

Charles University in Prague
Faculty of Science



Thesis summary

Immunotherapy of HPV16 - associated cancers and regulation
of antitumour immune response

Imunoterapie nádorů asociovaných s virem HPV16 a regulace
protinádorové imunitní odpovědi

Ing. Mgr. Ivan Štěpánek

Prague, 2013

Doktorské studijní programy v biomedicíně

Univerzita Karlova v Praze

a Akademie věd České republiky

Program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Předseda oborové rady: Prof. RNDr. Stanislav Zdražil, DrSc.

Školící pracoviště: Oddělení nádorové imunologie, Ústav molekulární genetiky AV ČR, v. v. i.

Autor: Ing. Mgr. Ivan Štěpánek

Školitel: RNDr. Milan Reiniš, CSc.

S disertací je možno se seznámit v příslušných knihovnách Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Obsah (Contents)

Introduction	2
Aims	3
Material and methods	4
Results and discussion.....	5
Conclusion.....	10
Úvod.....	11
Cíle práce.....	12
Materiál a metodika.....	13
Výsledky a diskuze.....	14
Závěr.....	19
References	20
Project-related list of own publications	23
Curriculum Vitae.....	24

Introduction

The idea of possible neoplasia recognition and eradication by the immune system is not new. One of the first documented pieces of evidence concerning the role of immune system activation in tumour therapy was observed by William Bradley Coley in the late nineteenth century. He noticed that patients' tumours occasionally shrank when the tumours became infected (severe septicaemia/erysipelas) [Coley 1910]. However, since that observation until the end of the twentieth century the question whether the immune system is able to eliminate tumour cells remained very controversial. In the 1970s Zinkernagel and Doherty validated the hypothesis that CD8⁺ T cell recognition and destruction of cells is MHC class I-dependent [Zinkernagel and Doherty, 1974 a/b]. This brought more arguments for the supporters of the theory that tumour growth control by the immune system. Although it referred to the viral antigens (Ags), it suggested the mechanism of how tumour Ags (in the context of MHC class I molecules) could be recognized by cytotoxic lymphocytes. Besides that, the discovery of dendritic cells (DC), leukocyte population with unique ability to present both self and non-self Ags, was another finding which contributed to the clarification of the mechanisms of anti-tumour immunity [Steinman and Cohn, 1973]. Later, many tumour-associated or -specific Ags were identified. One of the tumour-specific Ags described were proteins derived from human papillomavirus 16 (HPV 16), the etiological agent of cervical cancer [reviewed by Frazer et al., 2011]. Together with the DC discovery it created the theoretical background for the development of dendritic cell- or peptide-based anti-tumour vaccines. Despite the growing knowledge in the field of tumour immunology, clinically efficient peptide-based therapeutic vaccine has been so far formulated for precarcinogenic lesions [Kenter et al., 2009].

Besides the role in the protection against neoplasia, development of the immune system can also contribute to the acceleration of tumour growth. Certain leukocyte populations such as Treg (regulatory T cells) or NKT cells can regulate immune response and thus contribute to cancer progression/regression. Tumour cells or tumour microenvironment in general can influence immune cells and also inhibit efficient anti-tumour response. One of the major obstacles during the tumour immunotherapy is posed by the loss of the presentation of the cell surface tumour Ag. It is often mediated by the downregulation of MHC class I molecules on tumour cells and represents a common mechanism by which tumour cells can escape anti-tumour immunity [summarized by Reinis 2010]. However, epigenetically silenced

expression of MHC class I molecules can be reversed by epigenetic modifiers such as inhibitors of DNA methyltransferases (DNMT) or histone deacetylases (HDAC) [Khan et al., 2008; Manning et al., 2008; Setiadi et al., 2008; Simova et al., 2011]. This thesis focuses on the potential of the DC-based vaccines against HPV-16-associated tumours with a different MHC class I expression, on the combination of cancer immunotherapy with the treatment using epigenetic modifiers, with special attention paid to their effects on DC, and, finally, on the impacts of the anti-CD25 antibody (used for Treg elimination) on Treg and NKT cells, as well as on tumour progression. The experimental part was performed in the Laboratory of Tumour Immunology (Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague) and the thesis is based on four original articles (see the list of my publications).

Aims

The subject of the thesis is experimental immunotherapy of HPV16 associated MHC class I-deficient or -positive tumours in the murine model and regulation of anti-tumour immune response with special attention paid to the effects of epigenetic agents. The main objectives were following:

- 1) to evaluate the efficacy of DC-based vaccines in a murine model of MHC class I-deficient tumours (TC-1/A9) expressing E6/E7 oncogenes derived from HPV16
- 2) to analyze how epigenetic modifier (5-azacytidine) can influence tumour cell interaction with the immune system and their sensitivity to immunotherapy
- 3) to determine the effect of epigenetic modifiers (5AC, TSA) on DC maturation
- 4) to determine the effect of PC61 antibody on Treg or activated NKT cells, and its implication for immunotherapy of the experimental murine model of HPV16-associated tumours

Material and methods

TC-1 model system of the HPV-associated cancers

Transplantable tumours engineered to express papillomavirus nonstructural proteins can be used as a murine model of HPV16-associated cancers. TC-1 tumour cell line used in our studies was derived from primary lung epithelial cells of C57BL/6 mice cotransformed with HPV-16 E6 and E7 and c-Ha-ras oncogene [Lin et al., 1996]. TC-1 cell line is a useful model for the immunotherapy of HPV16-associated cancers. MHC class I-deficient cell line derived from the parental TC-1 cell line was marked as TC-1/A9 [Smahel et al., 2003]. TC-1/A9 cell line was obtained from the selected TC-1 tumours developed in immunized mice. In the context of MHC class I molecules of C57BL/6 mice, immunodominant epitopes, especially in the E7 protein, are well characterized. This makes these cells an excellent experimental model for testing of vaccines against tumours with distinct MHC class I expression.

Dendritic cell cultivation

Data presented in this dissertation thesis were mainly obtained from the culture of the murine bone marrow precursors cultivated for seven days in the complete medium RPMI-1640 supplemented with GM-CSF and IL-4 as described by Lutz et al. 1999 and with minor modification published by Indrova et al. in 2004, Stepanek et al. 2011. GM-CSF is cytokine commonly used in the majority of the protocols for DC preparations.

Depletion of Treg

Depletion of Treg was performed by the administration of diphtheria toxin to transgenic mice expressing diphtheria toxin receptor under the *FoxP3* promoter (DEREG mice) or by application of anti-CD25 mAb (PC61).

Activation of NKT cell

As the potent exogenous lipid antigen to stimulate murine NKT cells was used alpha galactosyl ceramide (α -GalCer). Activation of NKT cells was determined by expression of the activation marker (CD69) or by production of cytokines (IFN γ , IL-4).

Results and discussion

MHC class I downregulation on tumour cells constitutes an obstacle for immunotherapy. Peptide- or DC-based vaccines provide a promising approach in the tumour immunotherapy, but so far there are only few reports on this topic regarding their efficacy against MHC class I-deficient tumours. In our experiments we utilized TC-1 tumour cell line and its MHC class I-deficient subpopulation TC-1/A9. These cancer cells express non-self HPV16-derived E6 and E7 proteins.

Immunization with a peptide containing only a short CD8⁺ T cell epitope protected mice against the challenge with parental MHC class I-positive tumours but not against less immunogenic MHC class I-deficient TC-1/A9 tumours. It was suggested that short peptides can be exogenously loaded on the MHC class I of cells including nonprofessional Ag presenting cells, immature DC, T or B cells [Bijker et al., 2008; Melief and van Burg 2008], and the lack of the surface costimulatory molecules on these cells required for the appropriate CTL generation can shift immune response to tolerance [Melief 2011, van Hall and van Burg 2012]. Addition of CD4 epitope to minimal peptides containing CD8 epitope was able to increase the efficiency and eradicate even palpable HPV16-associated tumours [Zwaveling et al., 2002]. Peptides harbouring CD4 epitope in addition to CD8 epitope were more efficient in our tumour protection experiments, since they induced a higher numbers of specific CTL which produced a large amount of IFN γ , as compared to the short peptides harbouring just the CTL epitope. It was shown by Bennett et al. in 1997 that induction of cytotoxic lymphocytes by cross-priming requires help of CD4⁺ T cells and that this interaction is effective only when both the helper and CTL epitopes are recognized on the same APC. A longer peptide used in our studies contained an overlapping T helper and cytotoxic T cell epitope and we could not evaluate the necessity for the presentation of both determinants on the same cell.

Tolerance induced by vaccination with short peptides containing CD8⁺ T cell determinants was also overcome by loading these peptides directly onto DC vaccines [Toes et al., 1998]. In our setting, peptide-pulsed DC efficiently presented Ags, provided sufficient costimulatory and cytokine signals for T cell activation [Lutz and Schuler, 2002], induced sufficient CTL response and protected mice against the challenge of TC-1/A9 cells. Thus, the tumour growth acceleration with the vaccination by the short peptide was overcome as described previously. Data from the studies mentioned above are in agreement with our results, and conclusions from the experiments using MHC class I-deficient tumours suggested

the validity of the discussed principles for immunotherapy of MHC class I-deficient tumours as well. Indeed, our experiments revealed that vaccines inducing specific immunity against E7 protein could prevent or inhibit the growth of MHC class I-deficient tumours, although the mechanisms may be different from those that play role in the development of the protective immunity against parental, MHC class I-positive tumours.

Apart from approaches leading to the development of vaccines targeting MHC class I-deficient neoplasia, the induction of MHC class I expression by epigenetic modifiers and combination with established immunotherapy could be an alternative to the former one. Epigenetic agents (HDAC and DNMT inhibitors) are able to reverse DNA hypermethylation or histone hypoacetylation and in this way induce expression of the silenced genes. This could also be the case of molecules involved in the MHC class I antigen processing machinery and thus induce presentation of Ags in the context of MHC. We reported that 5AC was able to induce expression of MHC class I molecules on the TC-1/A9 tumour cells of lung epithelia origin both *in vitro* and *in vivo* [Manning et al., 2008; Simova et al., 2011]. Reexpression of MHC class I molecules by effects of epigenetic modifiers was reported by Serrano et al. and Nie et al. in 2001, who demonstrated demethylation of the genes encoding MHC class I heavy chains and restoration of CTL response. In our model, expression of MHC molecules correlated with the level of promoter demethylation and with the mRNA level of genes of MHC class I APM (*TAP1*, *TAP2*, *LMP2*, *LMP7* and *TAPBP*). Moreover, 5AC increased expression of the components of IFN γ signaling pathway such as STAT-1, IRF-1 and IRF-8, which suggests involvement of IFN γ in MHC class I upregulation and/ or in the immune response mechanism [Pollakova, unpublished].

5AC and 5-aza-2'-deoxycytidine as cytostatic compounds and inhibitors of DNMT have been approved for clinical use in the treatment of myelodysplastic syndrome [Mai and Altucci, 2009; <http://www.fda.gov/>, 2012]. We demonstrated that chemotherapy with 5AC reversed silencing of MHC class I Ag presentation and increased sensitivity of tumours to unspecific immune intervention by administration of CpG ODN 1826 or IL-12-producing cellular vaccine. *In vivo* cell depletion study revealed a major role of NK 1.1⁺ cells in mice during the combined treatment. It was previously shown that the NK 1.1⁺ cell population was able to control the early phases of tumour growth of the parental MHC class I-positive TC-1 cell line [Simova et al., 2004]. Data document the role of the innate immunity against neoplasias regardless of their MHC class I status. CD8⁺ cell dependence of the therapeutic effect was not observed after 5AC administration, but only after combined therapy with CpG ODN 1826, which proved the induction of CD8⁺ cell dependent mechanism in the protective

immune responses. Other immunomodulatory effects of epigenetic modifiers can be mediated by influencing other components of the immune system and could not be monitored by tumour growth inhibition or cell-depletion studies. Thus, we tested possible adverse effects of 5AC treatment in our experimental setting. The total number of spleen cells and IFN γ -producing splenocytes was decreased after chemotherapy with 5AC, but the proliferative capacity and the proportion of spleen cell populations remained unaffected. 5AC also did not alter the percentage of activated T, B and NK cells induced by CpG ODN 1826.

In another set of experiments, we decided to monitor the effects of 5AC and another epigenetic modifier, TSA, on DC function with the focus on their maturation. There is still lack of data on the effect of DNMT inhibitors on DC function. On the other hand, it was reported that HDAC inhibitors such as TSA were able to block the expression of costimulatory molecules and production of IL-12 by murine bone marrow-derived or human monocyte-derived DC and to inhibit DC-driven Th1 responses [Bode et al., 2007; Nencioni et al., 2007; Brogdon et al., 2007]. According to our experiments, treatments by both 5AC and TSA blocked the production of IL-12 by mature DC. Furthermore, incubation of DC with TSA reduced the amount of surface MHC and costimulatory molecules CD40 and CD86 on the mature DC. Concentrations and incubation time of the inhibitors were selected to maximize their biological effects and reduce direct cytotoxicity. No effect of 5AC or TSA on the cell viability was observed by MTT test or trypan blue staining. Despite the low toxicity of the inhibitors, both epigenetic agents blocked DC proliferation. Cell yields of the treated DC reached about 50% of the control samples. Cell cycle arrest in sub-G1 phase by 5AC was described in acute myeloid leukaemia cell lines [Hollenbach et al., 2010] and a similar effect could play a role in our DC cell culture system as indicated by the cell yields of DC and cell viability assays.

Because 5AC has to be incorporated into DNA to be functional as DNMT inhibitor [Christman 2002] and possesses very low stability in solution [IARC 1990], proper timing of the inhibitor application is required. DC are one of the most important sources of IL-12 in the organism, and therefore, in the second step, kinetics of IL-12 production by mature, CpG ODN-treated, DC was analyzed. Interestingly, the effects of TSA on IL-12 production manifested themselves after 24 hour and appeared faster in comparison to 5AC, whose effects were apparent after 48 hour of cocultivation. This was probably caused by the necessity of 5AC to be incorporated into DNA for the proper inhibitory function [Christman 2002], which can happen only once per cell division. Epigenetic modifiers decreased expression of mRNA corresponding to the larger subunit of IL-12 (IL-12p40) in mature DC. The level of IL-12p40

correlated with the level of secreted IL-12 and it seems that the expression of the inducible IL-12p40 subunit was a limiting factor for the IL-12 production in our setting. In contrast to IL-12p40, the level of smaller subunit IL-12p35 was not affected by the presence of epigenetic modifiers. Production/expression of other important cytokines such as IL-6, IL-10, IL-23p19, IFN γ and TNF α by DC was also decreased and regulated in a similar manner as IL-12 which suggests shared regulatory mechanism. Experiments from the cytokine studies were performed on LPS- and CpG ODN 1826-matured DC derived from either murine bone marrow or human monocytes. This fact corroborates the conclusion that the results are neither species nor maturation stimuli specific.

Despite inhibitory effect of 5AC on cytokine production, 5AC-treated DC cocultivated with specific T cell did not change the ability to induce T cell response or polarize T helper cells. Furthermore, TSA additionally blocked expression of MHC class II and costimulatory molecules (CD86 and CD40) on the surface of mature DC. This DC phenotype was associated with decreased ability to stimulate naive specific CD4 or CD8 T cells and their production of IFN γ . Splenocytes cocultivated with TSA treated mature DC downregulated expression of ROR γ t and increased expression of FoxP3. This is in line with data that pharmacologically modulated or immature DC can induce Treg or tolerogenic signals in their environment [Cobbold et al., 2010].

In another experimental part, we focused on depletion of Treg by anti-CD25 mAb and its possible additive effect on tumour immunotherapy targeting NKT cells by application of their activation ligand α -GalCer. This assumption was supported by data from two recent studies. Petersen et al. in 2010 showed potentiation of anti-B16 tumour response to immunization with DC loaded with α -GalCer. Additionally, direct administration of α -GalCer combined with anti-CD25 (PC61) increased the therapeutic effects of α -GalCer in a BALB/c metastatic mammary model (4T1) [Hong et al., 2010]. However, in our system, a synergistic/additive effect of the combination treatments with the anti-CD25 antibody (PC61) and α -GalCer was not observed. The possible explanation of the discrepancies of our data with the published literature could be the difference in the experimental setting, mouse strains or cancer cell lines. We tried to determine in more detail if anti-CD25 antibody (PC61) interferes with the NKT cell stimulation. We used DEREK mice expressing diphtheria toxin receptor under the *FoxP3* promoter. This system allows specific Treg depletion [Lahl et al., 2007]. By comparison of results obtained in DEREK mice to the results from the PC61 antibody-treated wild type mice we could distinguish the specific effects of Treg depletion from further effects of PC61 mAb. CD25 is possible to detect on the surface of activated mouse and human NKT

cells [Bessoles et al., 2008; Kim et al., 2006] and CD25 is antigen recognized by PC61 mAb. However, in comparison to human NKT, the expression of CD25 was observed only on a small fraction of NKT cells and this CD25 positive population was induced by α -GalCer. Activation of NKT cells was analyzed 72 hours after stimulation by downregulation of activation marker CD69 [Ikarashi et al., 2006]. PC61 mAb abrogated activation of NKT cells, and inhibited their proliferation and IFN γ production by activated NKT cells. These data clearly demonstrate that anti-CD25 mAb treatment targeting Treg can be controversial and its efficacy is dependent on the particular treatment setting.

Taken together, our results support the data that peptide vaccines effective against MHC class-I positive tumours might not be efficient against tumours with defects in MHC class I presentation and further improvements of protocols as addition of T helper epitopes or using peptide-pulsed DC are desirable for the induction of the efficient immune response against MHC class I-deficient tumours. We have concluded that the potential 5AC adverse effects on the immune system, especially on DC, were not an obstacle for an effective combination treatment with immunotherapy against MHC class I-positive or -deficient tumours. Besides that, our data indicate that epigenetic changes (induced e.g. by 5AC or TSA) play a role in many immunological important events including DC maturation, and therefore it is important to know the consequences of chemotherapy on the function of DC. Additionally, understanding of mechanisms behind DC maturation is beneficial for the possible clinical application. Since chemo- or immunotherapy can induce negative regulators of the immune responses (Treg), the therapeutic efficacy could be increased by combining the treatment with anti-immunosuppressive treatments such as depletion of Treg. Although using mAb targeting CD25 can deplete Treg, direct effects on effector cell populations (NKT cells) have been observed. Therefore, other possibilities for Treg modulation, e.g. application of low doses of cyclophosphamide [Motoyoshi et al., 2006] or 1-methyl-tryptophan [Feunou et al., 2007; Chen et al., 2008] should be considered.

Conclusion

Results obtained from the projects involved in this dissertation are important for optimization of vaccination and immunotherapeutic strategies that take into account the MHC class I status of neoplasia. We documented that the treatment of MHC class I-deficient tumour by epigenetic modifiers sensitized neoplasia to the immunotherapy. Our data provide evidence that besides the known targets of epigenetic agents or immunoregulatory antibodies other unspecific or indirect activities should be considered during the therapy. Our findings suggest that:

- the efficiency of peptide vaccines against MHC class I-deficient tumours can be increased by harbouring CD4 epitopes or by longer peptides requiring DC processing
- the treatment of MHC class I-deficient tumours with epigenetic agents sensitized neoplasia towards the immunotherapy by CpG ODN or IL-12 producing cellular vaccine, immunotherapeutic effect was at least partially mediated by CD8⁺ cells
- treatment with epigenetic agents interfered with DC maturation mainly by inhibition of cytokine production (IL-6, IL-10, IL-12, IL-23, IFN γ); TSA but not 5AC significantly reduced the expression of costimulatory molecules (CD40, CD86) and the capacity of mature DC to stimulate proliferation of the CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes
- application of anti-CD25 mAb (PC61) used for depletion of Treg impaired NKT cell activation

Úvod

Jeden z prvních důkazů o roli imunitního systému při nádorové terapii byl zaznamenán doktorem William Bradley Coleym na konci devatenáctého století. Coley pozoroval zmenšení nádorů u některých pacientů s infekcí nádorů (erysipel) [Coley 1910]. Od tohoto pozorování do konce dvacátého století byla otázka efektivity imunitního systému při eliminaci nádorových buněk velmi kontroverzní. Zinkernagel a Doherty formulovali hypotézu o rozpoznávání antigenů CD8⁺ T buňkami závislého na MHC molekulách I. třídy (MHC I) [Zinkernagel a Doherty, 1974 a/b]. To přineslo více argumentů pro podporu teorie o kontrole růstu nádorů imunitním systémem. Ačkoliv se tato hypotéza původně vztahovala na prezentaci virových antigenů, navrhovala mechanismus, jak by mohly být nádorové antigeny rozpoznávány cytotoxickými T lymfocyty. Mimo to, objev dendritických buněk (DC), vzácné populace bílých krvinek s unikátní vlastností prezentovat antigeny Ralfem Steinmanem byl dalším z důležitých objevů objasňující mechanismus protinádorové imunity [Steinman a Cohn, 1973]. Proteiny odvozené z lidského HPV16, etiologického původce nádorů karcinomu děložního hrdla, byly jedním z popsáných specifických nádorových antigenů [shrnutí Frazer et al., 2011]. Společně s objevem DC tak byly vytvořeny teoretické předpoklady pro vývoj protinádorových vakcín na bázi DC nebo peptidů.

Imunitní systém nejen chrání proti rozvoji nádorových onemocnění, ale může přispět také k jeho urychlení. Určité populace leukocytů jako Treg (T regulační buňky) a NKT buňky mohou regulovat imunitní odpověď a tak mohou přispět k progresi nádorů. Nádorové buňky a jejich mikroprostředí také mohou potlačovat imunitní reakce a tím také inhibovat protinádorovou odpověď. Jednu z hlavních překážek pro protinádorovou imunoterapii představuje ztráta prezentace nádorového antigenu. Je často zprostředkována snížením počtu MHC I na povrchu nádorových buněk a představuje běžný mechanismus, kterým nádorové buňky unikají protinádorové imunitě [shrnutí Reinis 2010]. Epigeneticky tlumená exprese MHC molekul může být obnovena účinkem epigenetických modifikátorů jako jsou inhibitory DNA metyltransferáz (DNMT) nebo histonových deacetyláz (HDAC) [Khan et al., 2008; Manning et al., 2008; Setiadi et al., 2008; Simova et al., 2011].

Tato práce se zaměřuje především na potenciální vakcíny založené na bázi DC proti nádorům asociovaných s HPV 16 odlišných v expresi MHC I, kombinaci imunoterapie s aplikací epigenetických modifikátorů se zaměřením se na DC, na dopad použití protilátky

proti CD25 (využívané k depleci Treg) na Treg, NKT buňky a na růst nádorů. Tato disertační práce byla vypracována v Laboratoři nádorové imunologie (Ústav molekulární genetiky AV ČR, v. v. i., Praha).

Cíle práce

Předmětem této disertační práce je experimentální imunoterapie nádorů asociovaných s HPV 16 s odlišnou expresí MHC I na myším modelu a studium imunoregulace protinádorové imunitní odpovědi s důrazem na efekty epigenetických modifikátorů. Hlavním zaměřením práce jsou následující témata:

- 1) posoudit účinnost vakcín na bázi dendritických buněk na myším modelu MHC I deficientních nádorů (TC-1/A9) exprimujících onkogeny E6/E7 odvozené z HPV16
- 2) vyhodnotit, jak epigenetický modifikátor (5-azacytidin) může ovlivnit interakci nádorových buněk s imunitním systémem a jejich citlivost k imunoterapii
- 3) určit, jak působí epigenetické modifikátory (5AC, TSA) na maturaci dendritických buněk
- 4) určit efekt protilátky PC61 (anti-CD25 mAb) na Treg nebo aktivované NKT buňky a jeho důsledek pro imunoterapii experimentálního myšího modelu nádorů asociovaných s HPV16

Materiál a metodika

TC-1, modelový systém nádorů asociovaných s HPV16

Transplantovatelné nádory exprimující nestrukturální proteiny papilomavirů mohou být použity jako myší model nádorů asociovaných s HPV16. Nádorová linie TC-1 použitá v našich studiích byla odvozena z primárních plicních epitelálních buněk C57BL/6 myší transfektovaných proteiny E6 a E7 odvozených z HPV-16 a c-Ha-ras onkogenem [Lin et al., 1996]. Myší nádorová linie TC-1 je používaný model pro imunoterapii nádorů asociovaných s HPV-16. Nádorová linie deficientní v MHC I odvozená od parentální linie TC-1 a označená jako TC-1/A9 [Smahel et al., 2003] byla získána z vybraných TC-1 nádorů z imunizovaných myší. V kontextu molekul MHC I u C57BL/6 myší, imunodominantní epitopy zejména v proteinu E7 byly dobře charakterizovány. To určuje tyto buňky jako excelentní experimentální model pro testování vakcín proti nádorům s různou expresí MHC I.

Kultivace dendritických buněk

Data prezentována v této disertační práci byla převážně získána na kulturách DC získaných kultivací prekurzorů kostní dřeně po sedm dní v kompletním mediu obsahující GM-CSF a IL-4 jak popsal Lutz et al. v roce 1999 a s menšími úpravami [Indrova et al., 2004; Stepanek et al., 2011]. GM-CSF je standardně využíván ve většině protokolů pro *ex vivo* kultivaci DC.

Deplece regulačních T lymfocytů

Deplece Treg byla vyvolána aplikací difteria toxinu transgenním myším exprimujícím receptor pro difteria toxin pod *FoxP3* promotorem (DEREG myši) nebo aplikací anti-CD25 mAb (PC61).

Aktivace NKT buněk

Pro specifickou stimulaci NKT buněk byl použit α -GalCer jako účinný exogenní lipidický antigen. Aktivace NKT buněk byla stanovena na základě exprese aktivačního povrchového znaku (CD69) nebo produkcí cytokinů (IFN γ , IL-4).

Výsledky a diskuze

Snížení exprese MHC I na povrchu nádorových buněk představuje překážku pro efektivní imunoterapii. Peptidové vakcíny nebo vakcíny na bázi DC představují slibný přístup v oblasti nádorové imunoterapie, ale dosud bylo publikováno jen několik prací na toto téma beroucí v úvahu expresi MHC I. Pro naše experimenty byla využita nádorová linie TC-1 a její subpopulace TC-1/A9, deficientní v expresi molekul MHC I. Tyto nádorové buňky exprimují E6 a E7 proteiny HPV16. Vakcinace krátkými peptidy obsahující pouze CD8 epitop chránila myši proti růstu původních MHC I-pozitivních nádorů TC-1, ale nebyla účinná proti méně imunogenním MHC I-deficientním nádorům. Bylo navrhováno, že krátké peptidy mohou být exogenně prezentovány v kontextu MHC molekul včetně neprofesionálních antigen prezentujících buněk, nezralých denritických buněk, T a B buněk [Bijker et al., 2008; Melief a van Burg 2008]. Nedostatečné množství kostimulačních molekul na výše uvedených buňkách může posunout imunitní odpověď k toleranci [Melief a van Burg 2008, van Hall a van Burg 2012]. Přidání CD4 epitopu k minimálnímu peptidu obsahující samotný CD8 epitop je schopné zvýšit účinnost a zabránit růstu dokonce i hmatných nádorů asociovaných s HPV16 [Zwaveling et al., 2002]. Peptidy obsahující cytotoxický epitop i CD4 epitop byly více účinné v našich imunizačních experimentech při inhibici růstu nádorů a při indukci specifických T buněk produkujících IFN γ . Bennet et al. v roce 1997 prokázal, že indukce cytotoxických lymfocytů pomocí “cross-primingu” vyžaduje pomoc CD4⁺ T buněk a že tato interakce je efektivní pouze tehdy, když jak cytotoxický i CD8 epitop je rozpoznán na stejné antigen prezentující buňce. Delší peptid využitý v naší studii obsahoval překrývající se CD4 a CD8 T buněčný epitop a z tohoto důvodu nebylo možné hodnotit prezentaci obou epitopů na stejné buňce. Tolerance vyvolaná vakcinací krátkými peptidy obsahujícími pouze CD8 T buněčný determinant může být překonána přímou pulsací DC těmito peptidy [Toes et al., 1998]. V našem uspořádání, DC pulsované peptidy účinně prezentovaly antigeny, poskytl dostatečné kostimulační a cytokinové signály pro aktivaci T buněk [Lutz a Schuler, 2002], indukovaly dostatečnou cytotoxickou T odpověď a chránily myši proti růstu nádorů TC-1/A9. Tímto způsobem bylo urychlení růstu nádorů způsobené vakcinací krátkým peptidem překonáno. Data z výše uvedených studií jsou v souladu s našimi výsledky z MHC I-deficientního nádorového modelu a dokazují platnost výše uvedených principů také pro imunoterapii nádorů deficientních v MHC I. Naše experimenty ukázaly, že vakcíny schopné vyvolat specifickou imunitu proti E7 proteinu mohou zabránit nebo inhibovat růst nádorů

deficientních v MHC I, ačkoliv mechanismus může být odlišný od mechanismu důležitého pro indukci protektivní imunity proti parentálním nádorům pozitivních na MHC I.

Epigenetická agens (inhibitory HDAC a DNMT) jsou schopné zvrátit hypermetylaci DNA nebo hypoacetylaci histonů a tímto způsobem indukovat expresi tlumených genů, což bylo popsáno u mnoha typů neoplasií. Tento způsob tlumení genové exprese by mohl být významný i při regulaci prezentace antigenů v kontextu MHC I. V roce 2011 jsme publikovali data, ukazující indukci exprese MHC I na nádorech TC-1/A9 jak *in vitro* tak *in vivo* účinkem 5AC [Simova et al., 2011]. Tyto výsledky ověřily možné obnovení exprese MHC I účinkem epigenetických agens, které uveřejnil v roce 2001 Serrano et al. a Nie et al. Exprese MHC I korelovala s úrovní demethylace promotorů a s expresí genů antigen prezentující mašinerie (*TAP1*, *TAP2*, *LMP2*, *LMP7* a *TAPBP*). 5-azacytidin (5AC) také zvýšil expresi komponent signalizační dráhy IFN γ jako STAT -1, IRF-1, a IRF-8 což naznačuje účast IFN γ na regulaci exprese MHC I a potažmo na mechanismu imunitní odpovědi [Pollakova et al., nepublikováno]. 5AC a 5-aza-2'-deoxycytidin byly jako inhibitory DNMT schváleny pro léčbu některých myelodisplastických syndromů [Mai a Altucci, 2009]. V naší práci jsme ukázali, že chemoterapie 5AC obnovila expresi antigen prezentující mašinerie MHC I a zvýšila citlivost nádorů k imunoterapii CpG ODN nebo buněčnou vakcínou produkující IL-12. *In vivo* depleční experimenty prokázaly roli NK 1.1⁺ buněk během kombinované terapie. V předcházejících studiích byla prokázáno, že NK 1.1⁺ buňky jsou schopné kontrolovat růst parentálních MHC I-pozitivních nádorů TC-1 [Simova et al., 2004]. Data dokumentují roli přirozené imunity, která není závislá na statusu MHC I neoplasií. Závislost terapeutického efektu 5AC na CD8⁺ buňkách nebyla pozorována, avšak aditivní efekt kombinované terapie 5AC s CpG ODN 1826 byl narušen deplecí CD8⁺ buněk, což dokazuje indukci mechanismů závislých na CD8⁺ buňkách v protektivní imunitní odpovědi.

Imunomodulační účinky epigenetických modifikátorů mohou být způsobené ovlivněním i ostatních složek imunitního systému a které nemohou být monitorovány inhibicí růstu nádorů nebo deplečními studii. Proto jsme testovali efekty 5AC na vybrané populace imunocytů v našem experimentálním uspořádání. Celkový počet slezinných buněk i γ IFN produkujících splenocytů byl snížen po chemoterapii 5AC, ale proliferační kapacita a poměr buněčných populací zůstal shodný. 5AC také nezměnil množství aktivovaných T, B a NK buněk indukovaných CpG ODN 1826.

V navazující experimentální části jsme se rozhodli sledovat efekt 5AC a dalšího epigenetického modifikátoru (Trichostatinu A, TSA) na funkci DC se zaměřením na jejich maturaci. Efekt inhibitorů DNMT na funkci DC není dosud objasněn, ale bylo popsáno, že

inhibitory HDAC byly schopné blokovat expresi kostimulačních molekul, produkci IL-12 myšími nebo lidskými DC nebo blokovat Th1 odpověď indukovanou DC [Bode et al., 2007; Nencioni et al., 2007; Brogdon et al., 2007]. Uvedená data jsou v souladu s našimi výsledky, 5AC i TSA v našich experimentech také blokoval produkci IL-12 zralými DC. Navíc, inkubace DC s TSA snížila množství povrchových MHC a kostimulačních molekul (CD40, CD80 a CD86). Koncentrace a doba kultivace s inhibitory byla vybrána tak, aby maximalizovala biologický účinek a snížila přímou toxicitu inhibitorů. Žádný účinek na životaschopnost DC nebyl pozorován MTT testem nebo barvením trypanovou modří. Epigenetická agens blokovala proliferaci a výtěžek DC, který dosahoval pouze 50% hodnot kontrolního vzorku. Bylo popsáno, že 5AC indukuje apoptózu a zastavení buněčného cyklu ve fázi sub-G1 v buňkách akutní myeloidní leukémie [Hollenbach et al., 2010] a efekt na DC by mohl být podobný, když vezmeme v úvahu výtěžky DC a výsledky testů životaschopnosti.

Protože 5AC musí být inkorporován do DNA pro inhibici DNMT [Christman 2002] a je velmi labilní v roztoku [IARC 1990], správné časování experimentu je důležité. DC jsou jedním z nejdůležitějších zdrojů IL-12 v organismu a proto jsme v dalším kroku přistoupili ke kinetickým experimentům produkce IL-12 zralými DC. Bylo zajímavé, že účinek TSA na produkci IL-12 se projevil po 24h a byl rychlejší v porovnání s 5AC, jehož efekt byl patrný po 48h. Pomalejší kinetika účinku 5AC by mohla být vysvětlena nutností jeho inkorporace do DNA pro inhibici DNMT [Christman 2002], což se může stát pouze jednou za buněčný cyklus. U zralých DC ošetřených epigenetickými modifikátory poklesla exprese větší podjednotky IL-12 (IL-12p40). Exprese IL-12p40 korelovala s extracelulární produkcí IL-12 a exprese inducibilní IL-12p40 se zdála být limitujícím faktorem pro produkci IL-12 v našem uspořádání. Na rozdíl od IL-12p40 hladina exprese IL-12p35 nebyla ovlivněna přítomností epigenetických modifikátorů. Produkce/ exprese dalších důležitých cytokinů DC jako IL-6, IL-10, IL-23p19, IFN γ a TNF α byla také snížena a regulována podobným způsobem jako IL-12, což by mohlo být zajištěno sdíleným regulačním mechanismem. Experimenty byly provedené na myších DC odvozených z prekurzorů kostní dřeně nebo lidských DC diferencovaných z monocytů. Pro maturaci DC byl použit CpG ODN 1826 nebo LPS. Výsledky z lidského i myšího systému stimulovaného různými ligandy ukazují, že získaná data nebyla specifická pro určitý živočišný druh ani pro jeden typ maturačního stimulu.

Přestože 5AC inhiboval produkci cytokinů, DC ošetřené 5AC nevykazovaly žádné změny ve schopnosti stimulovat specifické T lymfocyty ani polarizovat Th buněčnou odpověď. TSA navíc blokoval i expresi MHC a kostimulačních molekul (CD86 a CD40) na povrchu maturovaných DC. Tento fenotyp byl asociovaný se sníženou schopností stimulovat

specifické CD4⁺ i CD8⁺ T buňky. Maturované DC ošetřené TSA a kokultivované se splenocyty snížily expresi ROR γ t (transkripčního faktoru typického pro Th17 buňky) a zvýšily expresi FoxP3 (transkripčního faktoru typického pro Treg) v těchto kulturách, což naznačuje tolerogenní vlastnosti těchto DC a možnou indukci Treg. To odpovídá výsledkům, které ukazují, že farmakologicky modulované nebo nezralé DC mohou indukovat Treg nebo tolerogenní signály v jejich okolí [Cobbold et al., 2010].

Treg mají kritickou roli při zajištění imunologické tolerance. V průběhu protinádorové imunoterapie ale jejich přítomnost může být kontraproduktivní. Proto jsme se v dalších experimentech zaměřili na depleci Treg pomocí protilátky proti CD25 (PC61) a její možný aditivní efekt na imunoterapii aktivující NKT buňky aplikací α -GalCer. Tento předpoklad byl podporován závěry dvou studií. Peterson et al. ukázal potenciaci B16 protinádorové odpovědi při imunizaci DC pulsovanými α -GalCer. Mimoto, přímé podání α -GalCer kombinovaného s protilátkou proti CD25 (PC61) zvýšilo terapeutický efekt α -GalCer v metastatickém modelu 4T1 u BALB/c myši. V našem uspořádání jsme však nepozorovali žádný aditivní/ synergistický efekt kombinované terapie α -GalCer s PC61. Jako možné vysvětlení nesrovnalostí výsledků od dvou zmíněných studií by mohl být rozdíl v experimentálním uspořádání, myších kmenů nebo nádorových linií. Zaměřili jsme se na objasnění, zda protilátka proti CD25 (PC61) interferuje se stimulací NKT buněk. Použili jsme DEREK kmen transgenních myši, které exprimují receptor pro difteria toxin pod *FoxP3* promotorem a po aplikaci difteria toxinu je tak možné specificky depletovat Treg [Lahl et al., 2007]. Porovnáním výsledků získaných v DEREK modelu s výsledky získaných pomocí PC61 protilátky jsme byly schopni rozlišit efekt specifické deplece Treg na aktivaci NKT buněk od dalších efektů PC61 protilátky. CD25 je možné detekovat na povrchu aktivovaných myších i lidských NKT buňkách [Bessoles et al., 2008; Kim et al., 2006] a u myši představuje antigen rozpoznávaný protilátkou PC61. PC61 protilátka se vážala pouze na malou subpopulaci NKT buněk, která po stimulaci α -GalCer expandovala. Aktivace NKT buněk bylo analyzována 72h po aktivaci podle snížení exprese aktivačního znaku CD69 [Ikarashi et al., 2006]. Protilátka PC61 narušila aktivaci NKT buněk, inhibovala proliferaci a produkci IFN γ aktivovanými NKT buňkami. Tato data naznačují, že použití protilátky proti CD25 při depleci Treg může být kontroverzní a její účinnost je závislá na konkrétním léčebném postupu.

Naše výsledky ukazují, že peptidové vakcíny účinné proti MHC I-pozitivním nádorům nemusí být účinné proti nádorům s defekty v prezentaci antigenů na MHC I a další modifikace vakcín jako přidání CD4 epitopů je žádoucí. Můžeme shrnout, že potencialní nespecifické účinky 5AC na imunitní systém zejména na DC není překážkou pro efektivní

kombinovanou léčbu spolu s imunoterapií proti MHC I-pozitivním i deficientním nádorům. Mimoto, naše data indikují, že epigenetické změny hrají roli v mnoha imunologicky významných událostech jako je maturace DC a proto je důležité znát účinek chemoterapie i na funkci důležitých populací leukocytů jako jsou právě DC. Protože chemo- nebo imunoterapie může indukovat negativní regulátory imunitní odpovědi jako jsou Treg, terapeutická účinnost by mohla být zvýšena kombinací léčebné intervence s anti-imunosupresivní léčbou jako je deplece Treg. Použitím protilátky proti CD25 (PC61) mohou být depletovány Treg, ačkoliv nepřímý efekt jako narušení aktivace NKT buněk byl pozorován a další možnosti pro ovlivnění imunoregulační populace Treg jako aplikace nízkých dávek cyklofosfamidu [Motoyoshi et al., 2006] nebo 1-methyl-tryptofanu [Feunou et al., 2007; Chen et al., 2008] by měly být zváženy.

Závěr

Výsledky získané z projektů zahrnutých v této disertační práci jsou důležité pro optimalizaci vakcinačních a kombinovaných chemo-imunoterapeutických strategií beroucích v úvahu status MHC I na neoplasiích. Dokumentujeme, že epigenetické modifikátory mohou obnovit expresi MHC I a tak mohou zviditelnit nádory pro imunitní systém. Naše data poskytují důkaz, že mimo známé cíle epigenetických agents nebo imunoregulačních protilátek, další nespécifické nebo nepřímé aktivity by měli být zváženy během terapie. Z výsledků vyplývá, že:

- účinnost peptidových vakcín proti MHC I-deficientním nádorům může být zvýšena přidáním CD4 epitopu nebo imunizací dedritickými buňkami pulsovanými peptidy
- aplikace epigenetických agents sensitizovala MHC I-deficientní nádory k imunoterapii CpG ODN nebo IL-12 produkující buněčnou vakcínou, imunoterapeutický efekt byl alespoň částečně zprostředkován CD8⁺ buňkami
- aplikace epigenetických agents ovlivnila maturaci DC, hlavně byla snížena produkce cytokinů (IL-6, IL-10, IL-12, IL-23, IFN γ); TSA ale ne 5AC signifikantně snížil expresi kostimulačních molekul (CD40, CD86) a kapacitu maturovaných DC stimulovat proliferaci CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocytů.
- podání protilátky proti CD25 (PC61) používané pro depleci Treg narušilo aktivaci NKT buněk

References

- Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Miller JF, Heath WR. Induction of a CD8+ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4+ T cell help. *J Exp Med*. 1997;186(1):65-70.
- Bessoles S, Fouret F, Dudal S, Besra GS, Sanchez F, Lafont V. IL-2 triggers specific signaling pathways in human NKT cells leading to the production of pro- and anti-inflammatory cytokines. *J Leukoc Biol*. 2008;84(1):224-33.
- Bijker MS, van den Eeden SJ, Franken KL, Melief CJ, van der Burg SH, Offringa R. Superior induction of anti-tumor CTL immunity by extended peptide vaccines involves prolonged, DC-focused antigen presentation. *Eur J Immunol*. 2008;38(4):1033-42.
- Bode KA, Schroder K, Hume DA, Ravasi T, Heeg K, Sweet MJ, Dalpke AH. Histone deacetylase inhibitors decrease Toll-like receptor-mediated activation of proinflammatory gene expression by impairing transcription factor recruitment. *Immunology*. 2007;122(4):596-606.
- Brogdon JL, Xu Y, Szabo SJ, An S, Buxton F, Cohen D, Huang Q. Histone deacetylase activities are required for innate immune cell control of Th1 but not Th2 effector cell function. *Blood*. 2007;109(3):1123-30.
- Chen W, Liang X, Peterson AJ, Munn DH, Blazar BR. The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation. *J Immunol*. 2008;181(8):5396-404.
- Christman JK. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene*. 2002;21(35):5483-95.
- Cobbold SP, Adams E, Nolan KF, Regateiro FS, Waldmann H. Connecting the mechanisms of T-cell regulation: dendritic cells as the missing link. *Immunol Rev*. 2010;236:203-18.
- Coley WB. The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the Mixed Toxins of the *Streptococcus erysipelas* and the *Bacillus prodigiosus*). *Proc R Soc Med*. 1910;3(Surg Sect):1-48.
- Hollenbach PW, Nguyen AN, Brady H, Williams M, Ning Y, Richard N, Krushel L, Aukerman SL, Heise C, MacBeth KJ. A comparison of azacitidine and decitabine activities in acute myeloid leukemia cell lines. *PLoS One*. 2010;5(2):e9001.
- Feunou P, Vanwetswinkel S, Gaudray F, Goldman M, Matthys P, Braun MY. Foxp3+CD25+ T regulatory cells stimulate IFN-gamma-independent CD152-mediated activation of tryptophan catabolism that provides dendritic cells with immune regulatory activity in mice unresponsive to staphylococcal enterotoxin B. *J Immunol*. 2007;179(2):910-7.

IARC. Azacitidine. In *Pharmaceutical Drugs. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*, vol. 50. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. IARC. 1990;50: 47-63.

Ikarashi Y, Iizuka A, Koshidaka Y, Heike Y, Takaue Y, Yoshida M, Kronenberg M, Wakasugi H. Phenotypical and functional alterations during the expansion phase of invariant Valpha14 natural killer T (Valpha14i NKT) cells in mice primed with alpha-galactosylceramide. *Immunology*. 2005;116(1):30-7.

Indrová M, Reinis M, Bubeník J, Jandlová T, Bieblová J, Vonka V, Velek J. Immunogenicity of dendritic cell-based HPV16 E6/E7 peptide vaccines: CTL activation and protective effects. *Folia Biol (Praha)*. 2004;50(6):184-93.

Khan AN, Gregorie CJ, Tomasi TB. Histone deacetylase inhibitors induce TAP, LMP, Tapasin genes and MHC class I antigen presentation by melanoma cells. *Cancer Immunol Immunother*. 2008;57(5):647-54.

Kim HY, Kim S, Chung DH. FcγRIII engagement provides activating signals to NKT cells in antibody-induced joint inflammation. *J Clin Invest*. 2006;116(9):2484-92.

Lahl K, Loddenkemper C, Drouin C, Freyer J, Arnason J, Eberl G, Hamann A, Wagner H, Huehn J, Sparwasser T. Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease. *J Exp Med*. 2007;204(1):57-63.

Lin KY, Guarnieri FG, Staveley-O'Carroll KF, Levitsky HI, August JT, Pardoll DM, Wu TC. Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Cancer Res*. 1996;56(1):21-6.

Lutz MB and Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol*. 2002;23(9):445-9.

Mai A and Altucci L. Epi-drugs to fight cancer: from chemistry to cancer treatment, the road ahead. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009;41(1):199-213.

Manning J, Indrova M, Lubyova B, Pribylova H, Bieblova J, Hejnar J, Simova J, Jandlova T, Bubenik J, Reinis M. Induction of MHC class I molecule cell surface expression and epigenetic activation of antigen-processing machinery components in a murine model for human papilloma virus 16-associated tumours. *Immunology*. 2008;123(2):218-27.

Melief CJ, van der Burg SH. Immunotherapy of established (pre)malignant disease by synthetic long peptide vaccines. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(5):351-60.

Motoyoshi Y, Kaminoda K, Saitoh O, Hamasaki K, Nakao K, Ishii N, Nagayama Y, Eguchi K. Different mechanisms for anti-tumor effects of low- and high-dose cyclophosphamide. *Oncol Rep*. 2006;16(1):141-6.

Nencioni A, Beck J, Werth D, Grünebach F, Patrone F, Ballestrero A, Brossart P. Histone deacetylase inhibitors affect dendritic cell differentiation and immunogenicity. *Clin Cancer Res*. 2007;13(13):3933-41.

Nie Y, Yang G, Song Y, Zhao X, So C, Liao J, Wang LD, Yang CS. DNA hypermethylation is a mechanism for loss of expression of the HLA class I genes in human esophageal squamous cell carcinomas. *Carcinogenesis*. 2001;22(10):1615-23.

Petersen TR, Sika-Paotonu D, Knight DA, Dickgreber N, Farrand KJ, Ronchese F, Hermans IF. Potent anti-tumor responses to immunization with dendritic cells loaded with tumor tissue and an NKT cell ligand. *Immunol Cell Biol*. 2010;88(5):596-604.

Serrano A, Tanzarella S, Lionello I, Mendez R, Traversari C, Ruiz-Cabello F, Garrido F. Rexpression of HLA class I antigens and restoration of antigen-specific CTL response in melanoma cells following 5-aza-2'-deoxycytidine treatment. *Int J Cancer*. 2001;94(2):243-51.

Setiadi AF, Omilusik K, David MD, Seipp RP, Hartikainen J, Gopaul R, Choi KB, Jefferies WA. Epigenetic enhancement of antigen processing and presentation promotes immune recognition of tumors. *Cancer Res*. 2008;68(23):9601-7.

Símová J, Bubeník J, Bieblová J, Jandlová T. The role of NK1.1+ cells in the protection against MHC class I+ HPV16-associated tumours. *Folia Biol (Praha)*. 2004;50(6):200-2.

Símová J, Polláková V, Indrová M, Mikyšková R, Bieblová J, Stěpánek I, Bubeník J, Reiniš M. Immunotherapy augments the effect of 5-azacytidine on HPV16-associated tumours with different MHC class I-expression status. *Br J Cancer*. 2011;105(10):1533-41.

Smahel M, Síma P, Ludvíková V, Marinov I, Pokorná D, Vonka V. Immunisation with modified HPV16 E7 genes against mouse oncogenic TC-1 cell sublines with downregulated expression of MHC class I molecules. *Vaccine*. 2003;21(11-12):1125-36.

Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*. 1973;137(5):1142-62.

Stepánek I, Indrova M, Bieblova J, Fucikova J, Spisek R, Bubenik J, Reinis M. Effects of 5-azacytidine and trichostatin A on dendritic cell maturation. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2011;25(4):517-29.

Toes RE, van der Voort EI, Schoenberger SP, Drijfhout JW, van Bloois L, Storm G, Kast WM, Offringa R, Melief CJ. Enhancement of tumor outgrowth through CTL tolerization after peptide vaccination is avoided by peptide presentation on dendritic cells. *J Immunol*. 1998;160(9):4449-56.

Zinkernagel RM, Doherty PC. Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. *Nature*. 1974;251(5475):547-8. a

Zinkernagel RM, Doherty PC. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature*. 1974;248(450):701-2. b

Zwaveling S, Ferreira Mota SC, Nouta J, Johnson M, Lipford GB, Offringa R, van der Burg SH, Melief CJ. Established human papillomavirus type 16-expressing tumors are effectively eradicated following vaccination with long peptides. *J Immunol*. 2002;169(1):350-8.

Project-related list of own publications

Rosalia RA, Stěpánek I, Polláková V, Símová J, Bieblová J, Indrová M, Moravcová S, Příbylová H, Bontkes HJ, Bubeník J, Sparwasser T, Reiniš M. Administration of anti-CD25 mAb leads to impaired α -galactosylceramide-mediated induction of IFN- γ production in a murine model. *Immunobiology*. 2013;218(6):851-9. (IF₂₀₁₁= 3.205)

Stepanek I, Indrova M, Bieblova J, Fucikova J, Spisek R, Bubenik J, Reinis M. Effects of 5-azacytidine and trichostatin A on dendritic cell maturation. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2011;25(4):517-29. (IF₂₀₁₁= 5.183)

Símová J, Polláková V, Indrová M, Mikyšková R, Bieblová J, Stěpánek I, Bubeník J, Reiniš M. Immunotherapy augments the effect of 5-azacytidine on HPV16-associated tumours with different MHC class I-expression status. *Br J Cancer*. 2011;105(10):1533-41. (IF₂₀₁₁= 5.042)

Reinis M, Stepanek I, Simova J, Bieblova J, Pribylova H, Indrova M, Bubenik J. Induction of protective immunity against MHC class I-deficient, HPV16-associated tumours with peptide and dendritic cell-based vaccines. *Int J Oncol*. 2010;36(3):545-51. (IF₂₀₁₁= 2.399)

Curriculum Vitae

Name: Ivan Štěpánek
Date of birth: 18. 6. 1982

Affiliation: Department of Tumor Immunology
Institute of Molecular Genetics of the ASCR, v. v. i.
Václavská 1083
142 20 Prague 4
Czech Republic

Telephone number: +420241063313
E-mail: stepanei@img.cas.cz

Education

2007 - present Molecular biology, Faculty of Science, Charles University, Prague
Ph.D. degree

2002 - 2008 Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague
M.Sc. degree Thesis: Nonmethylated CpG oligodeoxynucleotides and their function
in the differentiation of murine dendritic cells

2002 - 2007 Biochemistry, University of Chemical Technology, Prague
M.Sc. degree Thesis: Specific detection of milk proteins by antibodies

Research Experience

2004 - present Department of Tumor Immunology, Institute of Molecular Genetics, Prague

2011 September FEBS International Summer School on Immunology

2011 February-July Internship, Department of Tumor Immunology, LUMC Leiden

2010 May EMBL Course Whole Transcript Microarray Data Analysis

2010 March Real-time PCR course, TATAA Biocenter, Prague

2009 May Practical course of microarray techniques, IHBT Prague

2008 October Internship, Institute of Molecular Biology and Genetics, Kiev

2007 April Course of protein expression, Institute of Microbiology, Prague

2006 November Course of targeted mutagenesis, Institute of Microbiology, Prague

Awards

2011 CIMT Annual Meeting, Poster Award (co-author)