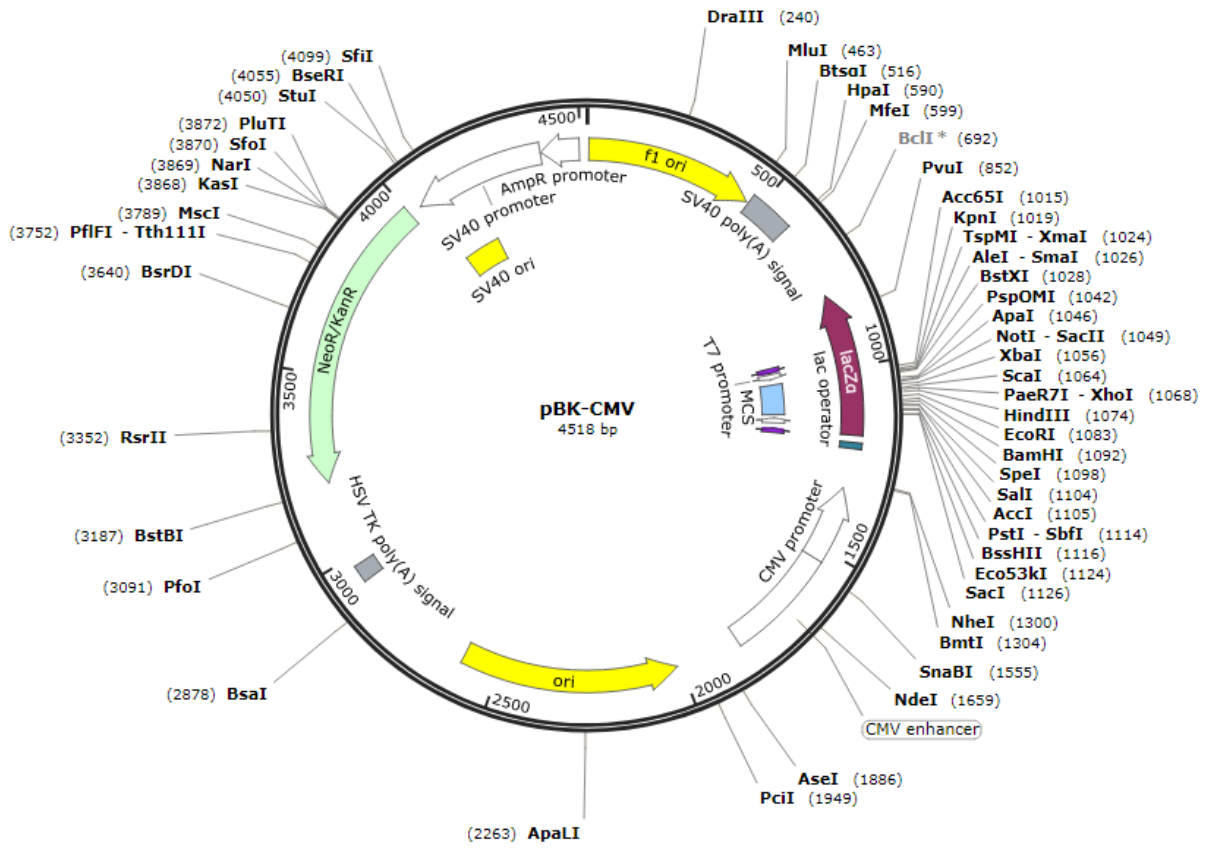
### 9.3.2.1 pPBEF



### 9.3.2.2 pBASE



### 9.3.3 pBK-CMV



## 9.4 Konfigurace průtokového cytometru BD LSRFortessa™

Lasert name	Detector	Mirror	Filter	Parameter
Blue 488 nm	A	685 LP	710/50 BP	PerCP-Cy5-5
	B	505 LP	530/30 BP	FITC
	C		488/10 BP	SSC
Violet 405 nm	A	750 LP	780/60	BV786
	B	690 LP	710/50	BV711
	C	630 LP	670/30 BP	BV655
	D	600 LP	610/20 BP	BV605
	F	505 LP	525/50 BP	AmCyan
	G		450/50 BP	Pacific Blue
	H			x
	I			x
UV 355 nm	A	695 LP	740/35	BUV737
	B	570LP	585/15 BP	BUV563
	C		450/50 BP	Indo-1(Violet)
Yellow-green 561 nm	A	750 LP	780/60 BP	PE-Cy7
	B	635 LP	670/30 BP	PE-Cy5
	C	600 LP	610/20 BP	PE-Texas Red
	D		585/15 BP	PE
	E			x
	F			x
	G			x
	H			x
Red 640 nm	A	750 LP	780/60 BP	APC-Cy7
	B	690 LP	730/45 BP	Alexa Fluor 700
	C		670/14 BP	APC

## 9.5 Proteinové sekvence a predikované molekulové hmotnosti

Nukleotidové sekvence byly přeloženy do aminokyselinových pomocí nástroje „Translate“ (<https://web.expasy.org/translate/>; 26. 12. 2017) na internetovém bioinformatickém portálu ExPASy. Z přeložených sekvencí byly poté pomocí nástroje „Compute pI/Mw“ ([https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/); 26. 12. 2017) na též portálu vypočítány pravděpodobné molekulové hmotnosti proteinů.

### 9.5.1 gBCAR

MALPVTALLLPLALLLHAARPTREVQLLESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSEYDMHWVRQAPGKGLQ  
WVAVISVDGSDKHAYADSVKGRFTISRDNQMLFLQMDSLRGDDTAVYYCARDGKSLNGYGLIDYWG  
QGSLTVSSGGGGSGGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVGGYLAWYQQKPGQAPRL  
LIYDASNRAAGIPSRFSGSGGTDFTLTISSLAPEDFAVYFCQRRSSWPPLTFGGGTKLEIKRDKDDDDK  
TSPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY  
CNHRNRRRVKGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQ  
NQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG  
KGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

Molecular weight (Da): 55923.10 (average mass), 55888.04 (monoisotopic mass)

Theoretical pI: 8.97

### 9.5.2 CD19-CAR

MALPVTALLLPLALLLHAARPTREVQLQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGL  
EWIGYVNPYNDGTYNEKFKGKATLTSKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARGPYYYGSSPFDYWGQG  
TTVTVSGGGSGGGGGSGGGGSDIVMTQSPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLNSNGNTYLNWYLQK  
PGQSPQLLIYRVSNRFSGLDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCLQVTHVPPTFGAGTKLEIKRTS  
PTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCN  
HRNRRRVKGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQ  
LYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK  
HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

Molecular weight (Da): 55789.01 (average mass), 55753.87 (monoisotopic mass)

Theoretical pI: 9.15