

Charles University in Prague

Univerzita Karlova v Praze



Summary of PhD. Thesis

Autoreferát dizertační práce

**Gene Modified Cellular Vaccines against
bcr-abl-transformed cells**

**Geneticky modifikované buněčné vakcíny proti
bcr-abl-transformovaným buňkám**

Mgr. Martina Petráčková

Supervisor (Školitel): Prof. MUDr. Vladimír Vonka, DrSc.

Praha 2012

Implemented:	Department of Experimental Virology Institute of Hematology and Blood Transfusion U Nemocnice 1, 128 20 Prague 2
Phone:	221 977 382
E-mail:	martina.petrackova@uhkt.cz
Zrealizované:	Oddělení experimentální virologie Ústav hematologie a krevní transfuze U Nemocnice 1, 128 20 Praha 2
Telefon:	221 977 382
E-mail:	martina.petrackova@uhkt.cz

Program: Buněčná a molekulární biologie, genetika a virologie
Předseda oborové rady: Prof. RNDr. Stanislav Zdražil, DrSc.

CONTENTS

1. INTRODUCTION	3
2. OBJECTIVES OF THE PhD. THESIS	4
3. MATERIAL AND MAIN METHODS	5
4. RESULTS AND DISCUSSION	6
5. CONCLUSIONS	10
6. REFERENCES	19
CURRICULUM VITAE	20
BIBLIOGRAPHY	21

OBSAH

1. ÚVOD	11
2. CÍLE PRÁCE	12
3. MATERIÁL A HLAVNÍ METODY	13
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	14
5. ZÁVĚR	18
6. LITERATURA	19
ŽIVOTOPIS	20
VLASTNÍ PUBLIKACE	21

1. INTRODUCTION

Chronic myeloid leukaemia (CML) is a lethal disease of the blood stem cell characterized by clonal expansion of haematopoietic progenitor cells. It is casually associated with a reciprocal translocation between chromosome 9 and 22. This translocation generates the *bcr-abl* fusion gene. It is generally accepted that the product of this gene, the BCR-ABL protein, is responsible for both the cell transformation and the maintenance of the transformation state [1]. Although the first immunotherapeutic studies in CML patients are already under way, the basic aspects of the bcr-abl immunity should be further studied in animal models. Series of experiments aimed at broadening the present knowledge on the immune reactions against the bcr-abl-transformed cells were performed in our laboratory in BALB/c mice using two syngeneic *bcr-abl* (b3a2)-transformed cell lines denoted B210 and 12B1. Several types of experimental vaccines directed against the BCR-ABL were developed or are under development in our laboratory [2]. These have included: DNA vaccines [3], VLP (virus like particles)-based vaccines [4], dendritic cell (DC)-based vaccines and recombinant vaccinia viruses (Němečková et al, unpublished data). Of these, the DNA vaccines using the whole bcr-abl fusion gene were the most efficient. The fusion zone of BCR-ABL carries a new amino acid resulting from the chromosome translocation, this creating unique sequence that is supposed to be a specific tumour antigen. But in our model system, the junction region of BCR-ABL failed to induce protective immune response and apparently other epitopes carried by the BCR-ABL were involved [3]. For this reason our attention has been directed to the development of whole cell-based vaccines that are able to induce immune response against a whole complex of tumour-associated antigens.

My PhD thesis is concerned with gene-modification of mouse *bcr-abl*-transformed cells secreting IL-2 or GM-CSF or IL-12 and their *in vitro* and *in vivo* properties.

2. OBJECTIVES OF THE PhD. THESIS

- Optimising the transfection method for hard-to-transfect lymphoblastoid *bcr-abl*-transformed B210 and 12B1 cells
- Transfection of B210 and 12B1 cells with plasmids carrying the gene for either IL-2 or GM-CSF or IL-12 and the gene for a selection marker
- Isolation of clones derived from the gene-modified cells and their *in vitro* characterization
- Monitoring the pathogenicity of the gene-modified cells
- Evaluation of the immunogenic potential of gene-modified cells in the prophylactic and therapeutically designed experiments
- Characterization of the pathological changes in mice inoculated with GM-CSF producing 12B1 cell line

3. MATERIAL AND MAIN METHODS

Two **BALB/c mouse cell** lines transformed with the retrovirus-derived vector carrying the ***bcr-abl* fusion gene** (b3a2) and **expressing p210^{bcr-abl} protein** were used. B210 cells had been derived from the BA/F3 cell line by Daley and Baltimore [5] and were kindly provided to us by G.Q. Daley (Whitehead Institute, Cambridge Center, MA). 12B1 cells had been derived by transformation of primary bone marrow cells [6] and were obtained through the courtesy of E. Katsanis (University of Arizona, Tucson, AZ). The characteristics of these cell lines were described elsewhere [7]. To derive from them **thymidine-kinase less subline (cTK-)**, the cells had been passaged at a gradually increasing concentrations of BrdU. The cTK- cells were incapable of replicating in the HAT media (RPMI supplemented with hypoxanthine, aminopterin and thymidine).

The electroporation method was introduced and optimised using the plasmid carrying the gene for **GFP**. The transfection efficiency was determined by **flow cytometric analysis**. Plasmids pBSC/IL-2 and pBSC/GM-CSF constructed by M. Šmahel (IHBT, Prague) were modified by inserting into them the **gene for blasticidine resistance**. The new constructs were denoted **pBSC/IL-2-Bsr** and **pBSC/GM-CSF-Bsr**. The cTK- cells were transfected with pTR-IL-2-IRES-TK, pTR-IL-12-IRES-TK, pTR-GM-CSF-IRES-TK or pTR-IRES-TK plasmids carrying the gene for the respective cytokine and the gene for herpes virus thymidine kinase (HSV TK).

Western blotting was performed with anti-c-abl monoclonal antibody to detect **p210^{bcr-abl} protein**. Cytokine production of cell clones was measured by **ELISA tests**. To find whether the B210/cTK- cells were transduced **ganciclovir (GCV) sensitivity assay** was performed. The presence of the **MHC class I and class II** molecules on the surface of the cell clones was tested using **flow cytometry**.

For **oncogenicity assays**, groups of BALB/c mice were inoculated with $10^3 - 10^6$ of the gene-modified cells and parental cells used as controls. In the case of B210-cytokine-modified cells the application was intravenous; the 12B1 cells were injected subcutaneously, inducing subcutaneous solid lymphoma-like tumours. Mice were monitored for the symptoms of the disease and in the case of 12B1 cell lines for the tumour development three times a week for up to 100 days. Mice inoculated subcutaneously with the 12B1/GM-CSF/cl-5 cells and with the parental 12B1 cells were followed for the development of tumours and pathological changes in various organs. Blood samples were collected to determine the GM-CSF levels in the sera by ELISA test. At autopsy, several organs were taken for **histological and immunohistochemical investigation**. The contents of tumour cells, Tregs and MDSC among the splenocytes were determined using flow cytometry. To **neutralize GM-CSF** in mice, a monoclonal anti-mouse GM-CSF antibody was applied intraperitoneally.

For **immunogenicity assays**, B210 gene-modified cells were used as live vaccines, while the cell lines derived from 12B1 cells were inactivated by **γ -radiation** (100 Gy). The amounts of 1×10^6 or 3×10^6 cells were injected intraperitoneally. In the prophylactic scheme of experiments, vaccines were applied twice at two-week interval and two weeks after the second vaccine dose the animals were challenged with 5×10^3 12B1 cells. In the therapeutic scheme of experiments the same count of 12B1 cells was administered simultaneously with the first dose of vaccine. Three other vaccine doses were applied 3, 7 and 10 days after the first one. The mice were monitored for tumour growth three times a week.

4. RESULTS AND DISCUSSION

Transfection of B210 and 12B1 cells and the selection systems used

Both the lymphoblastoid B210 and 12B1 cells are hard-to-transfect cells. From the non-viral transfection methods available the electroporation was chosen. First the electroporation parameters were optimised using plasmid carrying the gene for GFP. The transfection efficacy achieved was up to 20% of the surviving cells.

Previously, in order to gene-modify the tumour cells in our laboratory, the cTK- cell lines were established and transfected with plasmids carrying the herpes viral thymidine kinase (HSV TK)[8 , 9 , 10]. Using this system, the B210cTK- cells were derived. Loss of cTK activity, but possibly also other mutations resulted in decreasing their virulence. The gene-modified cells were cloned and the most pathogenic clone denoted B210cTK-/cl-2 was chosen for transfection. The successfully transduced cells were selected in the HAT media.

The 12B1cTK- cells were prepared similarly. But revertants to the TK+ phenotype appeared in cultures of both transfected and mock-transfected cells. For this reason the selection system based on blasticidine resistance of transduced cells was developed and successfully employed for the selection of 12B1 derived gene-modified cells.

Characterization of gene-modified B210 cells

The B210cTK-/cl-2 cells were transfected with plasmids carrying the gene for the respective cytokine and the gene for HSV TK. To make certain that the cell lines isolated in HAT media were not revertants to the cTK+ phenotype, their sensitivity to GCV was verified. The cell lines B210/2/GM-CSF, B210/2/IL-2 and B210/IL-12 produced approximately 30, 8 and 160 ng/10⁶ cells/24 hrs of the respective cytokines. All transduced cell lines expressed approximately the same amount of the p210^{bcr-abl} protein as the parental

cells. The cell lines secreting cytokines were cloned and several clones were tested for the permanent cytokine expression. For the subsequent experiments the clones B210/2/GM-CSF/cl-1, B210/2/IL-2/cl-21, B210/2/IL-12/cl-3 secreting 40 ng GM-CSF, 25 ng IL-2 and 110 ng IL-12 /10⁶ cells/24 hrs were chosen. These cells did not express either the MHC class I or MHC class II molecules on their surface, similarly as the parental cells.

The gene-modified B210 cells and their clones were tested for the oncogenicity. None of the cells expressing GM-CSF or IL-2 or IL-12 were oncogenic for mice.

In the prophylactic scheme of experiments the cells producing GM-CSF and IL-2 were compared. The B210/IL-2/cl-21 cells failed to induce any protection. The B210/GM-CSF/cl-1 cells protected 40% of mice and the tumour growth was significantly delayed.

In the therapeutic scheme of experiments all the B210 vaccines producing IL-2, IL-12 or GM-CSF were more immunogenic than the parental cells. The therapy did not prevent tumour development, but it significantly postponed their appearance. The combination of cell vaccines with the administration of anti-leukemic drugs such as imatinib mesylate (IM), IFN- α and cyclophosphamide resulted in their increased effectiveness, mainly in the case of B210/IL-2 cells.

Characterization of gene-modified 12B1 cells

The 12B1 cells were transfected with pBSC/IL-2-Bsr and pBSC/GM-CSF-Bsr plasmids and selected in the presence of blasticidine. Several clones were isolated from each transfected culture and the subsequent tests revealed that they secreted the respective cytokine. For further experiments, permanently transfected cell clones 12B1/IL-2/cl-15, 12B1/GM-CSF/cl-5, 12B1/GM-CSF/cl-1 producing 30 ng IL-2, 110 ng GM-CSF and 3 ng GM-CSF /10⁶ cells/24 hrs, respectively, were selected. Western blotting confirmed that all these clones expressed comparable amounts of p210^{bcr-abl} protein. All these clones expressed MHC class I molecules but not MHC class II molecules, similarly as their maternal cells.

The 12B1/IL-2/cl-15 cells were at the dose 10^3 and 10^4 nononcogenic. The two higher doses induced small subcutaneous tumours, which spontaneously regressed. Later on most of these animals died of leukaemia-like disease but their survival was prolonged when compared with the controls. All animals inoculated with 12B1/GM-CSF/cl-5 cells developed tumours similar to those induced by the parental 12B1 cells. In addition, these animals had bristled hair and showed a loss of weight, and their autopsy revealed extensive organ damage never seen in mice inoculated with the parental 12B1 cells. The relationship between the GM-CSF production and pathogenicity was observed.

Several tumours and infiltrated organs of mice inoculated with the gene-modified cells were investigated. Cell cultures derived from 12B1/IL-2/cl-15 tumours were not homogenous, being composed of a great majority of cells, in which the transgenes were not expressed, either because of their loss or silencing. The cells derived from 12B1/GM-CSF/cl-5 induced tumours grew well in the media supplemented with blasticidine and secreted similar amounts of GM-CSF as the cells inoculated.

In the immunization/challenge experiments the highest anti-tumour immune responses were recorded after immunisation with 12B1/GM-CSF/cl-5 cells. All the animals vaccinated with them remained tumour-free. The vaccine of 12B1/IL-2/cl-15 cells was less efficient but it still protected more than half of the mice immunized and the tumour growth was significantly slower than that in either control mice or mice vaccinated with irradiated 12B1 cells.

Studying the effect of GM-CSF overproduction in mice

To characterize in more detail the pathological changes induced in mice inoculated with cells secreting large quantity of GM-CSF, groups of mice were inoculated with either these cells or parental cells. Histopathological investigation of 12B1/GM-CSF/cl-5 inoculated mice demonstrated extensive organ injury. Most striking were haemorrhagic

changes in lungs, huge splenomegaly with increased counts of megakaryocytes, liver haemorrhagias and renal injury with accumulation of hyaline in proximal tubules. In mice inoculated with parental 12B1 cells carrying tumours of the same size only hepatosplenomegaly was observed. Increasing levels of GM-CSF in the peripheral blood were accompanied by a marked accumulation of MDSC in spleens. The data strongly suggested that the extensive organ damage observed in 12B1/GMCSF/c1-5-inoculated mice was caused by the overproduction of GM-CSF. This was confirmed by the strong reduction of the organ injury by the administration of neutralizing anti-GM-CSF antibody.

5. CONCLUSIONS

In the present study, experimental cell vaccines based on the mouse *bcr-abl*-transformed B210 or 12B1 cells expressing either IL-2 or GM-CSF or IL-12 were developed and tested in our mouse model.

- Electroporation was optimised for the successful transfection these lymphoblastoid cells.
- Permanently transfected cells were isolated and several clones were derived from them. Clones with a high cytokine production were selected for the subsequent experiments.
- Transfected cells and their clones did not markedly differ from their parental cells in BCR-ABL production and in the presence or absence of the MHC molecules on their surfaces.
- All the cell lines secreting IL-2, GM-CSF or IL-12 derived from B210 cells were non-oncogenic.
- 12B1 cells secreting IL-2 had reduced oncogenic potential and most of the animals, which did not develop tumours after administration of these cells, were found resistant to the challenge with parental cells.
- 12B1 cells secreting GM-CSF preserved their oncogenic potential. Moreover increasing concentration of GM-CSF produced by proliferating 12B1/GM-CSF/cl-5 cells was associated with marked expansion of MDSC and extensive and fatal organ damage.
- In the immunization/challenge experiments the most efficient vaccines were those secreting GM-CSF.
- As concerns immunotherapeutic potential, the most favourable results were achieved with the B210 cells secreting IL-2, especially in the combination with chemotherapy.

1. ÚVOD

Chronická myeloidní leukémie (CML) je letální onemocnění způsobené nádorovou transformací kmenové hematopoetické buňky v kostní dřeni. Příčinou transformace je reciproká translokace mezi chromozómy 9 a 22, během níž dojde ke vzniku fúzního genu *bcr-abl*. Protein BCR-ABL vykazuje vysokou tyrozinkinázovou aktivitu, která je zodpovědná za deregulaci důležitých signálních drah. To vede ke vzniku maligního charakteru buňky [1].

V naší laboratoři se již několik let věnujeme studiu CML a možnosti její léčby pomocí imunoterapie. Tuto problematiku zkoumáme na modelu myši BALB/c s použitím syngenních myších buněčných linií B210 a 12B1 transformovaných fúzním genem *bcr-abl* [2]. Navrženo a testováno bylo několik typů experimentálních vakcín zaměřených proti proteinu BCR-ABL: (a) DNA vakcíny [3], (b) rekombinantní vakcíny na bázi viru vakcinie (Němečková *et al*, publikace v přípravě), (c) hybridní, viru podobné částice (VLP) [4], (d) vakcíny z dendritických buněk (Němečková *et al*, publikace v přípravě). Nejúčinnější se jevily DNA vakcíny nesoucí celý gen pro BCR-ABL. Fúzí genů *bcr* a *abl* vzniká v proteinu BCR-ABL sekvence aminokyselin, která se nevyskytuje v žádném jiném proteinu a je považována za specifický nádorový antigen. Ukázalo se však, že imunita proti nádorovým buňkám není vyvolána fúzní zónou hybridního proteinu, ale epitopy lokalizovanými v jiných jeho částech [3]. Naším současným cílem je prověřit možnost využít k imunizaci proti buňkám transformovaným genem *bcr-abl* vakcíny z nádorových buněk. Ty by vystavily organismus nejen specifickému nádorovému antigenu, ale celému spektru buněčných antigenů, které jsou v nádorové buňce vyvolány aktivitou proteinu BCR-ABL a nejsou přítomny v normálních buňkách buď vůbec anebo jen v malém množství. Pro zvýšení protinádorového účinku buněčných vakcín lze do buněk vnést gen, jehož produkt posiluje jejich imunostimulační účinky.

Tato dizertační práce mapuje přípravu a testování buněčných vakcín založených na buňkách B210 a 12B1 exprimujících gen pro vybraný cytokin a popisuje i některé nežádoucí změny, které mohou genově modifikované buňky v organismu vyvolat.

2. CÍLE PRÁCE

- Najít metodu transfekce vhodnou pro lymfoblastoidní buňky B210 a 12B1
- Vpravit do buněk plazmid nesoucí gen pro cytokin IL-2, GM-CSF nebo IL-12 a získat klony modifikovaných buněk se stabilní expresí cytokinu
- Charakterizovat vybrané klony modifikovaných buněk B210 a 12B1 *in vitro*
- Zjistit onkogenní potenciál genově modifikovaných buněk B210 a 12B1
- Stanovit imunogenní potenciál genově modifikovaných buněk B210 a 12B1
- Zjistit případné nežádoucí změny, vyvolané inokulací genově modifikovaných buněk myším

3. MATERIÁL A HLAVNÍ METODY

Buněčné linie **B210** a **12B1** jsou **myší BALB/c buňky**, transformované retrovirovým vektorem nesoucím lidský **fúzní gen *bcr-abl***, jehož produkt je protein **p210^{bcr-abl}**. Buňky B210 připravil a poskytl G. Q. Daley (Whitehead Institute, Cambridge Center, MA), jsou odvozeny z buněčné linie BA/F3 [5]. Buňky 12B1 vznikly transformací buněk kostní dřeně [6] a poskytl je E. Katsanis (University of Arizona, Tuscon, AZ). Charakteristika těchto buněk je popsána v [7]. Od obou linií byla odvozena buněčná linie **deficientní na buněčnou tymidinkinázu (cTK-)**, a to jejich pasážováním v přítomnosti vzrůstající koncentrace BrdU. Buňky cTK- nejsou schopny replikace v médiu HAT (RPMI s hypoxantinem, aminopterinem a, tymidínem).

Pro transfekci buněk byla vybrána metoda **elektroporace**, kterou bylo potřeba nejprve optimalizovat pomocí plazmidu s genem pro **GFP**. Účinnost transfekce byla měřena **průtokovou cytometrií**. Plazmidy pBSC/IL-2 a pBSC/GM-CSF, které konstruoval M. Šmahel (ÚHKT, Praha), byly upraveny začleněním genu pro rezistenci k blasticidinu. Vzniklé konstrukty byly označeny jako **pBSC/IL-2-Bsr** and **pBSC/GM-CSF-Bsr**. Buňky cTK- byly transfekovány plazmidy **pTR-IL-2-IRES-TK**, **pTR-IL-12-IRES-TK**, **pTR-GM-CSF-IRES-TK** nebo **pTR-IRES-TK** nesoucí gen pro cytokin a gen pro herpesvirovou tymidinkinázu (HSV TK).

Exprese p210^{bcr-abl} v transdukovaných buňkách byla ověřována metodou **western blotting** s monoklonální protilátkou anti-c-abl. Produkce jednotlivých cytokinů buněčnými liniemi byla stanovena **ELISA testem**. Exprese HSV TK v transfekovaných B210/cTK-/cl-2 buňkách byla ověřena **testem citlivosti na ganciklivir (GCV)**. Přítomnost molekul MHC I. a II. třídy na povrchu buněk byla zjišťována pomocí **průtokové cytometrie**. **Onkogenní potenciál** buněčných linií byl testován po aplikaci $10^3 - 10^6$ buněk myším, které byly podány buď intravenózně (i.v., v případě buněk odvozených od linie B210) nebo subkutánně

(s.c., v případě buněk odvozených od linie 12B1). U myši se pozorovaly jednak příznaky nemoci, jednak růst nádoru, a to třikrát týdně po dobu až 100 dní. U myši, kterým byly inokulovány buňky 12B1 a 12B1/GM-CSF/cl-5, byly studovány orgánové změny **histologickými a imunohistochemickými metodami**. V sérech se zjišťovala hladina GM-CSF pomocí **ELISA testu** a splenocyty byly analyzovány **průtokovou cytometrií**. K neutralizaci GM-CSF v myších byly zvířatům intraperitoneálně aplikovány **neutralizační anti-GM-CSF protilátky**.

Vakcíny odvozené od B210 buněk se aplikovaly **živé**, vakcíny odvozené od 12B1 buněk se podávaly **inaktivované γ -zářením** (100 Gy). V dávce 1×10^6 nebo 3×10^6 se injikovaly intraperitoneálně. V profylaktickém schématu pokusu se myši vakcinovaly v dvoutýdenním intervalu a po čtrnácti dnech byly čelenžovány 5×10^3 buněk 12B1. V terapeutickém schématu pokusu proběhla první vakcinace současně se s.c. aplikací živých buněk 12B1 (5×10^3), další vakcíny byly podány 3., 7. a 10. den od první vakcíny.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

Transfekce buněk B210 a 12B1 a použité selekční systémy

Buňky B210 i 12B1 mají lymfoblastoidní charakter. Tento typ buněk se nevirovými metodami těžko transfekuje. Nicméně elektroporace se ukázala vhodnou metodou a po její optimalizaci s plazmidem nesoucím GFP bylo dosaženo až 20% účinnosti transfekce.

V minulosti byl ke genetické modifikaci nádorových buněk používán v naší laboratoři systém, v němž bylo v prvním kroku třeba odvodit buňky deficientní v buněčné tymidinkináze (cTK-) a ty byly posléze transfekovány plazmidem nesoucím mimo gen pro příslušný cytokin i gen pro herpesvirovou tymidinkinázu (HSV TK)[8,9,10]. Transfekované buňky bylo pak možné selektovat v médiu s HAT. Tímto způsobem byly připraveny i buňky B210cTK-. Ztráta cTK, ale i možné další mutace snížily virulenci buněk

B210cTK-. Buňky byly proto klonovány a nejpatogennější klon B210cTK-/cl-2 byl vybrán pro transfekci. Stejně byly odvozeny i buňky 12B1cTK-. Mezi transfekovanými, ale i mezi netransfekovanými buňkami se však objevovaly revertanty cTK+ fenotypu a nebylo možné vyselektovat genově-modifikované buňky. Z toho důvodu byl k selekci modifikovaných buněk zvolen systém založený na získání rezistence k blasticidinu.

Charakterizace genově modifikovaných buněk B210

Buňky B210cTK-/cl-2 byly transfekované plazmidem nesoucím gen pro vybraný cytokin a gen pro HSV TK. U těchto buněk rostoucích v médiu s HAT se ověřila jejich citlivost na GCV, což vyloučilo, že jde o revertanty k cTK+ fenotypu. Připraveny byly linie B210/2/GM-CSF, B210/2/IL-2 a B210/IL-12 produkující přibližně 30 ng GM-CSF, 8 ng IL-2 a 160 ng IL-12 /10⁶ buněk/24 hod. Všechny tyto linie produkovaly přibližně stejné množství p210^{bcr-abl} jako buňky mateřské, byly klonovány a vybrané klony byly testovány na stabilní expresi daného cytokinu. Pro další pokusy pak byly vybrány klony B210/2/GM-CSF/cl-1, B210/2/IL-2/cl-21, B210/2/IL-12/cl-3 sekretující 40 ng GM-CSF, 25 ng IL-2 a 110 ng IL-12 /10⁶ buněk/24 hod. Tyto buňky byly stejně jako buňky mateřské negativní na molekuly MHC I. a MHC II. třídy.

Genově modifikované buňky B210 byly dále testovány na jejich onkogenitu. Všechny modifikované buňky produkující IL-2 nebo GM-CSF nebo IL-12 byly neonkogenní. V profylaktickém uspořádání pokusu byla porovnáována účinnost vakcín z buněk B210 produkujících GM-CSF nebo IL-2. Buňky B210/IL-2/cl-21 nenavodily žádnou ochranu proti čelenži buňkami 12B1. Buňky B210/GM-CSF/cl-1 ochránily 40% myši a u zbývajících zvířat byl růst nádorů statisticky významně opožděn.

V terapeutickém uspořádání pokusu měly buňky B210 produkující IL-2, IL-12 nebo GM-CSF vyšší imunogenní potenciál, než mateřské buňky B210. Nádory se myším utvořily, ale jejich vývoj byl statisticky významně zpožděný. Pokud byly tyto vakcíny kombinovány s

antileukemickými léčivy imatinib mesylátem (IM), IFN- α a cyklofosfamidem, dosáhlo se daleko větší protinádorové odpovědi, především při imunizaci s buňkami B210/IL-2.

Charakterizace genově modifikovaných buněk 12B1

Buňky 12B1 byly transfekovány s plazmidy pBSC/IL-2-Bsr and pBSC/GM-CSF-Bsr. Z kultur transfekovaných buněk bylo odvozeno několik klonů a ověřeno na stabilní expresi cytokinů. Na další pokusy byly vybrány klony 12B1/IL-2/cl-15, 12B1/GM-CSF/cl-5, 12B1/GM-CSF/cl-1 produkující 30 ng IL-2, 110 ng GM-CSF a 3 ng GM-CSF / 10^6 buněk/24 hod. Všechny tyto klony exprimovaly přibližně stejné množství p210^{bcr-abl} a stejně jako mateřské buňky exprimovaly na svých površích molekuly MHC I. třídy.

Klon 12B1/IL-2/cl-15 byl při pokusu na myších v dávce 10^3 and 10^4 neonkogenní. Vyšší dávky těchto buněk vyvolaly u myší malé nádory, které spontánně vymizely. U většiny zvířat se později rozvinula leukémie, myši však přežívaly celkově déle než zvířata v kontrolní skupině. Myši, které zůstaly po jejich inokulaci zdravé, pak byly chráněny před čelenží buňkami 12B1.

Zvířatům inokulovaným buňkami 12B1/GM-CSF/cl-5 se vyvinuly nádory stejně jako zvířatům inokulovaným buňkami 12B1. Navíc měly myši zježenou srst, ubývaly na váze a byla u nich zjištěna rozsáhlá orgánová poškození, která nebyla u myší naočkovaných buňkami 12B1 pozorovaná. Mezi produkcí GM-CSF inokulovanými buňkami a jejich patogenitou byla přímá souvislost. Z několika nádorů a orgánů infiltrovaných nádorovými buňkami byly připraveny buněčné kultury. Kultura z buněk odvozených od nádoru vyvolaného buňkami 12B1/IL-2/cl-15 nebyla homogenní, většina buněk neexprimovala vnesené transgeny, buď je ztratila, nebo byly umlčeny. Buněčné kultury odvozené od nádorů vyvolaných buňkami 12B1/GM-CSF/cl-5 exprimovaly jak gen pro rezistenci k blasticidinu, tak i GM-CSF, a to přibližně ve stejném množství jako buňky, které byly myším podány.

V profylaktickém uspořádání pokusu byla nejvyšší protinádorová odpověď zaznamenána po imunizaci s buňkami 12B1/GM-CSF/cl-5, všechny myši zůstaly zdravé. Vakcína z buněk 12B1/IL-2/cl-15 byla méně účinná, přesto víc jak polovina myší zůstala bez nádoru a růst nádoru byl významně zpomalený oproti kontrolním skupinám.

Studium efektu nadprodukce GM-CSF v myších

Buňky 12B1 a 12B1/GM-CSF/cl-5 byly podány subkutánně v dávce 5×10^3 . Hladina GM-CSF u skupiny myší inokulovaných buňkami 12B1/GM-CSF/cl-5 během pokusu exponenciálně stoupala a v jejich orgánech byla histologicky a imunohistochemicky zjištěna rozsáhlá poškození. Nápadné byly hemoragické změny v plicích, velká splenomegálie s narůstajícím počtem megakaryocytů, poškození jater s hemorrhagickými ložisky a poškození ledvin s hyalinní degenerací proximálních tubulů. Zvyšující se množství GM-CSF v krvi korelovalo s akumulací MDSC ve slezině. U myší inokulovaných buňkami 12B1 byla pozorována jen hepatosplenomegálie a vývoj subkutánních nádorů. Abychom potvrdili naše závěry, že výše popsané patologické změny jsou způsobené vysokou koncentrací GM-CSF, byly myším inokulovaných buňkami 12B1/GM-CSF/cl-5 aplikovány neutralizační anti-GM-CSF protilátky. Díky nim byl rozsah orgánových poškození výrazně menší.

5. ZÁVĚR

Předložená práce se věnuje přípravě a testování experimentálních buněčných vakcín, založených na buňkách B210 a 12B1 transformovaných fúzním genem bcr-abl, které exprimují IL-2 nebo GM-CSF nebo IL-12.

- K transfekci lymfoblastoidních buněk B210 a 12B1 byla zvolena a optimalizována metoda elektroporace.
- Podařilo se získat stabilně transfekované buňky produkující cytokiny a od nich odvodit několik klonů. Pro další pokusy byly použity převážně klony s vysokou produkcí daného cytokinu.
- Transfekované buňky i jejich klony produkovaly přibližně stejné množství proteinu p210^{bcr-abl} jako buňky mateřské a modifikací se nezměnila ani přítomnost molekul MHC na jejich povrchu.
- Buněčné linie odvozené od buněk B210 sekretujících IL-2, GM-CSF nebo IL-12 byly neonkogenní.
- Buňky 12B1 sekretující IL-2 měly oproti mateřským buňkám významně snížený onkogenní potenciál. Myši, které zůstaly po jejich inokulaci zdravé, pak byly chráněny před čelenží buňkami 12B1.
- Buňky 12B1 sekretující GM-CSF si ponechaly onkogenní potenciál mateřských buněk. Navíc zvyšující se sérová koncentrace GM-CSF produkovaného proliferaujícími buňkami 12B1/GM-CSF/cl-5 byla spojena s akumulací MDSC ve slezině a s rozsáhlým orgánovým poškozením.
- V profylaktickém uspořádání pokusu byly u obou buněčných linií B210 a 12B1 nejefektivnější vakcíny sekretující GM-CSF.
- Buňky B210 sekretující IL-2 aplikované jako terapeutické vakcíny dosáhly dobrých protektivních výsledků zvláště v kombinaci s chemoterapií.

6. REFERENCES (LITERATURA)

- [1] Ren R. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2005;5(3):172-83.
- [2] Vonka V. Immunotherapy of chronic myeloid leukemia: present state and future prospects. *Immunotherapy* 2010;2(2):227-41.
- [3] Lucansky V, Sobotkova E, Tachezy R, Duskova M, Vonka V. DNA vaccination against bcr-abl-positive cells in mice. *Int J Oncol* 2009;35(4):941-51.
- [4] Hruskova V, Moravkova A, Babiarova K, et al. Bcr-Abl fusion sequences do not induce immune responses in mice when administered in mouse polyomavirus based virus-like particles. *Int J Oncol* 2009;35(6):1247-56.
- [5] Daley GQ, Baltimore D. Transformation of an interleukin 3-dependent hematopoietic cell line by the chronic myelogenous leukemia-specific P210bcr/abl protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85(23):9312-6.
- [6] McLaughlin J, Chianese E, Witte ON. In vitro transformation of immature hematopoietic cells by the P210 BCR/ABL oncogene product of the Philadelphia chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84(18):6558-62.
- [7] Sobotkova E, Ludvikova V, Petrackova M, et al. Characteristic of two mouse bcr-abl-transformed cell lines: I. General properties of the cells. *Folia Biol (Praha)* 2005;51(1):12-8.
- [8] Vonka V, Sobotkova E, Hamsikova E, et al. Induction of anti-tumour immunity by suicide-gene-modified HPV-16-transformed hamster cells. *Int J Cancer* 1998;77(3):470-5.
- [9] Janouskova O, Sima P, Kunke D. Combined suicide gene and immunostimulatory gene therapy using AAV-mediated gene transfer to HPV-16 transformed mouse cell: decrease of oncogenicity and induction of protection. *Int J Oncol* 2003;22(3):569-77.
- [10] Jinoch P, Zak R, Janouskova O, et al. Immunization with live HPV-16-transformed mouse cells expressing the herpes simplex thymidine kinase and either GM-CSF or IL-2. *Int J Oncol* 2003;23(3):775-83.

CURRICULUM VITAE

Name: Martina Petráčková

Birth date: 8.3.1972

Affiliation: Department of Experimental Virology
Institute of Hematology and Blood Transfusion
U Nemocnice 1, 128 20 Prague 2, Czech Republic

Email: martina.petrackova@uhkt.cz

Education:

1990 – 1995 Charles University, Faculty of Natural Sciences, Prague

2007 - Postgraduate student, Charles University, Faculty of Natural Sciences,
Prague, section Molecular and Cellular Biology, Genetics and Virology

Working experience:

2004- Institute of Hematology and Blood Transfusion, Department of
Experimental Virology, Prague, Czech Republic
Characterization bcr-abl-transformed cell lines, transfection of these cells by
genes coding for immunostimulatory cytokines, use of the transduced cells as
vaccines in a mouse model, analysing of cell populations by flow cytometry,
studying the role of cytokines in CML-like disease

Courses and trainee-ship:

1994 Max Planck Institute for Biochemistry, Munich, Germany,
six month fellowship in the Laboratory of Plant Molecular Biology

2007 Course of Animal Handling with bestowing The Certificate of Competency
according to §17 of the Act No. 246/1992 coll. on Protection Animals against
Cruelty by Central Commission for Animal Welfare (CCAW)

BIBLIOGRAPHY (VLASTNÍ PUBLIKACE)

List of publications involved in the PhD. Thesis

(Publikace, které jsou podkladem dizertační práce)

Petráčkova M, Sobotková E, Dušková M, Jinoch P, Vonka V. Isolation and properties of gene-modified mouse bcr-abl transformed cells expressing various immunostimulatory factors. *Neoplasma*. 2009;56(3):194-201. IF 1,179

Sobotková E, Dušková M, Tachezy R, **Petráčkova M**, Vonka V. Combined chemo- and immunotherapy of tumors induced in mice by bcr-abl-transformed cells. *Oncol Rep*. 2009 Mar;21(3):793-9. IF 1,524

Petráčkova M, Tachezy R, Vonka V. Properties of bcr-abl-transformed mouse 12B1 cells secreting interleukin-2 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: I. Derivation, genetic stability, oncogenicity and immunogenicity. *Int J Oncol*. 2012 May;40(5):1668-76 IF 2,571

Petráčkova M, Staněk L, Mandys V, Dundr P, Vonka V. Properties of bcr-abl-transformed mouse 12B1 cells secreting interleukin-2 and granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF): II. Adverse effects of GM-CSF. *Int J Oncol*. 2012 Jun;40(6):1915-22 IF 2,571

Other publications (Ostatní publikace)

Sobotková E, Ludvíková V, **Petráčkova M**, Dušková M, Smetana K, Jelínek F, Marinov I, Vonka V. Characteristic of two mouse bcr-abl-transformed cell lines: I. General properties of the cells. *Folia Biol. (Praha)* 2005; 51, 12-18, IF 0,7

Krmenčíková M, Staněk L, **Petráčkova M**, Dundr P, Vonka V. Unexpected properties of endostatin-producing mouse BCR-ABL-transformed cells. *Int J Oncol*. 2012 Feb;40(2):487-93, IF 2,571

Oral presentations (Přednášky)

Petrackova M., Sobotkova E., Duskovala M., Stanek L., Vonka V. : Gene-modified mouse bcr-abl transformed cells expressing various immunostimulatory factors and their use as vaccines. *1st International Conference on Advances in Cell and Gene Therapy and Immunotherapy: from basic research to clinical applications and 3rd Workshop on Immunotherapy*; Sept 23 – 25, 2010; Mikulov castle, South Moravia

Petrackova M., Sobotkova E., Duskova M., Stanek L., Vonka V. : Gene-modified mouse bcr-abl transformed cells expressing various immunostimulatory factors and their use as vaccines. *15th World Congress on Advances in Oncology and 13th International Symposium on Molecular Medicine*; Oct 7-9, 2010, Hotel Poseidon Resort, Loutraki, Greece

Poster presentations (Plakátová sdělení)

Petráček M., Sobotková E., Forstová J, Nemečková S, Kutinová L, Lučanský V, Šmahel M, Mocová K, Vonka V: Genetic vaccines against chronic myelogenous leukemia (CML): studies in mouse model. *XIIIth Annual Congress of the European Society of Gene Therapy*; Oct 29 – Nov 1, 2005; Prague, Czech Republic

Sobotková E., Dušková M., **Petráček M.**, Vonka V. Combined chemo- and immunotherapy of tumors induced in mice by bcr-abl-transformed cells, *13th International Congress of Immunology*, Aug 21-25, 2007, Rio de Janeiro, Brazil

Petráček M., Sobotková E., Dušková M., Jinoch P, Vonka V. Isolation and properties of gene-modified mouse bcr-abl-transformed cells expressing various immunostimulatory factors, *Recent Advances in Cancer Immunotherapy with an Emphasis on Vaccines*, Oct 9-11, 2008, Athens, Greece

Staněk L., **Petráček M.**, Dundr P., Vonka V. Toxicity of GM-CSF overproduced by gene-modified mouse cells, *XVIIIth Annual Congress of the European Society of Gene & Cell Therapy*, Oct 22 – 25, 2010, Milano, Italy

Staněk L., **Petráček M.**, Dundr P., Krmenčíková M., Vonka V. Organe damage associated with overproduction of GM-CSF by gene-modified mouse cells transformed by bcr-abl fusion gene, *1st International Conference on Advances in Cell and Gene Therapy and Immunotherapy: from basic research to clinical applications and 3rd Workshop on Immunotherapy*; Sept 23 – 25, 2010; Mikulov castle, South Moravia

Petráček M., Staněk L., Dundr P., Lísová S., Vonka V. Effect of overproduction of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in mice expressed by gene-modified mouse bcr-abl transformed cells, *CIMT Cancer Immunotherapy , 9th Annual Meeting*, May 25 -27, 2011, Mainz, Germany

Petráček M., Lučanský M., Krmenčíková M., Sobotková E., Dušková M., Staněk L., Vonka V. Immunological Studies with Mouse Bcr-abl-Transformed 12B1 Cells, *Cancer Immunotherapy 2011, Immune Effector Mechanisms in Tumor Immunity*, Oct3 -5, 2011, New York, USA