

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Imunologie



Bc. Karolína Lhotáková

Modifikace myších nádorových linií systémem CRISPR/Cas9 a charakterizace jejich
vlastností

Modification of murine tumor cell lines with CRISPR/Cas9 system and their characterization

Diplomová práce

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

Praha, 2018

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí mé diplomové práce RNDr. Ingrid Polákové, Ph.D. a vedoucímu laboratoře RNDr. Michalu Šmahelovi Ph.D. za vedení mé diplomové práce, za jejich cenné rady, čas, trpělivost a ochotu, s jakou se mi po celou dobu výzkumu a následného vyhodnocování výsledků věnovali. Dále děkuji mým kolegyním Mgr. Julii Vackové a Adrianně Grzelak, Dipl. Ing. za spolupráci na myších experimentech. V neposlední řadě chci poděkovat všem členům laboratoře za vytvoření příjemného pracovního prostředí a také mé rodině a přátelům, kteří mě po celou dobu mé práce podporovali.

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, 27. 12. 2018

Podpis:

Karolína Lhotáková

Abstrakt

Molekuly MHCI jsou konstitutivně exprimované na všech jaderných buňkách organismu a hrají klíčovou roli v prezentaci antigenů CD8⁺ T lymfocytům. Nádorové buňky využívají jako jeden z nejčastějších mechanismů vyhnutí se imunitní odpovědi právě snížení exprese MHCI. To má za následek znemožnění cytotoxickým CD8⁺ T lymfocytům rozeznat nádorové buňky a vést proti nim imunitní odpověď. Jelikož ke snížení exprese MHCI dochází až u 90 % některých typů nádorů, je třeba mít k dispozici klinicky relevantní model nádorů s ireverzibilně sníženou expresí MHCI, na kterém by bylo možno testovat různé imunoterapeutické přístupy.

Tato práce popisuje přípravu nové modelové linie nádorových buněk TC-1 s ireverzibilně sníženou expresí MHCI. Toho bylo dosaženo inaktivací B2m, jež je součástí MHCI molekuly, pomocí systému CRISPR/Cas9. Inaktivace B2m u modifikovaných buněčných linií byla ověřena průtokovou cytometrií, western blotem a sekvenací jednotlivých alel. Po této inaktivaci došlo ke zpomalení růstu nádorových buněk jak *in vitro*, tak *in vivo*. Metastatická aktivita buněk nebyla ovlivněna. Nádory vytvořené buňkami s inaktivovaným B2m nejsou citlivé k DNA imunizaci cílené proti onkoproteinu E7 z HPV16 provedené vakcínou pBSC/PADRE.E7GGG. Hlavními efektorovými buňkami v imunitě proti těmto nádorům jsou NK1.1⁺ buňky. Při terapeutických pokusech se opakovaně podařilo dosáhnout zpomalení růstu nádorů při kombinaci DNA vakcinace s adjuvans ODN1826 ve srovnání se samotnou DNA imunizací. Při kombinaci dvou adjuvancií, ODN1826 a α -Tim3, DNA vakcína protinádorový účinek nezvyšovala.

Klíčová slova: MHCI, β 2-mikroglobulin, nádory, protinádorová imunita, DNA imunizace, CRISPR/Cas9

Abstract

MHCI molecules are constitutively expressed in all nucleated cells and play a key role in antigen presentation to CD8⁺ T lymphocytes. One of the tumor immune evasion strategies is MHCI expression downregulation. This leads to an impaired recognition of tumor antigens by CD8⁺ T lymphocytes that are unable to start the immune response. Since the MHCI expression downregulation occurs in up to 90 % of some tumors it is necessary to have a clinical relevant tumor model without a MHCI surface expression that would be used for testing of immunotherapeutic approaches.

This thesis describes a production of new model cell lines of TC-1 tumor cells with irreversibly downregulated MHCI. That was achieved by an inactivation of B2m, which is a part of MHCI, by gene editing using CRISPR/Cas9. The B2m inactivation was confirmed by flow cytometry, western blot and sanger sequencing of single alleles. The inactivation slowed down the cell growth for both *in vitro* and *in vivo*. The cell metastatic activity was not affected. The tumors established by cells without the B2m expression are not sensitive to DNA vaccine against HPV16 E7 oncoprotein by a pBSC/PADRE.E7GGG vaccine. The main effector function against these tumors possess the NK1.1⁺ cells. In a therapeutic vaccination experiment it was repeatedly achieved of tumor growth deceleration by combining DNA vaccination and ODN1826 adjuvans. DNA vaccination did not increase an antitumor effect when using the combination of ODN1826 and α Tim-3.

Key words: MHCI, β 2-microglobulin, tumors, antitumor immunity, DNA immunization, CRISPR/Cas9

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Literární přehled.....	9
2.1	System CRISPR.....	9
2.1.1	CRISPR/Cas9.....	10
2.2	B2m a MHCI.....	12
2.2.1	Funkce MHCI.....	13
2.2.2	Tvorba komplexu MHCI.....	13
2.2.3	MHCI v protinádorové imunitě.....	14
2.3	Nádorová imunoterapie.....	17
2.3.1	DNA vakcíny.....	20
3	Cíle práce.....	28
4	Materiál a metody.....	29
4.1	Materiál.....	29
4.1.1	Biologický materiál.....	29
4.1.2	Média.....	29
4.1.3	Roztoky, chemikálie.....	30
4.1.4	Protilátky.....	32
4.1.5	Imunostimulační látky.....	33
4.1.6	Enzymy a pufrý.....	33
4.1.7	Oligonukleotidy pro CRISPR/Cas9 a primery pro PCR a sekvenaci.....	33
4.1.8	Markery.....	33
4.1.9	Přístroje.....	34
4.1.10	Počítačový software.....	35
4.1.11	Komerční soupravy.....	35
4.2	Metody.....	36
4.2.1	Práce se systémem CRISPR/Cas9.....	36
4.2.2	Práce s DNA.....	38
4.2.3	Práce s buněčnými kulturami.....	42
4.2.4	Detekce exprese inaktivovaného genu.....	45
4.2.5	Charakterizace vybraných klonů v myším modelu.....	47
5	Výsledky.....	51
5.1	Inaktivace genu <i>B2m</i> pomocí systému CRISPR/Cas9.....	51
5.2	Transfekce plazmidů pB2m-A a pB2m-C do TC-1 buněk.....	52

5.3	U klonů s modifikovaným B2m nedochází ke konstitutivní expresi MHCI na povrchu buněk	53
5.4	Klony s modifikovaným B2m jsou negativní na povrchovou expresi B2m	56
5.5	Povrchová exprese CD1d nebyla ovlivněna inaktivací B2m	57
5.6	U vybraných klonů TC-1/C9 a TC-1/C20 nedochází k produkci B2m.	58
5.7	Inaktivace všech alel B2m byla ověřena sekvenací	59
5.8	Buněčná linie TC-1/C9/6 s inaktivovaným B2m proliferuje..... pomaleji <i>in vitro</i>	62
5.9	Inaktivace B2m snížila rychlost růstu nádorů	63
5.10	Růst nádorů vyvolaný buňkami TC-1/C9/6 je rychlejší po inokulaci většího množství buněk	64
5.11	Klony TC-1/C9/6 a TC-1/C20/11 nejsou citlivé k DNA imunizaci	65
5.12	Hlavní roli v protinádorové imunitě hrají u nádorů vyvolaných buňkami TC-1/C9/6 NK1.1 ⁺ buňky	66
5.13	Nádory pocházející z buněk s inaktivovaným B2m netvoří metastáze v plicích	67
5.14	Teraeutické pokusy	68
6	Diskuze	73
6.1	Vytvoření klonů TC-1 buněk s inaktivovaným B2m a ověření jeho inaktivace	73
6.2	Změny v proliferaci buněk <i>in vitro</i>	74
6.3	Charakteristika klonů s inaktivovaným B2m <i>in vivo</i>	75
6.3.1	Onkogenita	75
6.3.2	Imunosenzitivita	76
6.4	Terapeutické pokusy.....	76
7	Souhrn	79
8	Seznam použité literatury.....	80

Seznam zkratek

α	antibody	protilátka
APC	antigen-presenting cells	buňky prezentující antigen
B2m	β 2-microglobulin	β 2-mikroglobulin
BCG	<i>Bacillus Calmette-Guérin</i>	<i>Bacillus Calmette-Guérin</i>
CD	cluster of differentiation	diferenciační skupina
CpG ODN	CpG oligodeoxynucleotides	syntetické oligodeoxynukleotidy obsahující nemetylovaný CpG
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeats	system segmentů nahromaděných pravidelně rozmístěných krátkých palindromických sekvencí
crRNA	CRISPR RNA	CRISPR RNA
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4	antigen 4 asociovaný s cytotoxickými T lymfocyty
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	Dulbeccovo modifikované médium
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	kyselina ethylendiamintetraoctová
ER	endoplasmic reticulum	endoplazmatické retikulum
FBS	fetal bovine serum	fetální bovinní sérum
GalCer	α -galactosylceramid	α -galaktosylceramid
GM-CSF	granulocyte/macrophage colony stimulating factor	faktor stimulující kolonie granulocytů a makrogáfů
HER2/neu	human epidermal growth factor receptor 2	receptor pro lidský epidermální faktor 2
HLA	human leukocyte antigen	lidský leukocytární antigen
HPV	human papillomavirus	lidský papilomavirus
IFN	interferon	interferon
i.p.	intraperitonealy	intraperitoneálně
IS látky	immunostimulans	imunostimulační látky
IRF	interferon regulatory factor	faktor regulující interferony
KIR	killer-cell immunoglobulin-like receptor	inhibiční receptor NK buněk
LB	loading buffer	nanášecí pufir
LBM	Luria-Bertani medium	médium Luria-Bertani
LMP	low molecular weight protein	proteiny s nízkou molekulární hmotností
LSC	leukemic stem cells	leukemické kmenové buňky
MDSC	myeloid-derived suppressor cells	myeloidní supresorové buňky
MHCI	major histocompatibility complex I	hlavní histokompatibilní komplex I. třídy

MIC	MHCI polypeptide-related sequence	polypeptidová sekvence příbuzná MHCI
NCBI	National Center for Biotechnology Information	Národní centrum pro biotechnologické informace
NK	natural killer	přirozený zabíječ
NKT	NK T lymphocyte	NK T lymfocyt
PADRE	Pan HLA-DR reactive epitope	epitop vázající se na Pan HLA-DR
PAM	protospacer adjacent motif	motiv sousedící s <i>protospacerem</i>
pBS	plasmid BlueScript	plazmid BlueScript
PBS	phosphate buffered saline	fosfátový pufr
PD-1	programmed cell death protein 1	protein programované buněčné smrti 1
PDIA3	protein disulfide-isomerase A3	protein-disulfid izomeráza A3
PD-L1	PD-1 ligand	ligand PD-1
PLC	peptide loading complex	komplex proteinů umožňující navázání peptidu na MHC I
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium	médium vyvinuté v Roswell Park Memorial Institutu
SOC	super optimal broth with catabolite repression	super optimální médium s katabolickou represí
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3	přenašeč signálu a aktivátor transkripce 3
SDS-PAGE	sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného
s.c.	subcutaneously	subkutánně
TAA	tumor associated antigens	antigeny sdružené s nádory
TAP	transporter associated with antigen processing	přenašeč asociovaný se zpracováním antigenu
Tim-3	T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing 3	T-buněčný imunoglobulin obsahující mucinovou doménu 3
TIL	tumor-infiltrating lymphocyte	lymfocyty infiltrující nádory
TLR	Toll-like receptor	Toll-like receptor
TNF	tumor necrosis factor	faktor nádorové nekrózy
tracrRNA	trans-activating crRNA	transaktivační crRNA
Treg	regulatory T cells	regulační T lymfocyty
TSA	tumor specific antigens	nádorově specifické antigeny
ULBP	UL-16 binding protein	vazebný protein molekuly UL16
WB	western blot	western blot

1 Úvod

Nádorová onemocnění jsou v dnešní době celosvětově jednou z hlavních příčin úmrtí. V roce 2018 bylo v Evropě diagnostikováno odhadem 3,9 milionů nových pacientů a 1,9 milionů lidí z důvodu nádorového onemocnění zemřelo (Ferlay *et al.*, 2018).

Jedním z důvodů silné agresivity maligních onemocnění je schopnost nádorů uniknout imunitnímu systému. K tomu dochází různými mechanismy, přičemž jedním z nejdůležitějších je schopnost nádorových buněk snížit expresi proteinů hlavního histokompatibilního komplexu I. třídy (MHCI). Díky snížené expresi MHCI nejsou CD8⁺ T lymfocyty schopny nádorové buňky rozeznat a vést proti nim imunitní odpověď. Dle dostupných zdrojů dochází ke snížení exprese MHCI až u 90 % některých typů nádorů (Koopman *et al.* 2000, Angell *et al.* 2014). Z toho důvodů je potřeba mít k dispozici klinicky relevantní model nádorů s ireverzibilně sníženou expresí MHCI.

V dnešní době se rychle rozvíjí metody imunoterapie nádorů zaměřené na stimulaci imunitního systému pacientů, která vede k tomu, že imunitní systém je sám schopen reagovat na nádorové buňky a ničit je. Existuje několik typů imunoterapie, přičemž jedním z možných přístupů je využití DNA vakcinace. Mezi její největší výhody patří to, že při její aplikaci nedochází k riziku infekce, antigeny mohou být prezentovány jak na komplexu MHCI, tak na komplexu MHCII a při DNA vakcinaci dochází k aktivaci jak přirozené, tak adaptivní imunity (Yang *et al.* 2014).

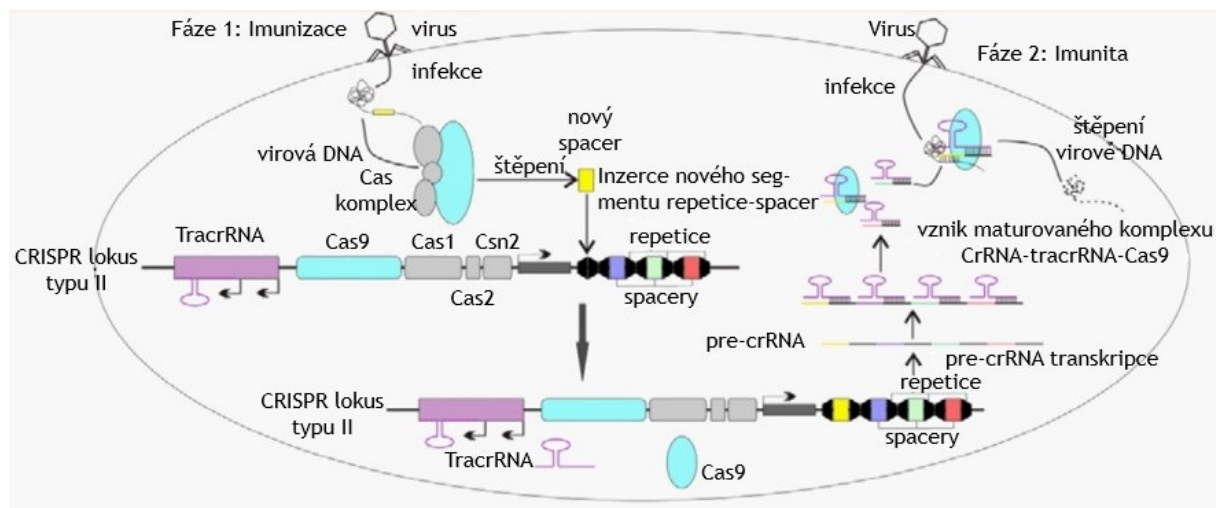
Cílem této diplomové práce bylo editací genové DNA pomocí systému CRISPR/Cas9 vytvořit modelovou nádorovou linii s ireverzibilní inaktivací β 2-mikroglobulinu (B2m), která povede ke ztrátě povrchové exprese MHCI. Po vytvoření této linie ji bylo třeba charakterizovat jak *in vitro*, tak *in vivo*, a to z hlediska růstových vlastností, onkogenicity a imunosenzitivity v syngenních myších za využití DNA vakcinace.

2 Literární přehled

2.1 Systém CRISPR

V dnešní době existuje spousta metod, jak léčit různá onemocnění. Na bakteriální nemoci máme antibiotika, na virová antivirotika a různé látky podporující imunitní systém, pro prevenci některých nemocí máme očkování, ale jeden typ onemocnění zůstává stále velkým problémem. Jde o genetická onemocnění způsobené mutacemi DNA, které je možné zvrátit editací genomu. Abychom toho byli schopni, potřebujeme účinný, efektivní a bezpečný nástroj. Jedním z nejslibnějších nástrojů dnešní doby se stal systém využívající segmentů nahromaděných pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetitiv (CRISPR).

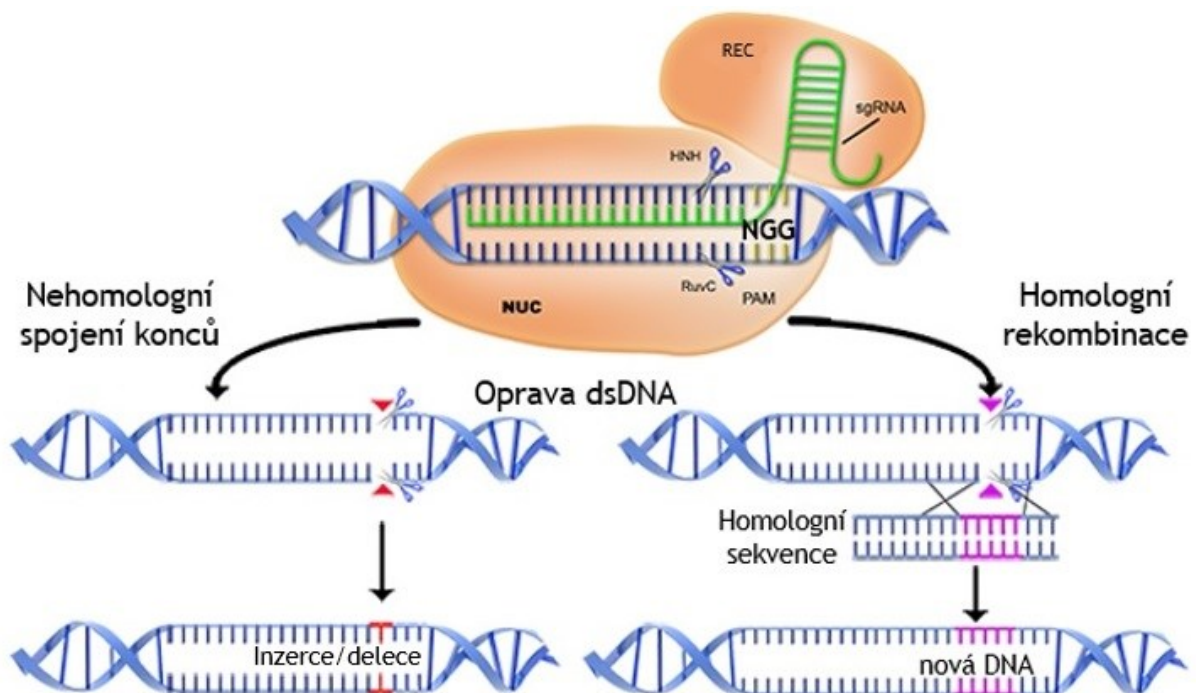
Systémy CRISPR pocházejí z bakterií a archeí a slouží jako forma adaptivní imunity. DNA z parazitů, především z bakteriofágů, kteří napadnou bakterii, je skladována v bakteriálním genomu v lokusu CRISPR po krátkých úsecích zvaných *spacery* mezi palindromickými repetitivami. Po transkripci vzniká CRISPR RNA (crRNA), na kterou se naváže endonukleáza a transaktivní crRNA (tracrRNA). Pokud dojde k reinfekci tím samým parazitem, crRNA v komplexu s nukleázou a crRNA na základě komplementarity bází rozpozná invadující nukleovou kyselinu a nukleáza ji degraduje (obr. 1). Aby komplex CRISPR/nukleáza rozeznal nukleovou kyselinu a degradoval ji, je důležité, aby na ní byl tzv. motiv sousedící s *protospacerem* (PAM) (Komor, Badran and Liu, 2017).



Obr. 1: Systém CRISPR/Cas9 a jeho role v adaptivní imunitě bakterií. Na obrázku je zobrazen CRISPR systém typu II. Převzato a upraveno (Zhao *et al.* 2014).

2.1.1 CRISPR/Cas9

Je známo několik systémů CRISPR/nukleáza. Pro editaci genové informace je nejčastěji využíván systém CRISPR/Cas9 pocházející z bakterie *Streptococcus pyogenes* a rozeznávající PAM sekvenci NGG. Pomocí single-guide RNA (sgRNA), což je fúzní RNA obsahující crRNA a tracrRNA, rozeznává komplementární sekvenci určenou k editaci. Nukleáza Cas9 je schopna přestříhnout dvouvláknovou DNA za vzniku tupých konců. Po přestřížení jsou vlákna opětovně spojena jedním ze dvou různých mechanismů. Prvním z nich je nehomologní spojení konců, které se děje s mnohem vyšší frekvencí. Při nehomologním spojení konců dochází k mutacím dané nukleové kyseliny – především delecím a insercím. Využívá se toho např. v případě inaktivace genů. Druhým mechanismem je homologní rekombinace, která se využívá v případě přesných editací genových sekvencí. Aby k ní došlo, je třeba, aby byla přítomna správná verze genu. Proto se při genetické manipulaci dodává i homologní sekvence, která zvýší pravděpodobnost homologní rekombinace a požadované editace nukleové kyseliny (Kick, Kirchner, and Schneider 2017; Komor, Badran, and Liu 2017; obr. 2).



Obr. 2: Genová editace pomocí CRISPR/Cas9. NUC – nukleáza. Převzato a upraveno (<https://www.quora.com/How-does-CRISPR-Cas9-work>).

2.1.1.1 Zvířecí modely

Technologie CRISPR/Cas9 se v dnešní době používá především na modifikaci genů zvířat a buněčných linií, které následně slouží jako modelové systémy pro nejrůznější onemocnění. Příprava zvířecích modelů je díky této technologii mnohem rychlejší, jednodušší a vysoce účinná. Zároveň je možné cílit více genů najednou a dosáhnout tak několikanásobných mutací (Wang *et al.*, 2013). CRISPR/Cas9 se hojně využívá ve výzkumu nádorových onemocnění. Produkce mutovaných zvířat je jednokroková a mutovány mohou být jak zárodečné, tak somatické buňky (Mou *et al.*, 2015). Například při přípravě modelů pro leukemická onemocnění se využívají hematopoetické kmenové buňky, do kterých jsou vneseny virové vektory s CRISPR/Cas9. Konkrétně byl pomocí CRISPR/Cas9 doručen v lentiviru do recipientních myší vytvořen model pro akutní myeloidní leukémii (Heckl *et al.*, 2014).

2.1.1.2 Léčba pomocí CRISPR/Cas9

Využití samotné této technologie pro cílenou léčbu je však náročné z důvodů možných *off-target* mutací. U myšičího modelu *retinitis pigmentosa* byla pomocí editace DNA systémem CRISPR/Cas9 určena bodová mutace zodpovědná za toto onemocnění. Pokus probíhal na myších zygotách. K homologní rekombinaci došlo u 36,4 % zygot (4/11), z nichž v 50 % došlo i k inzercím/delecím v místě integrace. K přesné integraci donorového templátu došlo u 2 myší a to u 35,7 % a 18,8 % somatických buněk. Vzniklé myši byly tedy mozaiky. I tato částečná oprava dané mutace byla dostatečná k obnovení funkce mutovaného genu (Wu *et al.*, 2016). Při následném celogenomovém sekvenování myší s editovaným genomem Schaefer *et al.* (2017) detekovali vysoké procento jednonukleotidových variant, které jsou dle autorů způsobené *off-target* mutacemi. Nicméně brzy po vydání článku vyšlo několik komentářů, ve kterých se jejich autoři shodují na tom, že metodika pokusu nebyla provedena správně a mutace nejsou způsobené editací pomocí CRISPR/Cas9, ale jde o varianty, které byly pravděpodobně přítomné v myšičím genomu již před samotnou editací (Kim *et al.*, 2018; Lescarbeau *et al.*, 2018; Wilson *et al.*, 2018).

2.1.1.3 Klinické studie

S lidskými buňkami upravenými pomocí technologie CRISPR/Cas9 právě probíhají první klinické pokusy. Výsledky I. fáze klinických testů přednesli Lu *et al.* (2018) na výročním setkání americké asociace pro výzkum rakoviny. Jejich výzkum je zaměřen na pacienty s nemalobuněčným plicním karcinomem exprimujícím ligand proteinu programované buněčné smrti 1 (PD-L1). Jako terapeutikum byly pacientům podány T lymfocyty s deletovaným genem kódujícím protein programované buněčné smrti 1 (PD-1) pomocí CRISPR/Cas9. Dle

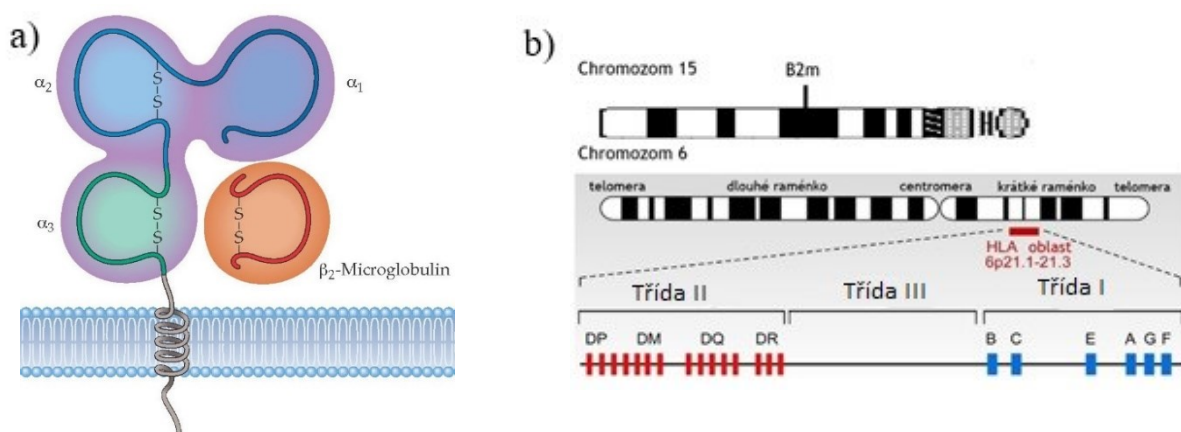
dosavadních výsledků se u pacientů objevily některé vedlejší účinky léčby jako horečka či dysfunkce jater, nicméně tyto účinky nebyly silné a proto tato léčba pokračuje (Lu *et al.*, 2018).

2.1.1.4 Editace embryí

Jedním z nejvíce kontroverzních využití této technologie je genová editace lidských embryí. Jelikož existují nemoci způsobené mutací jediného genu, jeho editace v prenatálním stádiu by mohla zabránit rozvoji onemocnění. Tang *et al.* (2017) provedli pomocí CRISPR/Cas9 editaci genomové DNA u lidských zygot s 2 prvojádry. Jejich cílem bylo opravit DNA s mutací způsobující β -talasémii a deficit glukózo-6-fosfát dehydrogenázy. U β -talasémie se jim podařilo dosáhnout editace DNA u 50 % embryí, z nichž u 50 % došlo k homologní rekombinaci. U deficitu glukózo-6-fosfát dehydrogenázy došlo k homologní rekombinaci u 100 % embryí, z nichž jedno bylo opraveno správně a z druhého se stala mozaika s částí buněk opravenou. Pokusy nebyly provedeny na dostatečném počtu vzorku, nicméně dosavadní výsledky jsou slibné.

2.2 B2m a MHCI

β 2-mikroglobulin (B2m) je glykoprotein hrající zásadní roli v imunitním systému. Jde totiž o lehký řetězec MHCI. Jeho hmotnost je 12 kD a jeho gen je lokalizován na chromozomu 15 (Faber *et al.*, 1976). Nekovalentně se váže k těžkému glykosylovanému α řetězci MHCI o molekulové hmotnosti 44-49 kD, jehož gen je lokalizován na chromozomu 6 (Lamm *et al.* 1974; obr. 3). B2m není glykosylován a není, narozdíl od α řetězce, polymorfní (Berggard and Bearn, 1968). Molekuly MHCI se nachází na všech jaderných buňkách lidského těla.



Obr. 3: Molekuly MHCI. a) Struktura MHCI skládající se z těžkého řetězce α a B2m. b) Umístění genů MHCI a B2m na chromozomech. Převzato a upraveno (<https://microbeonline.com/difference-mhc-class-mhc-class-ii-proteins>; Paschen *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2014).

Lidský MHC se nazývá lidský leukocytární antigen (HLA). Dělí se na klasické a neklasické MHCI molekuly. Mezi klasické patří HLA-A, HLA-B a HLA-C. Neklasických je mnoho, mezi hlavní se řadí HLA-E, HLA-F, HLA-G, proteiny diferenciační skupiny 1 (CD1), polypeptidová sekvence příbuzná MHCI (MIC) A, MICB a vazebný protein molekuly UL16 (ULBP). Liší se v zastoupení i ve funkci. Klasické MHCI izotypy jsou, narozdíl od těch neklasických, vysoce polymorfní (Kirszenbaum *et al.*, 1997). Pokud nebude řečeno jinak, budou dále popisovány klasické MHCI.

Myší MHC se nazývá H-2. Dělí se na izotypy klasické a neklasické. Mezi klasické se řadí H-2K, H-2D a H-2L. Mezi neklasické patří H-2M, H-2Q a H-2T (Stroynowski, 1990).

2.2.1 Funkce MHCI

MHCI molekuly na svém povrchu vystavují peptidy z intracelulárního prostředí. Jedná se o fragmenty proteinů vzniklé degradací v ubikvitin-proteazomální dráze. V ní jsou likvidovány především poškozené či špatně složené cytosolické proteiny, regulační proteiny, které již splnily svou funkci, defektní ribosomální produkty nebo virové proteiny v infikovaných buňkách. V případě procesu zkřížené prezentace dochází k vazbě exogenních antigenů MHCI molekulou. Peptidy navázané na klasické MHCI jsou prezentovány cytotoxickým CD8⁺ T lymfocytům, jejichž T-buněčné receptory jsou restringované na určitý typ komplexu MHCI s peptidem. Pokud je na MHCI navázán peptid, který imunitní systém nerozeznává jako tělu vlastní, CD8⁺ T lymfocyty zahájí imunitní reakci (Leone *et al.*, 2013). Zároveň hrají MHCI molekuly důležitou roli v přirozené imunitě, a to v reakci s přirozenými zabíječi (NK). Pro ty je důležitá samotná přítomnost MHCI, jelikož fungují jako ligandy inhibičních receptorů NK buněk (KIR). Pokud chybí, licencované NK buňky zahájí proti buňkám bez MHCI silnou cytotoxickou reakci (Moretta *et al.*, 2002). Funkce MHCI je tedy dvojího typu – homeostatická a obranná.

Funkce neklasických MHCI jsou rozličné. Například HLA-G se účastní především prenatální imunity (Kovats *et al.*, 1990) a HLA-E chrání buňky v případě poklesu exprese klasických MHCI před lyzí způsobenou NK buňkami (Lee *et al.*, 1998). Role MHCI v protinádorové imunitě je velmi důležitá. Skrze ně mohou být CD8⁺ T lymfocytům prezentovány nádorově specifické antigeny (TSA) a antigeny sdružené s nádory (TAA).

2.2.2 Tvorba komplexu MHCI

Komplex MHCI se skládá v endoplazmatickém retikulu (ER). α řetězec je kotranslačním transportem translokován do ER, kde je složen za pomoci chaperonů (kalnexin, protein vázající

imunoglobuliny (BiP)). Po připojení B2m se komplex naváže na komplex proteinů umožňující navázání na MHCI (PLC), který je zodpovědný za navázání vysokoafinních peptidů. Mezi proteiny PLC komplexu patří chaperon kalretikulin, protein-disulfid izomeráza A3 (PDIA3) a tapasin, skrze který je komplex připojen k přenašečům asociovaným se zpracováním antigenů (TAP1 a TAP2) (Springer, 2015). TAP proteiny přenáší do lumen ER peptidové fragmenty proteinů, které byly degradovány v proteazomu. Komplexy MHCI s navázanými peptidy jsou transportovány skrze Golgiho aparát na povrch buňky. Obecně se proteinům účastnícím se procesu tvorby komplexu MHCI-peptid říká komponenty mašinérie zpracovávající antigeny (APM) (Leone *et al.*, 2013).

2.2.3 MHCI v protinádorové imunitě

Role MHCI je v protinádorové imunitě zcela zásadní. Změna jeho exprese je jedním ze základních mechanismů úniku nádorů imunitnímu systému. Mezi další mechanismy patří například snížení až úplná ztráta TSA nebo TAA, vytvoření imunopresivního nádorového mikroprostředí, zvýšená produkce PD-1 na T lymfocytech a jeho ligandu PD-L1 produkovaného nádorovými buňkami, které po vazbě indukují apoptózu aktivovaných T lymfocytů atd. (Garcia-Lora, Algarra and Garrido, 2003; Blank, Gajewski and Mackensen, 2005; Kobayashi *et al.*, 2008). Ke změnám exprese MHCI dochází u některých typů nádorů až z 90 %. Jako příklad lze uvést nádory děložního čípku (90 %) (Koopman *et al.*, 2000), karcinomy jícnu (89 %) (Nie, 2001), papilární karcinomy štítné žlázy (89 %) (Angell *et al.*, 2014) či Hodgkinův lymfom (59 %) (Reichel *et al.*, 2015).

Změny povrchové exprese MHCI u nádorových onemocnění mohou být reverzibilní či ireverzibilní. Tyto změny jsou především důsledkem změn v expresi genů pro α řetězec MHCI, pro B2m či některou z komponent APM. V případě reverzibilního snížení může být exprese opět zvýšena pomocí cytokinů, např. interferonu gamma ($\text{IFN}\gamma$) či $\text{IFN}\alpha$ (Pereira *et al.* 2017). K ireverzibilním změnám dochází v důsledku strukturálních změn ve výše jmenovaných genech a pro obnovení exprese je nutná náhrada defektního genu (Browning *et al.*, 1996).

Mechanismů způsobujících změny exprese genů pro MHCI je celá řada. Níže jsou popsány nejčastější důvody těchto změn.

2.2.3.1 Reverzibilní změny exprese MHCI

Změny exprese MHCI mohou být způsobeny změnami v expresi genů kódujících MHCI nebo komponenty APM. U komponent APM může docházet ke změnám exprese např.

u β podjednotek imunoproteazomu zvaných proteiny s nízkou molekulární hmotností (LMP) (Shen *et al.*, 2007), u TAP proteinů, u kalretikulinu či PDIA3 (Pereira *et al.* 2017).

Reverzibilní změny jsou převážně způsobeny epigenetickými modifikacemi. U všech genů kódujících klasické HLA izotypy a stejně tak u genů kódujících komponenty APM dochází k hypermetylacím. Nejčastěji bývají hypermetylvány geny pro HLA-B. K metylacím dochází u genu pro α řetězec MHCI, a to konkrétně na 5' konci mRNA v blízkosti promotoru, což způsobuje transkripční umlčení genů. Metylaci je možno zvrátit dodáním demetylačního agens např. 5'-aza-2'-deoxycytidinu (Nie, 2001).

Dále může docházet k deacetylacím histonů, které opět vedou k transkripčnímu umlčení genů jak PLC komplexu, tak genů pro MHCI. Opětovného zvýšení exprese lze v takovém případě dosáhnout dodáním inhibitoru histonových deacetyláz, např. Trichostatinu A (Setiadi *et al.*, 2008). Pomocí IFN γ bylo dosaženo demetylace DNA MHCI a zároveň reacetylace histonu H3 (Vlková *et al.*, 2014).

Expresa HLA glykoproteinů může být ovlivněna také změnami exprese onkoproteinů, např. c-Myc, jehož zvýšená exprese koreluje se sníženou expresí MHCI. c-Myc je transkripční faktor, který je schopen vázat se v oblasti promotoru pro gen *HLA-B*. Svou vazbou pokryje TATA box a *upstream* signální sekvenci CCAAT, čímž promotor inaktivuje (Peltenburg and Schrier, 1994).

2.2.3.2 Ireverzibilní změny exprese MHCI

Ireverzibilní změny exprese jsou způsobeny strukturálními změnami v genech kódujících podjednotky MHCI. V případě těžkého řetězce MHCI může jít o ztráty celého chromozomu 6 způsobující úplnou ztrátu všech alel kódovaných na daném chromozomu, o vícečetné delece na chromozomu 6 vedoucí ke ztrátě konkrétních alel či například bodové mutace vedoucí ke vzniku předčasného STOP kodonu a produkci nefunkčního proteinu.

U genu *B2m* dochází často k inzerčním a delečním mutacím v exonu 1 a exonu 2. Doposud byly detekovány stovky konkrétních mutací u jednotlivých typů nádorů. Například u Burkittova lymfomu a melanomu byla detekována mutace v iniciačním kodónu ATG, kdy došlo k záměně G za C, resp. A za T, vedoucí k znemožnění zahájení translace, a tedy produkci funkčního proteinu. Taktéž může dojít ke změnám vedoucím ke tvorbě předčasného STOP kodonu, např. u melanomu byla detekována substituce C za G v sekvenci TCA nacházející se ve druhém exonu vedoucí ke vzniku TGA (Rosa *et al.*, 1983; Benitez *et al.*, 1998) nebo delece TTC v repetitivní sekvenci CTCTCTCTTCT (Perez *et al.*, 1999). Při detailnější analýze

kolorektálního karcinomu bylo detekováno několik typů mutací, jež všechny vedly ke změně čtecího rámce. Jednalo se o deleční či inzertní mutace, z nichž některé byly bialelické. V některých případech došlo ke ztrátě heterozygoty (Bernal *et al.*, 2011). Bialelické mutace se nachází i u Hodgkinova lymfomu. Zahrnují mutace v iniciačním kodónu ATG a delece a mutace v sestřihových místech. Tyto mutace vedou ke změnám čtecího rámce a ztrátě produkce B2m (Reichel *et al.*, 2015).

Pokud je ireverzibilně poškozen gen *B2m*, MHC molekuly se akumulují v cytoplazmě a nedochází k jejich přesunu na povrch buňky. Při dodání funkčního B2m dochází k obnovení povrchové exprese MHCI (Pereira *et al.* 2017).

2.2.3.3 Dopady změněné exprese MHCI

Vliv změněné exprese MHCI na postup nemoci, celkové přežití a recidivitu není jednotný, liší se v závislosti na typu nádorového onemocnění a stádiu nemoci.

U endometriálního karcinomu, karcinomu plic či kolorektálního karcinomu koreluje snížená exprese MHCI se zhoršenou prognózou (Kikuchi *et al.*, 2007; Bijen *et al.*, 2010; Simpson *et al.*, 2010) a to především u nádorů s reverzibilním snížením MHCI. Je tomu tak proto, že nedostatečná exprese MHCI nedokáže stimulovat CD8⁺ T lymfocyty k imunitní odpovědi, nicméně exprese je dostatečná k tomu, aby nedošlo k aktivaci NK buněk (Watson *et al.*, 2006).

Při úplné ztrátě exprese HLA glykoproteinů, ke které u ireverzibilních změn exprese často dochází, mohou být nádorové buňky atakovány NK buňkami, což vede ke zlepšení prognózy (Villegas *et al.*, 2002). Například u karcinomu prsu je ireverzibilní snížení MHCI spojeno s lepší prognózou (Reichel *et al.*, 2015). U Hodgkinova lymfomu Madjd *et al.* (2005) detekovali korelaci ireverzibilního snížení MHCI s lepší prognózou, nicméně v novější studii Hodgkinova lymfomu je snížená exprese MHCI spojena naopak s horší prognózou onemocnění (Roemer *et al.*, 2016). Může to být způsobeno tím, že v první studii určili mutace jako ireverzibilní, ale ve druhé studii jejich reverzibilita nebyla specifikována. Mohlo se tedy jednat o mutace reverzibilní, které jsou spojovány s horší prognózou. Navzdory tomu Pereira *et al.* (2017) u pacientů s nádory plic nenašli žádnou korelaci mezi inaktivací B2m a recidivitou či celkovým přežitím.

Naproti tomu byla u pacienta s agresivním melanomem pozorována postupná ztráta exprese MHCI zapříčiněná ireverzibilní mutací v genu *B2m*. Prvně se mutace projevila u metastaticky postižených uzlin, kdy exprese MHCI i B2m byla heterogenní. Metastáze odebraná od pacienta o 10 měsíců později se při imunohistochemické analýze ukázala být heterogenní pro MHCI

a zcela negativní pro B2m. Za ztrátu B2m byla zodpovědná stejná mutace jako za prvotní ztrátu exprese B2m, a to bodová substituce G za T v kodonu 67 v exonu 2 vedoucí ke vzniku předčasného STOP kodonu. Kombinace snížené exprese MHCI, nízké infiltrace CD8⁺ T lymfocyty a CD56⁺ NK buněk, vedla ke vzniku rychle se rozvíjejícího velmi agresivního typu melanomu (Campo *et al.*, 2014).

Tak jako u výše zmíněného melanomu, obecně je infiltrace nádorů NK buňkami nízká a nebyla prokázána pozitivní korelace mezi ztrátou exprese MHCI a zvýšenou infiltrací nádorů CD56⁺ NK buňkami (Sandel *et al.* 2005, Bernal *et al.* 2011, Kikuchi *et al.* 2007). Ztráta či snížení klasických MHCI izotypů může být doprovázena zvýšenou expresí MHCI izotypů neklasických, které poté brání aktivaci NK buněk. Nádorové buňky mohou navíc pozměňovat expresi aktivačních receptorů NKG2D na NK buňkách a jejich ligandů, např. MICA, který v sérové formě u hepatocelulárního karcinomu značí zhoršenou prognózu (Li *et al.*, 2013).

Co se týče infiltrace nádorů s pozměněnou expresí MHCI lymfocyty, je pravděpodobně rozdílná u různých typů nádorů. V případě kolorektálního karcinomu a gastrointestinálního karcinomu nebyla detekována signifikantně pozměněná infiltrace T lymfocyty (Bernal *et al.* 2011, Janikovits *et al.* 2018), zatímco u papilárního karcinomu štítné žlázy byla v případě snížené/chybějící exprese MHCI zároveň nižší hladina CD3⁺ i CD8⁺ T lymfocytů (Angell *et al.*, 2014). Snížená infiltrace CD8⁺ T lymfocytů byla mimo jiné detekována též u nemalobuněčných karcinomů plic a melanomů (Pereira *et al.* 2017, Kikuchi *et al.* 2007, Campo *et al.* 2014).

2.3 Nádorová imunoterapie

Podle Světové zdravotnické organizace jsou nádorová onemocnění celosvětově druhou nejčastější příčinou úmrtí (Plummer *et al.*, 2016). Z toho důvodu je třeba hledat co nejúčinnější způsoby léčby.

Hlavními prostředky léčby nádorů jsou radioterapie, chemoterapie a chirurgické odstranění nádoru. Tyto metody však většinou nejsou dostatečné. V současnosti se vyvíjí imunoterapeutická léčba maligních onemocnění, která pomáhá imunitnímu systému pacienta, aby byl schopný s nemocí bojovat. Některá imunoterapeutická léčiva se již běžně používají a spousta jich právě prochází klinickými testy. Mezi imunoterapeutika se řadí léčba protilátkami, z nichž speciální skupinu tvoří protilátky cílící na imunitní kontrolní body, dále adoptivní přenos buněk, cytokinová léčba, léčba s využitím bakterií – konkrétně bakterie *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) – a různé typy vakcinace.

Jedním z nejdůležitějších imunoterapeutických přístupů je využití monoklonálních protilátek. U protilátek je důležitá jejich specifita. V ideálním případě by měly být specifické pro TSA, ale ne všechny nádory mají opravdu specifické antigeny, proto je možné například využití TAA, jež jsou oproti pacientovým buňkám exprimovány na povrchích nádorových buněk ve zvýšené míře. Tyto protilátky jsou účinné jen u některých typů nádorů a používají se v kombinaci s jinými typy léčby, většinou s chemoterapií. Jednou z nich je protilátka proti receptoru epidermálního růstového faktoru (α EGFR). Po navázání protilátky dochází k zablokování MAP kinázové a Akt signalizace, což vede u nádorových buněk k apoptóze a tudíž k inhibici růstu nádorů (Perez-Torres *et al.*, 2006). Hlavními efektorovými buňkami zodpovědnými za účinek α EGFR jsou Kupferovy buňky – makrofágy nacházející se v játrech, které jsou schopné fagocytovat cirkulující nádorové buňky označené protilátkou v závislosti na Fc receptorech Fc γ RI a Fc γ RIV. Nicméně Kupferovy buňky nejsou schopné zničit již ustanovené metastáze (Gül *et al.*, 2014). Dnes jsou dostupné dvě komerční protilátky proti EGFR – Cetuximab a Panitumumab. Původně byly určeny pro léčbu kolorektálního karcinomu, přičemž jejich účinek je limitován pouze na nádory s nemutovaným proteinem Ras (Douillard *et al.*, 2013; Van Cutsem *et al.*, 2015). Cetuximab byl také testován např. u nádorů hlavy a krku, kde se setkal s rozporupnými výsledky (Vermorken *et al.* 2014, Ang *et al.* 2014). Možná je to právě rozdílnou expresí proteinu Ras, nebo se pacienti zahrnutí do studií lišili v jiném znaku ovlivňujícím účinek léčby. U karcinomu žaludku nedochází po přidání α EGFR ke klasické léčbě ke klinické odpovědi (Lordick *et al.* 2013). Další používané protilátky jsou například Bevacizumab, která cílí na růstový faktor cévního endotelu (Cui *et al.*, 2013) nebo Pertuzumab a Trastuzumab cílící na receptor pro lidský epidermální faktor 2 (HER2/neu) (Swain *et al.*, 2015).

Mezi protilátky blokující kontrolní imunitní body se řadí především protilátka proti antigenu 4 asociovanému s cytotoxickými T lymfocyty (α CTLA-4), proti PD-1 (α PD-1), proti PD-L1 (α PD-L1) a proti T-buněčnému imunoglobulinu obsahujícímu mucinovou doménu 3 (α Tim-3) (viz 2.3.1.2).

Adoptivní transfer buněk využívá autologních buněk odebraných z nádoru, kultivovaných a modifikovaných či stimulovaných *in vitro* a navracených zpátky do pacienta. Nejúčinnějším typem adoptivního transferu buněk je léčba metastazujícího melanomu pomocí lymfocytů infiltrujících nádory (TIL), kde může docházet ke kompletní a trvající regresi nádoru. TIL jsou získány přímo z melanomu. Odebrané lymfocyty mohou být poté testovány v kokultivačním testu s nádorovými buňkami a ty nejreaktivnější jsou namnoženy za přítomnosti IL-2

a ozářených mononukleárních buněk a vráceny zpět do pacienta (Rosenberg and Restifo, 2015). Ke klinické odpovědi dochází u 40 – 50 % pacientů (Radvanyi *et al.*, 2012; Besser *et al.*, 2013). Další možností využití adoptovního transferu buněk je vložení T-buněčného receptoru nebo chimerického antigenního receptoru (CAR) a zároveň antigenu, který má být rozeznáván na nádorových buňkách, do TIL. Důležitým kritériem je vhodný výběr antigenu, jinak může docházet k cytotoxicitám jako vedlejším efektu léčby (Rosenberg and Restifo, 2015).

K cytokinové léčbě se řadí například použití IL-2 či IFN. IL-2 se využívá v léčbě metastazujícího melanomu a u nádorů ledvin. Pacienti odpovídající na léčbu mají delší celkové přežití (Hughes *et al.*, 2015). Účinek samostatně používaných IFN není dostatečně silný, proto se na myším modelu hepatocelulárního karcinomu testovala kombinace lokálního podání IFN α a IFN λ po chirurgickém odstranění nádoru, která vedla ke kompletní remisi. Tohoto efektu bylo dosaženo zvýšenou infiltrací NK buněk do nádoru. Tyto NK buňky zároveň vykazovaly zvýšenou cytotoxickou aktivitou, nicméně po léčbě nedošlo k ustanovení paměťových buněk (Lasfar *et al.*, 2016). Dalším cytokinem využívaným v nádorové imunoterapii karcinomů slinivky břišní a melanomů je například kolonie stimulující faktor granulocytů a makrofágů (GM-CSF) (Annels *et al.*, 2014; Lawson *et al.*, 2015).

Co se týče léčby pomocí bakterií, tak díky BCG se již v roce 1976 podařilo vyléčit prvního pacienta s nádorem močového měchýře (Morales, Eidinger and Bruce, 1976). Od té doby se použití této metody rozšířilo a dnes je zcela běžnou součástí léčby tohoto typu nádoru. Nevýhodou je, že k dosažení terapeutického efektu se používá infekce živou BCG, což může způsobovat nežádoucí vedlejší efekty léčby (Asín *et al.*, 2014). Z toho důvodu se hledá náhradní řešení, které by nemuselo zahrnovat infekci živou bakterií. Jedním ze způsobů je vytvořit rekombinantní bakterii produkující Th1 cytokiny. Další možností je použít mrtvé bakterie, či jejich část, která by byla schopná stimulovat imunitní systém k protinádorové odpovědi (Kawai *et al.*, 2013).

Pro efektivní protinádorovou vakcínu je zcela zásadní výběr správného antigenu. Většinou se jedná o TAA, nicméně v takovém případě může docházet k selekci nádorových buněk, které TAA neexprimují, nebo ho exprimují ve snížené míře. U peptidových vakcín je možné využívat pro vakcinaci kombinaci více peptidů odvozených od TAA, které poté indukují T buněčnou odpověď specifickou pro několik antigenů. Tento postup je v klinických studiích testován v léčbě glioblastomu, nádorech ledvin a kolorektálním karcinomu. Zvýšení účinnosti peptidových vakcín může být dosaženo navázáním peptidu na dendritické buňky *ex vivo* či *in vivo*. Dalšími typy vakcinace jsou například DNA a RNA vakcíny. DNA vakcinace vykazují

slibné výsledky v myším modelu, ale u primátů a lidí se tyto slibné výsledky zatím nepotvrdily a je proto třeba pracovat na způsobu jejich vylepšení (Tagliamonte *et al.*, 2014).

2.3.1 DNA vakcíny

Jak již bylo výše zmíněno, jedním ze slibných imunoterapeutických přístupů v léčbě rakoviny je DNA imunizace. Její hlavní výhody tkví v jednoduchosti, bezpečnosti a nižších nákladech v porovnání s jinými typy vakcinace. DNA je do těla vpravena v podobě plazmidu obsahujícího konkrétní antigen/antigenní část, na který by měl reagovat imunitní systém. Některé savčí buňky jsou schopné po transfekci dlouhodobě exprimovat geny kódované plazmidovou DNA. Po DNA vakcinaci dochází k aktivaci buněčné i humorální imunitní odpovědi proti danému antigenu.

Nejčastěji jsou DNA vakcíny do těla vnášeny intradermálně či intramuskulárně. Při intradermální vakcinaci dochází k transfekci keratinocytů a Langerhansových buněk. Langerhansovy buňky jsou nematurované dendritické buňky. Po transfekci zpracují dendritické buňky antigen, putují do lymfatické uzliny a zde skrze MHCI prezentují antigeny CD8⁺ T lymfocytům. Při intramuskulární vakcinaci jsou transfekovány myocyty. Z transfekovaných buněk se mohou uvolňovat antigeny, které jsou pozřeny buňkami prezentujícími antigen (APC), jež poté tyto antigeny prezentují přes MHCII CD4⁺ T lymfocytům. Případně může dojít k procesu zkřížené prezentace a vystavení antigenu přes MHCI. Jelikož plazmidy jsou bakteriálního původu, aktivují také přirozený imunitní systém. Intracelulární DNA aktivuje DNA senzory – např. DNA dependentní aktivátor faktorů regulovaných IFN (DAI) či extrachromosomální histon H2B, což vede k aktivaci faktoru regulujícího interferony 3 (IRF3) a produkci IFN. Bakteriální DNA, resp. v ní obsažené imunostimulační CpG motivy, dále aktivují Toll-like receptor 9 (TLR9) vedoucí k aktivaci IRF7 a opět k produkci IFN. Cytokinová produkce přitahuje další buňky imunitního systému jako jsou T a B lymfocyty (Yang *et al.* 2014).

Důležitým kritériem pro účinnost DNA vakcín je způsob aplikace vakcíny. DNA vakcínu je možno podávat například injekčně, genovou pistolí, elektroporací, případně tetovací jehlou (Best *et al.*, 2009; DeMuth *et al.*, 2013). Při intradermální vakcinaci genovou pistolí dochází k doručení vakcíny přímo do APC. Plazmidová DNA je při použití genové pistole navázána na částičky zlata a dochází k jejímu uvolnění při aplikaci vakcíny stlačeným héliem. Při elektroporaci dochází k narušení buněčné membrány, což vede k jednoduššímu vniknutí DNA

do buňky. Zároveň při elektroporaci dochází v místě aplikace ke vzniku zánětu, což přitahuje APC (Yang *et al.*, 2014).

DNA vakcinace již byla hojně testována v preklinických a v počátečních klinických studiích. Jako příklad konkrétní studie lze uvést myší pokusy u metastazujícího karcinomu prsu, kdy po aplikaci DNA vakcinace byly detekovány protilátky proti zvolenému antigenu. Šlo o protilátky typu IgG2a a IgG2b, skrze které dochází k cytotoxicitě způsobené protilátkami, za kterou jsou zodpovědné NK buňky. Díky vakcinaci došlo ke zmenšení primárních nádorů a úbytku metastáz co do počtu i velikosti v porovnání s kontrolními myšmi (Witt *et al.*, 2018). U myšího modelu mnohočetného myelomu hrály po vakcinaci hlavní úlohu CD8⁺ cytotoxické T lymfocyty, které byly schopné nádorové buňky cytolyticky ničit (Joseph-Pietras *et al.*, 2010).

Při testování DNA vakcinace v klinických studiích cílených na karcinoembryonální antigen byla u 37 % pacientů detekována specifická T buněčná odpověď, přičemž tyto T lymfocyty produkovaly IFN γ . Zároveň byl detekován dočasný úbytek karcinoembryonálního antigenu u 50 % pacientů. Vakcína se ukázala být bezpečná, působící jen lehké vedlejší příznaky, které korelovaly s lepší odpovědí na léčbu. Nicméně klinické dopady nebyly signifikantní (Alberts *et al.*, 2008). U metastazujícího prsního karcinomu ze začátku nedošlo k jednotné indukci T buněčné imunitní odpovědi specifické pro peptid, ač pozdější výsledky u pacientů, kteří na léčbu odpovídali pozitivně, ukazují na signifikantní zvýšení T lymfocytů specifických proti testovanému peptidu HER2/neu. Přeživší pacienti rovněž vykazovali dlouhodobou protilátkovou odpověď (Norell *et al.*, 2010).

Nejúspěšnější je DNA vakcinace proti nádorům způsobeným viry, jelikož u většiny nádorů se mezi TAA řadí vlastní proteiny – poškozené, se změněnou expresí atd. a je obtížnější na ně cílit tak, aby nedošlo k poškození vlastních buněk exprimujících dané TAA. Virové onkoproteiny jsou však cizorodými antigeny. Například ve studii, ve které byla použita DNA vakcinace cílená proti onkoproteinům E6 a E7 lidského papilomaviru 16 (HPV16) a HPV18 v kombinaci s elektroporací pro léčbu karcinomu děložního čípku, Kim *et al.* (2014) prokázali zvýšenou produkci IFN γ , který byl produkován jak specifickými CD8⁺ cytotoxickými T lymfocyty, tak CD4⁺ pomocnými T lymfocyty. Díky DNA vakcinaci došlo k indukci Th1 odpovědi a produkci cytokinů jako je IL-2 a faktor nádorové nekrózy α (TNF α). Po 36 týdnech od první vakcinace bylo 78 % (7 z 9) pacientek bez lézí na čípku, přičemž klinický výsledek koreloval s indukci polyfunkčních T lymfocytů.

Obecně se dá říct, že v preklinických studiích DNA imunizace prokázala slibné výsledky a v klinických studiích sice došlo k potvrzení bezpečnosti a možnosti opakovaného podání, nicméně efektivita nebyla příliš vysoká. Proto je vhodné DNA vakcinaci kombinovat s adjuvancii a zvážit neefektivnější způsob podání. Jako adjuvancia je možno využít například látky stimulující imunitní systém nebo protilátky, které inhibují imunosupresivní buněčné mechanismy či přímo blokují imunosupresivní buňky.

2.3.1.1 Imunostimulační látky

2.3.1.1.1 Stimulace imunitní odpovědi pomocí CpG oligodeoxynukleotidů

Syntetické CpG oligonukleotidy obsahují nemetylovaný CpG motiv (CpG ODN). Jelikož CpG u eukaryot jsou klasicky metylované, eukaryotická buňka je schopná tyto motivy skrze TLR9 rozeznat jako cizorodé. CpG motiv působí jako signál nebezpečí a skrze aktivaci TLR9 vede k produkci prozánětlivých cytokinů jako jsou IL-1, IL-6, IL-18 a TNF a zároveň aktivuje Th1 imunitní odpověď projevující se produkcí IFN γ a IL-12. TLR9 jsou převážně exprimovány B lymfocyty, které maturují v plazmatické buňky produkující protilátky a plasmacytoidními dendritickými buňkami, skrze které dochází k aktivaci, maturaci a proliferaci NK buněk, T lymfocytů a monocytů/makrofágů (Klinman, 2004). Aby syntetické CpG ODN nebyly degradovány nukleázami, v jejich cukrfosfátové kostře bývá modifikována fosfátová vazba – dochází k nahrazení atomu kyslíku sírou za vzniku fosforothioátů (Krieg, Yi and Hartmann, 1999).

Existuje celá škála syntetických CpG ODN, jejichž mechanismy účinku se mohou lišit. Reiniš *et al.* (2006) prokázali, že CpG ODN1826 dokáže efektivně zpomalit vznik a růst nádorů způsobených buňkami transdukovanými onkoproteiny E6 a E7 (HPV16), a to jak u nádorů s vysokou expresí MHCI, tak u nádorů s reverzibilně sníženou expresí MHCI. Naproti tomu CpG ODN1585 dokázal zpomalit růst pouze u nádorových buněk s reverzibilně sníženou expresí MHCI. Hlavní úlohu ve zpomalení růstu nádorů hrály NK1.1⁺ buňky. CpG ODN1826 má silný účinek mimo jiné při kombinaci s chemoterapií (Jordan and Waxman, 2016). Dalším příkladem, kdy jsou CpG ODN v kombinační terapii účinné, jsou konjugáty CpG s antisense oligonukleotidy přenašeče signálu a aktivátoru transkripce 3 (STAT3) (Moreira *et al.*, 2018).

CpG ODN byly úspěšně použity při imunoterapii mnoha typů nádorů u myši. Jako příklad je možno uvést melanomy a kolorektální karcinom, kdy v obou případech došlo k inhibici růstu plicních metastáz (Kim *et al.*, 2009). Syntetické oligonukleotidy jsou testovány i v klinických studiích, např. v kombinované léčbě nemalobuněčného karcinomu plic (Smith *et al.*, 2014), u kolorektálního karcinomu (Chan *et al.*, 2015) či u melanomu (Ribas *et al.*, 2018). Účinek CpG

ODN je testován i v kombinované terapii s dalšími látkami. Léčba je většinou dobře tolerována. Jednou z kombinačních terapií je například spojení adjuvantních CpG ODN s dendritickými buňkami s navázaným polypeptidem/proteinem E7 HPV16, kdy se adjuvantní účinek CpG ODN projevuje zvýšením protinádorového účinku (Wang *et al.*, 2014). Také při kombinaci s DNA vakcinací došlo ke snížení růstu nádorů (Smahel *et al.*, 2011).

2.3.1.1.2 Stimulace imunitní odpovědi pomocí α -galaktosyl-ceramidu
 α -galaktosyl-ceramid (GalCer) je glykolipid, který je hlavním aktivátorem NKT buněk typu I. NKT buňky rozeznávají GalCer přes jednu z neklasických molekul MHC I – CD1d. NKT buňky hrají důležitou roli v imunitním systému, jelikož jsou schopné aktivovat jak přirozenou, tak adaptivní imunitu a zároveň dokáží aktivovat jak Th1, Th2, tak i Th17 imunitní odpověď. Produkují značné množství cytokinů jako například IFN γ , IL-2, IL-4, IL-10, IL-13, IL-17, IL-21, IL-22, TNF α nebo GM-CSF, kterými aktivují NK buňky, T lymfocyty a B lymfocyty a přispívají k aktivaci a maturaci dendritických buněk.

Protinádorový efekt je zajištěn buď skrze přímou lytickou aktivitu NKT buněk, které produkují perforin a granzym B, nebo aktivací a rekrutací ostatních imunitních buněk. Nádory nejsou příliš infiltrované NKT buňkami, proto se GalCer nevyužívá jako samostatná léčba, ale jako adjuvans aktivující další imunitní buňky (Robertson, Berzofsky and Terabe, 2014). Jeho efekt byl například testován v kombinaci s peptidem odvozeným od antigenu nádorů varlat NY-ESO-1, kdy dendritické buňky byly pulzovány peptidem i GalCer. U 37,5 % (3 z 8) pacientů došlo ke zvýšení množství periferních NKT buněk a zároveň ke zvýšení množství IFN γ . Klinická studie, kterou vedl Gasser *et al.* (2018), prokázala v tomto vakcinačním schématu bezpečnost používání GalCer jako adjuvans.

2.3.1.2 Inhibice imunosupresivních mechanismů

2.3.1.2.1 Inhibice vazby PD-1 k PD-L1

Jedněmi z nejvýznamějších blokačních protilátek, které se využívají v protinádorové imunoterapii, jsou α PD-1 a α PD-L1. PD-1 je ve zvýšené míře exprimován na aktivovaných T a B lymfocytech. PD-L1 je konstitutivně exprimován v lymfoidních orgánech na APC, na rezidentních makrofázích a v privilegovaných orgánech (placenta, sítnice, slinivka břišní). Po stimulaci cytokiny, např. IFN či TNF, je možno nalézt inducibilní expresi na většině imunitních buněk jako jsou T lymfocyty, B lymfocyty, NK buňky, dendritické buňky a monocyty/makrofágy a také na epiteliích či endoteliích. Interakce PD-1 a PD-L1 funguje imunosupresivně, hraje roli v udržování periferní tolerance a tlumí jak přirozenou imunitu tím,

že v dendritických buňkách snižuje produkci prozánětlivých cytokinů, tak adaptivní imunitu tím, že inhibuje proliferaci aktivovaných T lymfocytů a limituje signalizaci skrze T receptory (Yao and Chen, 2014). Zvýšená exprese PD-1 na T lymfocytech zároveň koreluje se zvýšenou pravděpodobností mutací B2m u nádorových buněk (Janikovits *et al.*, 2018).

V nádorech dochází často ke zvýšené produkci PD-L1, které pak skrze PD-1 na aktivovaných T lymfocytech inhibují protinádorovou odpověď. Z toho důvodu je PD-1/PD-L1 interakce důležitým imunitním kontrolním bodem. Zvýšená exprese PD-L1 *in vitro* je zodpovědná za sníženou schopnost T lymfocytů cytotoxicky ničit dané buňky. V *in vivo* myším modelu zvýšená exprese koreluje se zvýšenou tumorigenezí i invazivností. Po dodání α PD-L1 dochází k dočasnému zastavení růstu nádorů (Iwai *et al.*, 2002). Klinické studie s α PD-1 zvanou Nivolumab byly provedeny u různých druhů karcinomů, např. u melanomů (Topalian *et al.*, 2014), nemalobuněčného karcinomu (Borghaei *et al.*, 2015), metastazujícího karcinomu jater (Motzer *et al.*, 2015), karcinomu ovarií (Hamanishi *et al.*, 2015) či Hodgkinova lymfomu (Ansell *et al.*, 2015). Dle těchto testů je terapie touto protilátkou většinou dobře snášena, avšak objevují se vedlejší efekty. Při porovnání s dosud užívanými léčivy dochází k lepší odpovědávosti pacientů na léčbu a prodloužení délky přežití. Nicméně k těmto pozitivním výsledkům dochází pouze u menší části pacientů, většinou kolem 20 %. Nivolumab je schválen americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) pro léčbu některých typů melanomů, karcinomů plic, nádorů ledvin, Hodgkinova lymfomu, karcinomů močového měchýře, nádorů hlavy a krku, kolorektálního karcinomu a hepatocelulárního karcinomu (<https://medlineplus.gov/druginfo/meds/a614056.html>).

Jedním z důvodů nízké odpovědávosti pacientů na léčbu α PD-1 je to, že při blokaci PD-1 receptoru dochází ke zvýšené expresi jiných imunitních kontrolních bodů. Nejdůležitějším se zdá být zvýšená exprese Tim-3 (viz 2.3.1.2.2) na CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocytech infiltrujících nádory a to převážně na buňkách vázajících α PD-1 (Koyama *et al.*, 2016). Právě buňky pozitivní na PD-1 a zároveň na Tim-3 jsou konkrétně u nádorů hlavy a krku ty nejvíce dysfunkční. K tomuto zvýšení dochází jak *in vitro*, tak *in vivo*. Kombinace α PD-1 s α Tim-3 vede u myšího modelu k vyššímu protinádorovému účinku a signifikantnímu zpomalení růstu nádorů v porovnání se samotnou α PD-1 (Shayan *et al.*, 2017). V kombinaci α PD-1 a α Tim-3 s radioterapií bylo u myšího modelu gliomu dosaženo celkového přežití u 100 % myší (Kim *et al.*, 2017). Imunoterapie s α PD-1 byla použita i v kombinaci s chemoterapií a CpG ODN (viz 2.3.1.1.1), kdy u myšího modelu u všech nádorů došlo k regresi nádorů alespoň o 80 % (Silvestrini *et al.*, 2016). Při kombinaci s DNA vakcinací dochází ke zvýšení protinádorového

efektu oproti samotné DNA vakcíně (Rekoske *et al.*, 2015). To bylo prokázáno i v klinické studii zabývající se nádory hlavy a krku (Aggarwal *et al.*, 2018).

2.3.1.2.2 Blokace Tim-3

Jedním z novějších a velmi slibných cílů blokačních protilátek je protein Tim-3. Tim-3 je exprimován na mnoha buňkách imunitního systému a to například na CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocytech (Li *et al.*, 2012), regulačních T lymfocytech (Treg) (Bu *et al.*, 2016), makrofázích (Yan *et al.*, 2015), NK buňkách (L. Xu *et al.*, 2015) či žírných buňkách (Phong *et al.*, 2015). Také se hojně vyskytuje na TIL a periferních CD8⁺ T lymfocytech pacientů s nádorovým onemocněním (B. Xu *et al.*, 2015). Jeho funkce je rozličná v různých buňkách a je závislá na okolních faktorech a také na ligandu, který se na něj váže. Zatím byly identifikovány 4 ligandy Tim-3 – galektin 9, protein 1 vysoce mobilních proteinů známý jako HMGB1, buněčná adhezivní molekula 1 karcinoembryonálního antigenu známá jako CEACAM1 a fosfatidylserin. Tim-3 hraje roli v indukci periferní tolerance. Skrze vazbu galektinu 9 indukuje Tim-3 apoptózu Th1 lymfocytů (Du *et al.*, 2017). Vyšší exprese Tim-3 koreluje s nižší expresí IFN γ (Xu *et al.*, 2015).

Tim-3 je exprimován na povrchu myeloidních leukemických kmenových buněk (LSC), přičemž na klasických hematopoetických kmenových buňkách exprimován není (Jan *et al.*, 2011). Zároveň u akutní myeloidní leukémie je zvýšená exprese jednoho z ligandů Tim-3 – galektinu 9. Tim-3 je u tohoto onemocnění zodpovědný za sebeobnovující funkci LSC, čímž hraje roli v progresi onemocnění. Blokace galektinu 9 narušující funkci Tim-3 vedla k blokaci sebeobnovy LSC (Kikushige *et al.*, 2015).

Na NK buňkách slouží Tim-3 jako marker jejich aktivace a maturace (Ndhlovu *et al.*, 2012). U plicního adenokarcinomu dochází u NK buněk ke zvýšení exprese Tim-3, přičemž tato zvýšená exprese koreluje s kratším přežitím, s vyšším výskytem metastáz v lymfatických uzlinách a s vyšším nádorovým stádiem. α Tim-3 zvyšuje u NK buněk cytotoxicitu a produkci IFN γ (Xu *et al.*, 2015).

U žírných buněk zvyšuje Tim-3 jejich degranulaci a pozitivně reguluje produkci cytokinů, především IL-6. (Phong *et al.*, 2015).

U makrofágů byla prokázána spojitost zvýšené exprese Tim-3 a polarizace na méně imunogenní typ makrofágů M2, což je hlavní typ makrofágů infiltrujících nádory. Tim-3 reguluje polarizaci makrofágů skrze produkci cytokinů, hraje roli ve snížení produkce IL-12 a naopak zvýšení produkce IL-6, IL-10 a GM-CSF. Zvýšená exprese Tim-3 skrze ovlivnění polarizace makrofágů

podporuje růst hepatocelulárního karcinomu, jak bylo prokázáno u myšího modelu (Yan *et al.*, 2015).

Zvýšená exprese Tim-3 se objevuje též u Treg infiltrujících nádory, kde u ovariálního karcinomu koreluje s velikostí nádorů. Tyto Treg jsou více imunosupresivní než Treg z periferní krve, což se projevuje zvýšenou expresí IL-10. Aplikace α Tim-3 je schopna zvrátit zvýšenou inhibiční aktivitu Treg vůči CD8⁺ T lymfocytům a snížit produkci IL-10 (Bu *et al.*, 2016).

U vracejících se lidských nádorů hlavy a krku, případně u nádorů hlavy a krku u pacientů původně léčených radioterapií či chemoterapií, byla detekována zvýšená exprese Tim-3 spojená s vyšším výskytem metastáz v lymfatických uzlinách. Pomocí α Tim-3 bylo možné změnit poměr CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocytů vůči myeloidním supresorovým buňkám (MDSC) ve prospěch CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocytů, čímž došlo ke zvýšení efektorových T lymfocytů mající za následek inhibici růstu nádorů. Snížení MDSC bylo způsobeno snížením množství chemokinu CXCL1, k čemuž došlo právě po blokaci Tim-3 (Liu *et al.*, 2017).

2.3.1.2.3 Deplece T reg pomocí protilátky proti CD25

Alfa řetězec vysokoafinního receptoru pro IL-2, neboli CD25, je protein exprimovaný převážně na Treg. IL-2 je zcela zásadní pro fungování imunitního systému, potažmo pro udržení homeostázy a supresivní funkce Treg. Je exprimovaný v lymfatických uzlinách, krvi a s vysokou frekvencí také na Treg infiltrujících nádory (Vargas *et al.*, 2017).

Účinnost deplece Treg pomocí protilátky proti CD25 (α CD25) byla testována u melanomového modelu. Testována byla injekce jedné dávky α CD25 jak u naivních myší, tak u myší s nádorem. Při profylaktické vakcinaci byla úspěšnost deplece 95–98 % v prvních 21 dnech, následně po 42 dnech došlo k obnově 64 % Treg z původního množství. Při terapeutické vakcinaci došlo k depleci 87 %, přičemž po 20 dnech bylo stále depletováno 86 % Treg (Tan *et al.*, 2013). Účinnost deplece Treg při profylaktické vakcinaci byla potvrzena i u modelu gliomu, kdy jedna dávka α CD25 vedla ke snížené infiltraci mozku CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg a zároveň ke zvýšené infiltraci efektorových CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocytů. Mimo jiné došlo při depleci Treg ke zvýšení počtu CD45⁺CD11b⁺ myeloidních buněk – makrofágů/granulocytů (Maes *et al.*, 2013).

Vysoká exprese CD25 byla detekována u T-buněčné leukémie (ATL). V klinických testech byla testována humanizovaná protilátka Daclizumab, což je protilátka proti CD25, která blokuje vazbu IL-2 na jeho receptor. Daclizumab byl v testech velmi dobře tolerován, bez vážnějších

vedlejších efektů a bez toxicity závislé na dávce, bohužel také s nízkým účinkem. Celkově se účinek v I. a II. fázi klinických testů projevil u 18 % pacientů (6 z 34), přičemž všichni pacienti, kteří na léčbu reagovali, trpěli chronickou/doutnající ATL (Berkowitz *et al.*, 2014). Při testování účinku protilátky Daclizumab na metastazující karcinomy prsu bylo *in vitro* potvrzeno signifikantní snížení CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T lymfocytů a navíc bylo prokázáno, že CD45RA^{neg} Treg jsou po inkubaci s Daclizumabem schopny produkovat IFN γ , tedy že došlo k selektivnímu reprogramování těchto Treg. Při kombinaci s peptidovou vakcínou došlo v klinické studii k významnému zesílení imunitní odpovědi CD8⁺ T lymfocytům proti konkrétnímu peptidu (Rech *et al.*, 2012).

Ač CD25 působí jako atraktivní cíl pro nádorovou terapii, klinické výsledky nebyly zcela přesvědčivé. Vargas *et al.* (2017) prokázali, že α CD25 dokáže účinně depletovat Treg nacházející se v lymfatických uzlinách a v krvi, ale už ne Treg přítomné v nádorech. Pro zvýšení účinnosti protilátky nahradili její konstantní části za myší IgG2a a κ konstantní část, jelikož tyto části pocházejí z izotypu spojeného s buněčnou cytotoxicitou závislou na protilátkách (ADCC). Takto upravená protilátka byla schopná depletovat Treg v nádorech a zvýšit tak poměr CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocytů produkujících IFN γ oproti regulačním buňkám v nádoru. Za tento fakt je zodpovědný inhibiční Fc γ receptor IIb, který je hojně exprimován na nádorových buňkách a je spojen právě s ADCC. Ještě slibnějších výsledků dosáhla takto upravená protilátka v kombinaci s α PD-1 (Vargas *et al.*, 2017).

3 Cíle práce

Práce se zabývá využitím systému CRISPR/Cas9 k inaktivaci genu pro B2m u myší nádorové linie TC-1 a následnou charakterizací vzniklých klonů *in vitro* a *in vivo*.

Dílčí cíle práce jsou následující:

- a) Inaktivace genu pro B2m pomocí systému CRISPR/Cas9
- b) Ověření inaktivace genu
- c) Stanovení onkogenity a imunosenzitivity získaných klonů na syngenních myších

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

4.1.1 Biologický materiál

Inbrední myši kmene C57BL/6NCr1 (Charles River, Německo)

Myší nádorová linie TC-1 (Lin *et al.*, 1996)

myší plicní buňky transdukované onkogeny E6 a E7 z HPV16 a lidským aktivovaným H-ras

poskytl T.-C. Wu, Johns Hopkins University, Baltimore, MD

Myší nádorová linie TC-1/A9 (Smahel *et al.*, 2003)

klon TC-1 s reverzibilně sníženou expresí molekul MHC I
připravena v naší laboratoři

Kompetentní buňky *Escherichia coli* XL-1 Blue

Plazmid pBlueScript

Stratagene, USA

Plazmid pBSC

(Smahel *et al.*, 2001)

Plazmid pBSC/PADRE.E7GGG

(Smahel *et al.*, 2001)

4.1.2 Média

DMEM médium

DMEM

Sigma-Aldrich, USA

10 % (v/v) FBS

Biosera, Francie

100 U/ml penicillin

ThermoFisher Scientific,
USA

100 µg/ml streptomycin

ThermoFisher Scientific

2 mM l-glutamine

ThermoFisher Scientific

SOC médium

2 % (w/v) trypton

Bacto Laboratories,
Austrálie

0,5 % (w/v) kvasinkový výtažek

Bacto Laboratories

10 mM NaCl

Sigma-Aldrich

2,5 mM KCl

Sigma-Aldrich

10 mM MgCl₂

Sigma-Aldrich

10 mM MgSO₄

Fluka, USA

20 mM glukóza

Sigma-Aldrich

v H₂O

RPMI médium	RPMI	Sigma-Aldrich
	10 % (v/v) FBS	Biosera
	100 U/ml penicilin	ThermoFisher Scientific
	100 µg/ml streptomycin	ThermoFisher Scientific
	2 mM l-glutamine	ThermoFisher Scientific
	0,1 % (v/v) merkaptóetanol	Sigma-Aldrich
LBM médium	2 % (w/v) LB <i>Broth low salt</i>	Duchefa Biochemie, Nizozemí
	v H ₂ O	

4.1.3 Roztoky, chemikálie

LBM agar	1% glukóza	Sigma-Aldrich
	0,1 mg/ml Carbenicillin disodium	Duchefa Biochemie
	3,5 % (w/v) LB AGAR <i>high salt</i>	Duchefa Biochemie
Tris-Glycin-Metanol	25 mM Tris	Sigma-Aldrich
	192 mM glycin	Sigma-Aldrich
	15 % (v/v) metanol	Carl Roth, Německo
Tankový pufr	3 mM (w/v) Tris	SERVA, Německo
	1,44 % (w/v) glycin	Sigma-Aldrich
	0,1 % (v/v) SDS	Sigma-Aldrich
Promývací roztok pro WB	0,1% (v/v) Tween 20	Sigma-Aldrich
	v PBS	Biosera,
4X LB pufr	2,5 mM Tris	SERVA
	8 % (w/v) SDS	Sigma-Aldrich
	40 % (v/v) glycerol	Sigma-Aldrich
	20 % (v/v) merkaptóetanol	Sigma-Aldrich
	0,04 % (w/v) bromfenolová modř	Sigma-Aldric
	v H ₂ O	
6X LB pufr	0,2 % (w/v) xylen cyanol	SERVA
	60 % (v/v) glycerol	Sigma-Aldrich
	60 mM EDTA	Sigma-Aldrich
	0,2 % (w/v) bromfenolová modř	Sigma-Aldrich
	v H ₂ O	
FACS pufr	2 % (v/v) FBS	Biosera

	0,09 % (w/v) NaN ₃	SERVA
	v PBS	Biosera,
Modifikovaný Laemmliho	4 % (v/v) SDS	Sigma-Aldrich
lyzační pufr	20 % (v/v) glycerol	Sigma-Aldrich
	10 % (v/v) merkaptóetanol	Sigma-Aldrich
	2 mM EDTA	Sigma-Aldrich
	100 mM Tris-Cl, pH 8	
	v H ₂ O	
Pufr pro izolaci CD4 ⁺ buněk	1 mM EDTA	Sigma-Aldrich
	2 % (v/v) FBS	Biosera
	v PBS	Biosera
Roztok na počítání buněk	0,02 % (v/v) ethidium bromid	SERVA
	0,02 % (v/v) akridinová oranž	Sigma-Aldrich
	v PBS	Biosera
Trypsin + EDTA 10X		Biosera
Tris-Borate-EDTA		Sigma-Aldrich
Lipofectamine 2000		Invitrogen, USA
Ampicilin		Duchefa Biochemie
Formaldehyd		Dr. Kulich Pharma, Česká Republika
IFN γ		PeptoTech, USA
Etanol		Fisher Scientific, USA
Butanol		Sigma-Aldrich
BSA		SERVA
GelRed		Biotium, USA
Octan sodný		Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid		Sigma-Aldrich
Agaróza SeaKem LE		Lonza, Switzerland
Agaróza NuSieve 3:1		Lonza
<i>Fixable viability dye</i> eFluor 455UV		Affymetrix, USA
<i>Blue BandIT protein stain</i>		Amresco, USA
Sušené mléko s 0,25 % tuku		TATRA Hlinsko, Česká republika
Peroxodisíran amonný		SERVA
Akrylamis-bis		NZYTech, Portugalsko
MgCl ₂		Fermentas, USA

dNTP

Fermentas, USA

Polyakrylamidový gel:

Na 2 gely	Separační gel (ml)			Zaostřovací gel
	10%	12%	15%	4%
30% AA-bis	3,33	3,99	5	0,67
Tris base, pH 8,8	2,5	2,5	2,5	
Tris base, pH 6,8				1,25
10% SDS	0,1	0,1	0,1	0,05
H ₂ O	4	3,3	2,3	3
10% APS	0,1	0,1	0,1	0,05
TEMED	0,01	0,01	0,01	0,004
Celkový objem	10	10	10	5

TEMED: Tetramethylethylenediamin, AA-bis: Akrylamid-bis, APS: Peroxodisíran amonný

4.1.4 Protilátky

Průtoková cytometrie

FITC, anti-MHC Class I (2G5)

Serotec, Velká Británie

FITC, anti-H-2K^s/H-2D^b (28-8-6)

BD Pharmingen, USA

FITC, anti-H-2D^b (28-14-8)

eBioscience, USA

FITC, anti-H-2K^b (CTKb)

Serotec

PE, anti-CD1d (1B1)

BD Pharmingen

FITC, anti-B2m (sc-32241)

Santa Cruz Biotechnology, USA

FITC, anti-IgG

BD Pharmingen

PE, anti-CD4 (S3.5)

Invitrogen

Western blot

anti-B2m (893803)

R&D Systems, USA

anti- β -tubulin (TUB 2.1)

Sigma-Aldrich

Px, sheep anti-mouse IgG

GE Healthcare, Velká Británie

HRP, goat anti-rat IgG

Invitrogen

Izotypové kontroly

FITC, myší IgG2_b (eBMG2b)

eBioscience

FITC, myší IgG2_{a, κ} (MOPC-173)

BD Pharmingen

PE, myší IgG2_a

BD Pharmingen

Protilátky a depleční látky použité pro práci s myšmi

α NK1.1 (PK136)	Exbio, Česká Republika
α Tim3 (RMT 3-23)	Bio X Cell, USA
α PD-L1 (10F.9G2)	Bio X Cell
α PD1 (RMP1-14)	Bio X Cell
α CD25 (PC61.5.3)	Bio X Cell
α CD4 (GK1.5)	Bio X Cell
α CD8 (2.43)	Bio X Cell
α IFN γ (P4-6A2)	Bio X Cell
carrageenan IV	Sigma-Aldrich

4.1.5 Imunostimulační látky

ODN1826	Generi Biotech, Česká republika
třída B, T*C*C*A*T*G*A*C*G*T*T*C*C*T*G*A*C*G*T*T, obsah GC 50 % thiolátová vazba v sekvenci oligonukleotidů je značena *	
α -Galactosylceramid	Abcam, Velká Británie

4.1.6 Enzymy a pufr

EcoRI	Jena Bioscience, Německo
CutSmart pufr	BioLabs, USA
T4 DNA ligáza	BioLabs
Taq polymeráza + 10 \times pufr	NZYTech

4.1.7 Oligonukleotidy pro CRISPR/Cas9 a primery pro PCR a sekvenaci

Oligonukleotidy B2m-a, B2m-b, B2m-c, B2m-d	Integrated DNA Technologies, USA
Sekvence viz níže	
U6 <i>Forward sequencing primer</i> , CRISPR kit	Life Technologies, USA
5' - GGACTATCATATGCTTACCG -3'	
<i>Forward primer</i> B2m-F	Integrated DNA Technologies
5' - GTTCCACCCGCCTCACATTG -3'	
<i>Reverse primer</i> B2m-R	Integrated DNA Technologies
5' - CCTGGCCTGCTGTGTAAGTC -3'	

4.1.8 Markery

<i>Gene Ruler Low Range DNA Ladder</i>	Thermo Fisher Scientific
--	--------------------------

Prestained Protein Ladder PageRuler
Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder

Thermo Fisher Scientific
Thermo Fisher Scientific

4.1.9 Přístroje

Termální cyklér PTC-200 Gradient

MJ Research, Kanada

Termální cyklér GeneQ

Hangzhou Bioer Technology, Čína

Inkubační třepačka SIF 6000R

Lab Companion, Korea

Mikrocentrifuga 5424 R

Eppendorf™, USA

Termoblok CHB-202

Hangzhou Bioer Technology

Laminární box BioVanguard Green Line

Telstar, Španělsko

CO₂ inkubátor MCO 170AIC

Panasonic, Japonsko

Inkubátor INCU-Line IL35

VWR International, USA

NanoDrop 2000

ThermoFisher Scientific

Průtokový cytometr BD LSRFortessa

BD Biosciences, USA

Fotodokumentační systém INGENIUS³

SynGene, Velká Británie

Mini systém pro gelovou elektroforézu

ThermoFisher Scientific

Owl™ EasyCast™ B1A

Zdroj pro gelovou elektroforézu Consort EV245

Consort BVBA, Belgie

Systém pro vertikální elektroforézu

SE 250 + SE 245

Hofer, USA

Zdroj pro SDS elektroforézu, WB PowerPac 1000

Bio-Rad, USA

UV Ultra Bright transluminátor MLB-21

MaestroGen, Tchaj-wan

Centrifuga Heraeus™ Megafuge™ 16R

ThermoFisher Scientific

Centrifuga Universal 320R

Andreas Hettich, Německo

Termoblok Semi Dry Blotter

Cleaver Scientific, Velká Británie

Amersham Imager 600

GE Healthcare Life Sciences

Kývačka ProBlot Rocker 25

Labnet International, USA

Termoblok s třepačkou Mixing Block MB-102

Hangzhou Bioer Technology

3D rotační mixér RH-18

Hangzhou Bioer Technology

Genová pistole

Bio-rad, USA

Sonikátor Power Sonic 603

Hwashin Technology, Korea

Inverzní mikroskop NIB100F

Novel, Čína

Fluorescenční mikroskop BX43

Olympus, Japonsko

Airstream PCR kabinet

ESCO, USA

Spektrofotometr Helios β

Thermo Corporation, USA

4.1.10 Počítačový software

Clone Manager

Sci-Ed Software, USA

Chromas

Technelysium, Austrálie

FlowJo v10.4.2

FlowJo, LLC, USA

GraphPad Prism 6

GraphPad Software, USA

GeneSys³

Syngene

Crispr.mit.edu

<http://crispr.mit.edu/>

NCBI databáze

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

4.1.11 Komerční soupravy

GeneArt CRISPR Nuclease Vector kit

Life Technologies, USA

NucleoSpin Plasmid

Macherey-Nagel, Německo

NucleoBond Xtra Maxi

Macherey-Nagel, Německo

NEB PCR Cloning kit

New England Biolabs, USA

Dynabeads FlowComp Human CD4

Thermo Fisher Scientific, USA

NucleoSpin Gel and PCR Clean-up

Macherey–Nagel, Německo

NucleoSpin tissue

Macherey–Nagel, Německo

Big Dye Terminator, verze 3.1

Applied Biosystems, USA

SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity

Substrate

Thermo Scientific, USA

Rapid DNA ligation kit

Thermo Scientific, USA

4.2 Metody

4.2.1 Práce se systémem CRISPR/Cas9

4.2.1.1 Návrh oligonukleotidů

Pro práci se systémem CRISPR/Cas9 byly navrženy oligonukleotidy komplementární k sekvenci genu *B2m* sloužící jako tzv. *guide* RNA vázající se na cílová místa pro mutagenézi. Z databáze zvané Národní centrum pro biotechnologické informace (NCBI) byla stažena nukleotidová sekvence genu *B2m* (NM_009735.3). Délka kódující sekvence činí u *B2m* 360 nukleotidů. Pro vyhledání cílových míst pro vazbu komplexu CRISPR/Cas9 k DNA *B2m* byl využit online software <http://crispr.mit.edu/>, který vyhledává sekvence před PAM sekvencí. K práci byla použita Cas9 nukleáza z bakterie *Streptococcus pyogenes*, která využívá PAM sekvenci NGG. Program nalezne vhodné oligonukleotidy o délce 20 bází a seřadí je dle skóre. To je přiřazováno jednotlivým sekvencím na základě toho, s jakou pravděpodobností se budou vázat pouze na jedno konkrétní místo buněčného genomu. Pro modifikaci genu *B2m* byly vybrány 2 cílové sekvence. Pro naklonování těchto oligonukleotidů do plazmidu *CRISPR Nuclease Vector* byly navrženy komplementární oligonukleotidy s přesahujícími 3' konci (obr. 4). Tyto oligonukleotidy byly nasyntetizovány na objednávku firmou Integrated DNA Technologies, Inc.

1. Komplementární oligonukleotidy B2m-a a B2m-b odvozené z exonu 2 (nukleotidy 142–161)

```
5'-tcacgccacccaccggagaagtttt-3'  
3'-caccgtcacgccacccaccggagaa-5'
```

2. Komplementární oligonukleotidy B2m-c a B2m-d odvozené z exonu 2 (nukleotidy 374–393)

```
5'-ccgagcccaagaccgtctacgtttt-3'  
3'-caccgccgagcccaagaccgtctac-5'
```

Obr. 4: Oligonukleotidy pro práci se systémem CRISPR/Cas9. Sekvence nukleotidů jsou zobrazeny s přesahujícími konci, zeleně je zvýrazněna komplementární oblast představující cílové místo.

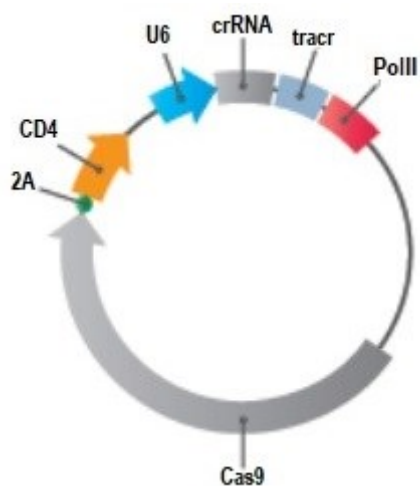
4.2.1.2 Vložení oligonukleotidů do vektoru a transformace do *Escherichia coli*

Oligonukleotidy byly vloženy do vektoru dle protokolu doporučeném v soupravě *CRISPR Nuclease Vector kit*. Byl proveden *annealing* navržených jednovláknových oligonukleotidů za vzniku 50 μM dvouvláknových oligonukleotidů s přesahujícími konci. Smíchány byly vždy komplementární oligonukleotidy B2m-a s B2m-b a B2m-c s B2m-d. *Annealing* se prováděl v termálním cykléru PTC-200 Gradient dle tabulky 1 za vzniku komplementárních páru B2m-A a B2m-C. V prvním kroku došlo k zahřátí reakčního roztoku na 95 °C, aby se oligonukleotidy nepárovaly spolu. V dalších krocích byla reakční směs postupně ochlazována, při čemž docházelo k vazbě komplementárních oligonukleotidů. Oligonukleotidy byly nejprve zředěny vodou na 500 nM a následně na 5 nM pracovní koncentraci.

Tabulka 1: Program pro annealing oligonukleotidů

	Teplota	Čas
1	95 °C	4 min
2	- 2,5 °C	1 min
3	Opakování kroku 2	26x
4	25 °C	∞

Dvouvláknové oligonukleotidy byly zaligovány do linearizovaného vektoru *CRISPR Nuclease vector* (15ng/ μl ; obr. 5), obsahujícího reportérový gen pro lidský protein CD4 (hCD4), za vzniku plazmidů pB2m-A a pB2m-C. Pro vytvoření konečné ligační směsi byly reagenty z *CRISPR Nuclease Vector kit* doplněny reagenty ze soupravy *Rapid DNA ligation kit* (tabulka 2). Ligační směs byla inkubována 2,5 hodiny v termálním cykléru PTC-200 Gradient při 26 °C. Po ligaci byly vytvořené plazmidy transformovány do Z kompetentních buněk připravených v naší laboratoři (dle protokolu *Z-Competent E. coli Transformation kit & Buffer Set* firmy Zymo Research). Jednalo se o kmen *Escherichia coli* XL-1 Blue, které byly smíchány v reakci 50 μl kompetentních buněk a 3 μl ligační směsi. Jako pozitivní kontrola byla použita reakce 50 μl kompetentních buněk s 5 μl plazmidu pBS (0,2 ng/ μl). Směs byla inkubována 10 minut na ledu. Bylo přidáno 200 μl SOC média. Inkubace probíhala 1 hodinu při 37 °C a 300 rpm na třepače Mixing Block MB-102. Buňky byly vysety na Petriho misky s LBM agarem a s 0,1 mg/ml ampicilinu. V buňkách, u kterých proběhla úspěšná transformace, došlo ke zmnožení vložených plazmidů a vytvořily se kolonie.



Obr. 5: *CRISPR Nuclease Vector* do něhož byly zaligovány oligonukleotidy. Jeho součástí je Cas9 nukleáza, reportérový gen pro lidský protein CD4, promotor U6, oligonukleotidy komplementární k cílové sekvenci (crRNA), RNA (tracrRNA) a polymeráza III (Pol III).

Tabulka 2: Ligační reakce. Pro reakci byly použity reagenty ze dvou souprav – *CRISPR Nuclease vector kit* a *Rapid DNA ligation kit*.

Reagencie	Objem (μl)	Souprava
ds oligonukleotidy (5 nM)	1	
vektor CRISPR	1	CRISPR
T4 DNA ligáza (2,5 U)	0,5	Rapid
ligační pufr 5X	2	Rapid
voda bez DNáz/RNáz	5,5	CRISPR

4.2.2 Práce s DNA

4.2.2.1 Izolace plazmidové DNA

Plazmidová DNA byla izolována po úspěšné transformaci. Úspěšnost byla určena dle schopnosti buněk růst na selekčním antibiotiku. Z vyrostlých kolonií bylo vybráno několik samostatně rostoucích klonů, které byly přeočkovány na nové Petriho misky. Vybrané kolonie byly pomocí párátko zároveň přeneseny do skleněné zkumavky s 2 ml LBM média a s ampicilinem o koncentraci 0,1 mg/ml. Následovala inkubace na třepače SIF 6000R při 220 rpm a 37 °C přes noc. Po noční inkubaci byl obsah skleněných zkumavek přelit do 2 ml mikrozskumavek a dále se pokračovalo dle protokolu *NucleoSpin Plasmid*. Izolovaná DNA byla dále sekvenována.

Po sekvenaci ověřující zainkorporování oligonukleotidů B2m-A a B2m-C do plazmidu byla opět provedena izolace plazmidové DNA, tentokrát ve větším množství. Vybrané kolonie byly přeočkovány do 10 ml LBM média s ampicilinem o koncentraci 0,1 mg/ml a míchány v třepačce SIF 6000R 8 hodin, při 220 rpm a 37 °C. Poté byly kultury přeočkovány do objemu 200 ml LBM média s ampicilinem o koncentraci 0,1 mg/ml a inkubovány přes noc na třepačce při 220 rpm a 37 °C. Dále se pokračovalo dle protokolu *NucleoBond Xtra Maxi*. Koncentrace vyizolované DNA byla změřena na spektrofotometru při vlnové délce 260–280 nm a spočítána dle vzorce: $\frac{A_{260} \times 50 \times \text{ředění}}{1000}$ (µg/µl).

4.2.2.2 Příprava vzorků na sekvenaci

Pro přípravu reakční směsi (10 µl) byla použita souprava *Big Dye Terminator*, verze 3.1. Reakce probíhala v cykléru PTC-200 Gradient viz tabulky 3 a 4. Při práci byly vzorky uchovávány na ledu a chráněny před světlem.

Tabulka 3: Program cykléru použitý při přípravě vzorků pro sekvenaci.

	Teplota	Čas
1	96 °C	1 min
2	96 °C	30 s
3	50 °C	15 s
4	60 °C	4 min
5	Opakování kroků 2-4	39x
6	10 °C	∞

Tabulka 4: Reakční směs použitá při přípravě vzorků pro sekvenaci.

Reagencie	Objem (µl)
DNA	2
Pufr 5X	1
reakční premix	2
primer 1,6 µM	2
H ₂ O	3

Po inkubaci proběhla precipitace octanem sodným a etanolem (tabulka 5), aby došlo k odstranění nezainkorporovaných dideoxynukleotidů, které slouží jako terminátory syntézy.

Tabulka 5: Směs pro precipitaci.

Reagencie	Objem (µl)
3 M NaOAc, pH 4,6	3
95 % etanol	62,5
H ₂ O	24,5

Následovala 15minutová inkubace při pokojové teplotě, 20minutová centrifugace v centrifuze Eppendorf 5424 R při maximální rychlosti a poté byl odsán supernatant. K peletu bylo pro promytí vzorku přidáno 250 µl 70% etanolu a směs byla zcentrifugována 5 min při maximální rychlosti. Byl odsán supernatant a zkumavka byla ponechána otevřená ve tmě po dobu 15 minut, aby došlo k vysušení peletu DNA. Poté byl vzorek poslán na sekvenaci Sangerovou metodou do laboratoře OMICS – Genomika v centru BIOCEV na genetickém analyzátoru ABI 3500 (Life Technologies). Výsledky byly vyhodnoceny pomocí programů Chromas a Clone Manager.

Primery použité k sekvenaci

Ověření inkorporace oligonukleotidů do plazmidu:

U6 Forward sequencing primer ze soupravy *GeneArt CRISPR*

Sekvence jednotlivých alel pro ověření vnesení mutací do genu B2m, navrženy v programu Clone Manager:

Forward primer B2m-F

Reverse primer B2m-R

4.2.2.3 Izolace genomové DNA z tkáňových kultur

Buňky TC-1 obsahující vložený plazmid *CRISPR Nuclease vector* byly zpasážovány, přeneseny do 1,5 ml zkumavky, centrifugovány na centrifuze Hettich Universal 320R 5 min, 400 g při 4 °C a supernatant byl vylit. Izolace DNA probíhala dle protokolu soupravy *NucleoSpin Tissue*. Pouze v krocích 6 a 7 byla změněna centrifugace z 11 000 g na 20 000 g. Koncentrace vyizolované DNA byla změřena na NanoDropu 2000. Fragment genomové DNA byl následně zmnožen pomocí metody PCR.

4.2.2.4 PCR pro zmnožení genomové DNA

Reakční směs pro PCR (tabulka 6) byla připravována v Airstream PCR kabinetu, DNA byla k reakci přidána v laminárním boxu BioVanguard. PCR reakce probíhala v cykléru PTC-200 Gradient (tabulka 7).

Tabulka 6: PCR směs.

Reagencie	Množství
DNA	4 µl
pufr	1X
MgCl ₂	1,5 mM
dNTP	0,2 mM
primery B2m-F + B2m-R	0,5 µl
Taq polymeráza	2,5 U
H ₂ O	do 50 µl

Tabulka 7: PCR program.

	Teplota	Čas
1	95 °C	5 min
2	94 °C	1 min
3	55 °C	1 min
4	72 °C	1 min
5	Opakování kroků 2-4	39 x
6	72 °C	4 min
7	10 °C	∞

PCR primery byly navrženy v programu Clone Manager (viz Primery použité k sekvenaci). Délka ampliconu byla 354 nukleotidů.

4.2.2.5 Izolace fragmentů DNA z agarózového gelu a určení její koncentrace

Pro izolaci naamplifikovaných fragmentů DNA z gelu byl vyroben 2% agarózový gel – agaróza NuSieve GTG (příprava agarózového gelu viz kapitola 3.2.2.8). K 50 µl vzorku po PCR bylo přidáno 10 µl 6x LB pufru a vzorky byly poté rozpipetovány vždy do 3 jamek. Pro stanovení velikostí fragmentů DNA byl použit marker *Gene Ruler Low Range DNA Ladder*. Pro elektroforézu byly nastaveny parametry: 100 V, 40 min. Po ukončení elektroforézy byl gel prosvícen na UV transiluminátoru MLB-21, aby došlo ke zviditelnění proužků markeru a ampliconů po PCR. Proužek odpovídající velikosti byl vyřezán skalpelem a dále se izolovala DNA dle protokolu doporučeném v soupravě *NucleSpin Gel and PCR Clean-up*.

4.2.2.6 Klonování DNA fragmentů

Fragmenty DNA vyizolované z agarózového gelu byly zaligovány do plazmidu pMiniT 2.0. Práce probíhala dle protokolu soupravy *NEB PCR Cloning kit*, jejíž součástí je i daný vektor. K transformaci byly použity Z kompetentní buňky vyrobené v naší laboratoři. Na Petriho misky s 0,1 mg/ml ampicilinu bylo vyseto po 20 µl a 50 µl ligační směsi od každého vzorku. Následovala inkubace přes noc při 37 °C. Po vzniku bakteriálních kolonií byla z jednotlivých namnožených kolonií vyizolována plazmidová DNA a pomocí restrikčního štěpení analyzovaného gelovou elektroforézou bylo ověřeno, zda došlo ke správnému vložení fragmentů.

4.2.2.7 Štěpení restrikčními endonukleázami

Fragmenty DNA vložené do plazmidu pMiniT byly obklopeny restrikčními místy pro endonukleázu EcoRI. Pro štěpení restrikční endonukleázou EcoRI byla připravena reakční směs podle tabulky 8. Následovala inkubace 2 hodiny při 37 °C v termobloku CHB-202.

Tabulka 8: Reakční směs pro štěpení restrikčními endonukleázami.

Reagencie	Množství
Cut Smart pufr 10X	2 µl
DNA	2 µl
EcoRI	3 U
H ₂ O	do 20 µl

4.2.2.8 Agarózová elektroforéza

Agarová elektroforéza byla používána pro ověření správného vložení fragmentů do plazmidu pMiniT (1% gel) a pro izolaci produktů z PCR (2% gel). Erlenmeyerova baňka byla naplněna 40 ml roztoku Tris-Borate-EDTA a 0,4 g, resp. 0,8 g agarózy SeaKem LE, resp. agarózy NuSieve GTG. Roztok byl zahříván v mikrovlnné troubě do rozpuštění agarózy. K roztoku byly přidány 2 µl barviva GelRed. Roztok byl nalit do stojánku určeného k tuhnutí gelů. Gel byl po ztuhnutí přenesen do soupravy pro elektroforézu Owl EasyCast B1A. Pro zviditelnění vzorků na gelu byl použit 6X LB pufr. Jako marker pro 1% gel byl použit *Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder*, pro 2% gel byl použit marker *Gene Ruler Low Range DNA Ladder*. Jako zdroj elektrické energie pro elektroforézu byl použit přístroj Consort EV245. Elektroforéza standardně probíhala 40 minut pod napětím 100 V. Vyhodnocení bylo prováděno ve fotodokumentacním systému na focení gelů INGENIUS3 a v programu GeneSys. Vybrané klony se správně vloženým fragmentem do plazmidu pMiniT byly následně sekvenovány.

4.2.3 Práce s buněčnými kulturami

Práce s buněčnými kulturami probíhala v laminárním boxu BioVanguard. Buňky byly uchovávány v CO₂ boxu MCO 170 IAC při teplotě 37 °C a 5 % CO₂.

4.2.3.1 Pasážování buněk

Buněčné linie TC-1 a TC-1/A9 jsou adherentní. Byly kultivovány v DMEM médiu v kultivačních lahvích o velikosti 25 cm². Při pasážování bylo nejprve odsáto staré médium, buňky narostlé na dně kultivační lahve byly omyty 2 ml PBS a inkubovány 3 min v 0,5 ml trypsinu s EDTA. Po třech minutách bylo v mikroskopu NIB100F zkontrolováno, zda se

všechny buňky pustily ode dna. Pak byly buňky resuspendovány ve 2 ml média a spočítány v Bürkerově komůrce. Na novou kultivaci bylo ponecháno zhruba 5×10^5 buněk a doplněno DMEM médiem do 5 ml.

4.2.3.2 Transfekce

Před transfekcí byly buňky TC-1 zpasážovány. Na misku o průměru 10 cm bylo nasazeno 3×10^6 buněk v 10 ml DMEM média s 2,5 $\mu\text{g/ml}$ amfotericinu. Následovala 4hodinová inkubace v CO₂ inkubátoru. K transfekci plazmidů pB2m-A a pB2m-C do buněk TC-1 bylo použito transfekční činidlo Lipofectamine 2000 v poměru DNA:lipofectamine \rightarrow 1 μg :2,5 μl . Pro tvorbu transfekčního komplexu bylo použito 16 μg DNA. Do mikrozkušavky bylo napipetováno DMEM médium bez antibiotik a bez fetálního bovinního séra (FBS) s lipofectaminem v objemu 1 ml média + 40 μl lipofectaminu na misku. Směs byla zamíchána a poté proběhla 5minutová inkubace. Zatímco probíhala inkubace, plazmidy byly přidány do 1 ml DMEM média bez antibiotik a bez FBS. Obě směsi byly spojeny, promíchány a následovala inkubace při pokojové teplotě po dobu 20 minut. Roztok byl poté opětovně promíchán a nakapán na misky s buňkami TC-1. Buňky pak byly uloženy zpět do CO₂ inkubátoru. Druhý den bylo vyměněno médium, aby nedošlo k toxicitě způsobené transfekčním činidlem. Celková inkubace probíhala 2 dny při 37 °C.

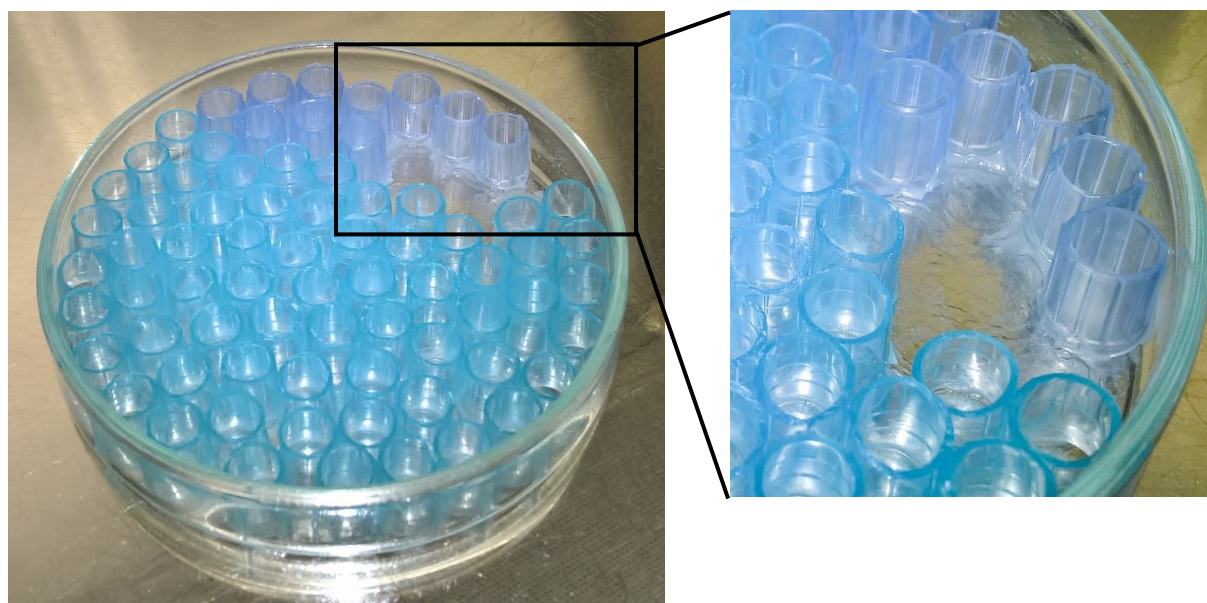
4.2.3.3 Selektce buněk pomocí magnetických kuliček

Po transfekci byly izolovány buňky, u kterých došlo k přenosu plazmidů pB2m-A a pB2m-C do buněk TC-1. Jako selekční marker sloužila molekula hCD4, jejíž gen byl součástí vektoru. Buňky narostlé na miskách byly zpasážovány a v DMEM médiu přeneseny do zkumavek. Buňky byly dvakrát zcentrifugovány v centrifuze Hettich Universal 320R 5 min, 400 g při 4 °C a resuspendovány v PBS. Aby ve vzorcích nezůstaly shluky buněk, byly buňky přefiltrovány skrze filtry s oky o velikosti 70 μm . Dále se pokračovalo dle protokolu *Dynabeads FlowComp Human CD4*. Po filtraci následovala centrifugace s parametry viz výše a buňky byly resuspendovány v izolačním pufru v množství 1×10^8 buněk/ml. K 300 μl roztoku bylo přidáno 15 μl protilátky *FlowCompTM Human CD4 Antibody*. Následovala 15minutová inkubace při 4 °C. K roztoku bylo přidáno 1,5 ml izolačního pufru a vzorky byly zcentrifugovány 5 min, 400 g při 4 °C. K peletu bylo přidáno 600 μl izolačního pufru a 45 μl magnetických kuliček. Následovala 15minutová inkubace za stálého míchání v 3D rotačním mixéru. Poté byl přidán 1 ml izolačního pufru a zkumavky byly umístěny na stojánek s magnety. Na magnet se přes vazbu magnetická kulička – protilátka přichytily CD4⁺ buňky. Supernatant byl odstraněn, buňky přichycené k magnetu byly promyty 1 ml izolačního pufru a opět umístěny na magnet,

aby se zvýšila čistota vzorku. Magnetické kuličky s navázanými CD4⁺ buňkami byly resuspendovány v uvolňovacím pufru, jež byl součástí soupravy. Po 10minutové inkubaci za stálého míchání byl vzorek 10x nasán a vysán pipetou, aby došlo k uvolnění buněk z kuliček. Kuličky byly vychytány na magnety. Uvolněné buňky byly přeneseny do nové mikrozkuřavky, umístěny na magnet pro dodatečné očištění, zcentrifugovány s parametry viz výše a resuspendovány v médiu DMEM. Po izolaci byla část buněk analyzována průtokovou cytometrií, při které bylo stanovené zastoupení CD4⁻ a CD4⁺ buněk před a po izolaci. Zbylé buňky byly naředěny na koncentraci 8×10^3 buněk/ml a nasazeny v množství 24 a 120 buněk v objemu 8 ml K DMEM média na 10centimetrové kultivační misky.

4.2.3.4 Izolace jednotlivých kolonií

Z kultivačních misek byly izolovány CD4⁺ buňky. Pomocí mikroskopu byly vybrány samostatně rostoucí kolonie. K izolaci byly použity válečky vyrobené z vrchní části 1ml pipetové špičky, které byly zasazeny ve vazelině (obr. 6). Z kultivační misky bylo odsáto médium, buňky byly opláchnuty 2 ml PBS a na vybrané kolonie byl položen váleček. Do válečku bylo napipetováno 20 μ l trypsinu a následovala 3minutová inkubace. Poté bylo k trypsinu přidáno 100 μ l DMEM média a obsah válečku byl přenesen na 24 jamkovou destičku s 0,5 ml DMEM média v jamkách. U narostlých klonů bylo dále testováno pomocí sekvenace (3.2.2.2), průtokové cytometrie (3.2.4.1) a western blotu (WB) (3.2.4.3), zda došlo k inaktivaci genu *B2m*.



Obr. 6: Miska s vazelínou použitá k izolaci jednotlivých buněk.

4.2.3.5 Příprava buněčného lyzátu pro WB

Dva dny předem bylo na kultivační misky o průměru 6 cm nasazeno 1×10^6 buněk. Buňky pak byly ztrypsinizovány, zresuspendovány v PBS a spočítány. Následovala 5minutová centrifugace při 845 g a 4 °C v centrifuze Eppendorf 5424 R. Vzorky byly při práci uchovávány na ledu. K peletu byl přidán modifikovaný Laemmliho pufr v množství 1 ml na 2×10^7 buněk, který je zodpovědný za lyzi buněk. Buňky byly promíchány do vytvoření homogenního roztoku. K vytvořenému lyzátu byl přidán 4X LB pufr pro zvýraznění vzorků na gelu. Vzorky byly denaturovány 3 minuty při 98 °C v termálním cykléru GeneQ. Ihned po denuraci byly vzorky dány zpět na led. Poté byly buď použity ihned pro analyzování metodou WB, nebo uloženy do mrazáku na - 20 °C.

4.2.3.6 Měření proliferace buněk *in vitro*

Buňky byly nasazeny v počtu 5×10^5 na kultivační misky o průměru 10 cm v 10 ml média DMEM. U každé buněčné linie byla měřena proliferace bez a po indukci 200 U/ml IFN γ . Buňky byly ztrypsinizovány a počítány v Bürkerově komůrce po 24, 48 a 72 hodinách.

4.2.4 Detekce exprese inaktivovaného genu

4.2.4.1 Průtoková cytometrie

Povrchové barvení

Dva dny předem byly nasazeny buňky. V některých případech byl dva dny předem k buňkám přidán též IFN γ v koncentraci 200 U/ml pro zvýšení exprese MHCI. Po dvoudenní inkubaci byly buňky ztrypsinizovány a spočítány. Pro průtokovou cytometrii bylo používáno cca 5×10^5 buněk. Ty byly přeneseny v médiu do 2 ml zkumavek a zcentrifugovány v centrifuze Eppendorf 5424 R 5 min, 400 g při 4 °C. Byl odstraněn supernatant a pelet byl přenesen ve 200 μ l FACS pufru na 96jamkovou destičku. Následovala centrifugace v přístroji Heraeus™ Megafuge™ 16R 5 min, 400 g při 4 °C a odstranění supernatantu. Ke vzorku byla přidána protilátka v objemu 50 μ l (koncentrace viz tabulka 9), následovala 30minutová inkubace a promytí 150 μ l FACS pufru. V závislosti na typu protilátky následovalo buď přidání sekundární protilátky, nebo opětovné promytí 200 μ l FACS pufru a přenesení vzorku do plastových zkumavek pro průtokovou cytometrii. Pokud byla přidána sekundární protilátka, následovala 30minutová inkubace. Vzorek byl poté dvakrát promyt FACS pufrům a přenesen do výše zmíněných zkumavek. Vzorek byl měřen ve 400 μ l FACS pufru na průtokovém cytometru BD LSRFortessa.

Tabulka 9: Seznam protilátek používaných k průtokové cytometrii. FITC = fluorescein isothiocyanate, PE = phycoerythrin.

Název	Fluorofor	Isotyp	Použitá koncentrace
anti-MHC Class I	FITC	myší IgG2 _b	0,5 µg/50 µl
anti-H-2K^S/H-2D^b		myší IgG2 _a	0,5 µg/50 µl
anti-IgG	FITC	kozí IgG	0,5 µg/50 µl
anti-H-2K^b	FITC	myší IgG2 _a	0,25 µg/50 µl
anti-H-2D^b	FITC	myší IgG2 _a	0,125 µg/50 µl
anti-B2m		myší IgG2 _b	0,5 µg/50 µl
anti-CD1d	PE	krysí IgG2 _{bκ}	0,5 µg/50 µl

4.2.4.2 SDS PAGE elektroforéza

Pro elektroforézu v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS PAGE) byly používány 10%, 12% a 15% polyakrylamidové gely. Nejprve byla nalita vrstva separačního gelu převrstvená tenkou vrstvou butanolu. Po ztuhnutí gelu byl butanol vylit a odmyt vodou. Na vrstvu separačního gelu byl nanesen zaostřovací gel, do něž byl umístěn hřebínek. Po ztuhnutí gelu bylo dle velikosti jamek nanášeno množství vzorku ředěné v 4X LB pufru. Jako marker byl použit *Prestained Protein Ladder PageRuler*. SDS PAGE elektroforéza probíhala zhruba 60 minut při konstantním proudu 20 mA v tankovém pufru. Poté byl gel buď barven roztokem *Blue BANDit* a focen na přístroji Amersham Imager 600, nebo byl dále zpracováván metodou western blot.

4.2.4.3 Western blot

Po SDS PAGE elektroforéze byl gel vložen do roztoku Tris-Glycin-Metanol a inkubován 20 minut na kývačce Rocker 25. Pro western blot byla využívána polyvinylidenfluoridová membrána. Před použitím byla ponořena na 5 sekund do metanolu, promyta vodou a poté vložena na 5 minut do roztoku Tris-Glycin-Metanol. V přístroji Semi Dry Blotter byl sestaven tzv. blotovací sendvič – filtrační papír, polyvinylidenfluoridová membrána, gel po elektroforéze, filtrační papír. Blotování probíhalo 1 hodinu za konstantního proudu 40 mA. Membrána byla následně přenesena do plastové krabičky a blokována 1 hodinu blokovacím roztokem na kývačce. Jako blokovací roztok byl použit 5% roztok sušeného mléka s 0,1% Tween 20 v PBS. Membrána pak byla 2x promyta v promývacím roztoku 0,1% Tween 20 v PBS. K membráně byla přidána primární protilátka ředěná v blokovacím roztoku (koncentrace dle tabulky 10). Inkubace probíhala buď hodinu při pokojové teplotě, nebo přes noc při 4 °C. Membrána byla promyta 6x 5 minut promývacím roztokem. Následovala hodinová

inkubace v sekundární protilátce (koncentrace dle tabulky 10) při pokojové teplotě na kývačce. Membrána byla promyta 6x 5 minut promývacím roztokem. Pro kontrolu množství naneseného vzorku byla použita protilátka proti tubulinu. Výsledky byly zobrazeny metodou chemiluminiscence. K vyvolání byla použita souprava *SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate*. Vyhodnocení probíhalo na přístroji Amersham Imager 600.

Tabulka 10: Seznam protilátek používaných k western blotu.

Název	Značka	Isotyp	Koncentrace	Ředění
Anti-B2m		kryší IgG2 _a	1 mg/ml	2000x
Goat anti-rat IgG	HRP	kozí IgG2 _a	2 mg/ml	6000x
Anti-β-tubulin		myší IgG1	2 mg/ml	2000x
Sheep anti-mouse IgG	Px	ovčí IgG	2 mg/ml	5000x

4.2.5 Charakterizace vybraných klonů v myším modelu

Pro *in vivo* charakterizaci vybraných klonů nádorových buněk TC-1 po inaktivaci B2m byly využívány syngenní myši C57BL/6NCrI. Myši byly ustájeny v Českém centru pro fenogenomiku. Všechny pokusy byly prováděny v souladu se zákonem č. 246/1992 Sb na ochranu zvířat proti týrání. Pokusy byly zahajovány, když byly myši staré 7-9 týdnů. V každé skupině se nacházelo 5 myší samičího pohlaví.

4.2.5.1 Příprava nádorových buněk na inokulaci

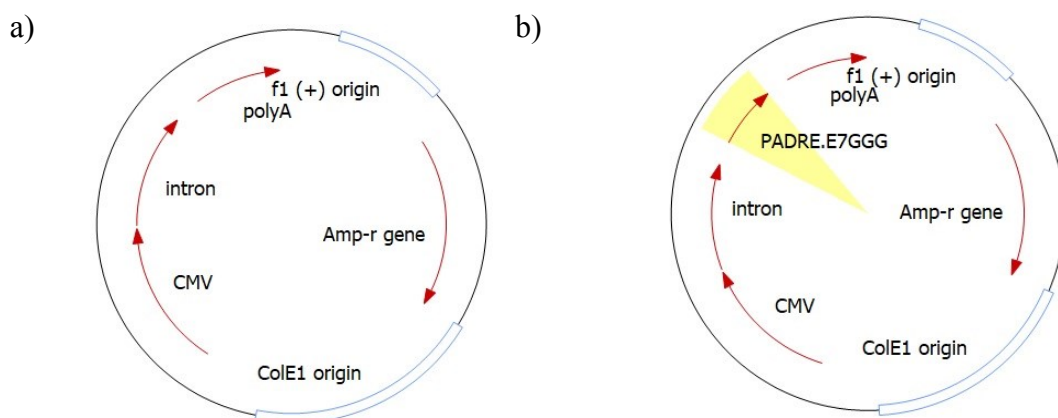
Po rozmražení byly buňky 3× zpasážovány a poté byly nasazeny na kultivační misky o průměru 15 cm v množství 2×10^6 . Po dvou dnech byly buňky ztrypsinizovány a zcentrifugovány 20 min, 400 g při 4 °C v centrifuze Hettich Universal 320R. Supernatant byl vylit, pelet byl resuspendován v PBS a buňky byly spočítány, celý proces byl 3× opakován. Následně byly buňky naředěny na požadovanou koncentraci.

4.2.5.2 Onkogenita vybraných klonů

Před injikováním nádorových buněk byly myši uspány pomocí 200 μl směsi roztoků Rometar (c = 20 mg/ml) a Narkamon (c = 100 mg/ml) smíchaných v poměru 4:5. Nádorové buňky byly inokulovány subkutánně do zad mezi lopatky. Onkogenita, tedy schopnost růstu nádorových buněk, byla u vybraných klonů posuzovaná vzhledem k onkogenitě původních buněk TC-1 a od nich odvozeného klonu TC-1/A9 s reverzibilně sníženou expresí MHCI. Myším byla nejprve inokulována dávka 3×10^4 nádorových buněk ve 150 μl PBS. U vybraných klonů se testovala i rychlost růstu nádorů při vyšších dávkách nádorových buněk – 1×10^5 a 3×10^5 .

4.2.5.3 DNA imunizace pomocí genové pistole

Při DNA imunizaci byly myším podávány 3 dávky plazmidu pBSC/PADRE.E7GGG v množství 2 μg pomocí genové pistole. Jedná se o pBSC plazmid obsahující fúzní gen skládající se z onkogenu HPV16 E7 se 3 bodovými mutacemi snižujícími jeho onkogenost (Smahel *et al.*, 2001) a ze sekvence kódující epitop vázající se na Pan HLA-DR (PADRE) (Alexander *et al.* 1994; obr. 7). Při výrobě nábojů do genové pistole dochází k navázání plazmidu na částičky zlata. Ty jsou poté při aplikaci genovou pistolí do myši uvolněny z nábojů stlačeným héliem pod tlakem 400 psi. Náboje byly vyráběny v naší laboratoři dle návodu popsaném dr. Šmahelem (Smahel, 2013). Aplikace DNA vakcíny byla při jednotlivých imunizacích prováděna v horní, spodní nebo střední části břicha vždy 2 výstřely po 1 μg DNA. Před aplikací byla myš v dané části břicha oholena holicím břitem s použitím holicí pěny.



Obr. 7: Plazmidy používané k imunizačním pokusům. a) Kontrolní plazmid pBSC. b) Plazmid pBSC/PADRE.E7GGG. CMV – promotor z cytomegaloviru. lacZ – laktózový operon. f1 (+) origin – replikační počátek pomocného fága f1. Amp-r gene – gen pro ampicilinovou rezistenci. ColE1 origin – replikační počátek z *E. coli*.

4.2.5.4 Preventivní DNA imunizace

Byla testována citlivost vybraných klonů k preventivní DNA imunizaci. DNA vakcína byla aplikována ve 3 dávkách po 2 μg vždy po týdnu, 4. týden byly inokulovány nádorové buňky v dávce 3×10^5 . Buňky TC-1 sloužily jako kontrola. Myši byly imunizovány buď kontrolním plazmidem pBSC, nebo plazmidem pBSC/PADRE.E7GGG.

4.2.5.5 Příprava imunostimulačních látek

Lyofilizovaný ODN1826 byl rozpuštěn v PBS na koncentraci 5 mg/ml a skladován v alikvótech při -20 °C.

Lyofilizovaný α -galactosylceramid (GalCer) byl rozmíchán v dimethylsulfoxidu na koncentraci 1 mg/ml, inkubován v termobloku CHB-202 při 80 °C po dobu 20 minut a následně byl sonikován v sonikátoru Power Sonic 603 45 min. Rozpuštěný GalCer byl skladován v silikonizovaných zkumavkách v alikvótech při -20 °C.

4.2.5.6 Kombinovaná imunoterapie

Kombinovaná imunoterapie zahrnovala kombinaci terapeutické DNA vakcinace a vakcinace protilátkami či jinými imunostimulačními (IS) látkami pro stimulaci jak adaptivní, tak přirozené imunity. Pro testování kombinované imunoterapie byl na základě předchozích pokusů vybrán jeden klon, TC-1/C9/6. DNA vakcína (pBSC/PADRE.E7GGG) byla podávána vždy 3., 6. a 10. den po inokulaci nádorových buněk. Jako kontrolní plazmid byl používán plazmid pBSC. Protilátky a další IS látky byly podávány intraperitoneálně v množství, jež je uvedeno v tabulce 11. Jako kontrola pro IS látky byl podáván PBS. Proběhlo několik pokusů, při nichž se postupně měnily kombinace jednotlivých protilátek a IS látek. Injikování protilátek a IS látek probíhalo dle různých očkovacích schémat (viz Výsledky).

Tabulka 11: Protilátky a imunostimulační látky použité ke stimulaci imunitního systému u myšního modelu.

IS látky + protilátky	Množství ($\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ PBS)
αTim3	200
$\alpha\text{PD-1}$	200
$\alpha\text{PD-L1}$	200
αCD25	200
ODN1826	50
GalCer	2

4.2.5.7 Měření velikosti nádorů

Vznik a velikost nádorů byly nejprve posuzovány pohmatem a následně měřeny posuvným měřítkem. Měřena byla délka, šířka a výška nádoru. Ze začátku byl vznik a růst nádoru sledován 3x týdně. Od doby, kdy všechny nebo téměř všechny myši vyvinuly nádor, se velikost nádoru měřila 2x týdně. Pokud velikost nádoru v jakémkoliv směru přesáhla 2 cm, byla myš utracena.

Výpočet objemu nádorů byl proveden v programu Microsoft Excel dle vzorce:

$$\frac{\text{délka} \times \text{šířka} \times \text{výška}}{6 \times \pi}$$

Grafické zpracování výsledků a statistická analýza metodou zvanou dvoufaktorová ANOVA a mnohonásobným srovnávacím testem Sidak byla provedena v programu Prism. Hodnota byla považována za signifikantní, pokud $p < 0,05$.

4.2.5.8 Metastáze

U 5 myší byl sledován výskyt plicních metastáz. Těmto myším byla aplikována dávka 3×10^5 nádorových buněk. Jakmile velikost nádoru přesáhla v jakémkoliv směru 2 cm, byly myši usmrceny cervikální dislokací a vypitvány. Zpod hrudního koše byly vyjmuty plíce. Ty byly uskladněny ve formalínu a poslány na histologickou analýzu do Českého centra pro fenogenomiku. Výskyt plicních metastáz byl posouzen pod mikroskopem BX43 u řezů obarvených hematoxylinem a eosinem.

4.2.5.9 Deplece imunitních buněk a neutralizace IFN γ

V deplečním pokusu byly myším inokulovány buď buňky TC-1 v množství 3×10^4 , nebo buňky TC-1/C9/6 v množství 3×10^5 . Depleční látky α CD4, α CD8, α NK1.1 a carrageenan IV (Ishizaka, Kuriyama and Tsujii, 1989) byly injikovány ve 200 μ l o koncentraci viz tabulka 12 a to 2 dny před inokulací nádorových buněk a následně vždy po 4 a po 3 dnech až do ukončení pokusu. α IFN γ byl injikován ve 200 μ l o koncentraci viz tabulka 12 a to 2 dny před inokulací nádorových buněk a poté 5., 12., 19., 26. den po inokulaci. Jako kontrolní látka byl použit PBS.

Tabulka 12: Látky použité k depleci imunitních buněk.

Depleční látka	Množství (μ g/200 μ l PBS)
α CD4	100
α CD8	100
α NK1.1	100
α IFN γ	300
carrageenan IV	1000

5 Výsledky

5.1 Inaktivace genu *B2m* pomocí systému CRISPR/Cas9

Pro navržení oligonukleotidů komplementárních k sekvenci myšního genu *B2m* byla z databáze NCBI stažena sekvence *B2m* a dle ní byla v *online softwaru* <http://crispr.mit.edu/> navržena dvě cílová místa pro CRISPR/Cas9 o délce 20 bází. K cílovým místům byly nasyntetizovány přesahující 3' konce a zároveň byly nasyntetizovány komplementární oligonukleotidové sekvence. U oligonukleotidů byl nejprve proveden *annealing*, a to B2m-a s B2m-b a B2m-c s B2m-d. Spojené komplementární oligonukleotidy B2m-A a B2m-C byly následně ligací vloženy do plazmidu *CRISPR Nuclease vector*. K transformaci ligační směsi a namnožení plazmidů byly použity kompetentní buňky *Escherichia coli* XL-1 Blue. Před samotnou transformací byla určena transformační účinnost kompetentních *E. coli* XL-1 Blue, která se rovnala $8,16 \times 10^7$ CFU/ μ g. Jelikož po transformaci nevyrostly žádné kolonie, byla provedena nová ligace s použitím soupravy *Rapid DNA ligation kit*. Z narostlých kolonií rezistentních na ampicilin bylo 10 kolonií s plazmidem pB2m-A a 10 kolonií s plazmidem pB2m-C přeočkováno a namnoženo. Po namnožení plazmidů v buňkách byla vyizolována plazmidová DNA a sekvenací bylo ověřeno správné vložení oligonukleotidů (obr. 8)

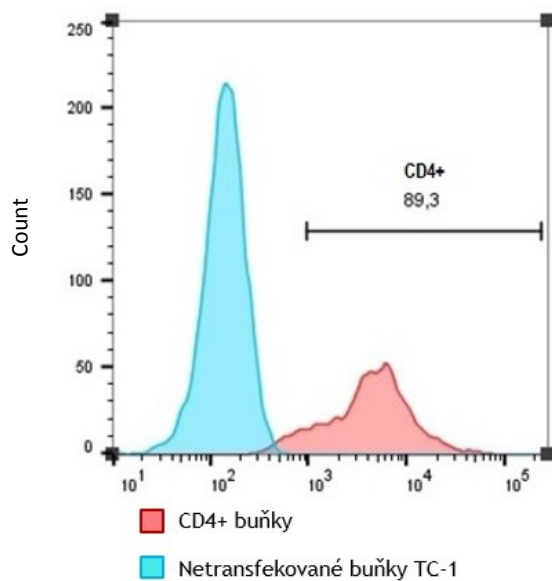


Obr. 8: Výsledky sekvenace plazmidů. Na prvním řádku je zobrazena referenční sekvence plazmidu vytvořeného v Clone Manageru. V červeném rámečku jsou znázorněny vkládané oligonukleotidy B2m-a a B2m-c. a) Sekvence plazmidových DNA pB2m-A. B) Sekvence plazmidových DNA pB2m-C.

Na základě sekvenace plazmidové DNA můžeme říct, že došlo ke správnému vložení oligonukleotidů do plazmidu *CRISPR Nuclease vector* za vzniku plazmidů pB2m-A a pB2m-C, a to u všech sekvenovaných vzorků.

5.2 Transfekce plazmidů pB2m-A a pB2m-C do TC-1 buněk

K vytvoření nádorové linie s inaktivovaným B2m byly plazmidy pB2m-A a pB2m-C pomocí lipofectaminu transfekovány do buněk TC-1. Součástí těchto plazmidů byl reportérový gen pro lidský protein CD4, přes který byly pomocí magnetických kuliček izolovány transfekované CD4⁺ buňky. 120 buněk vyizolovaných po transfekci plazmidem pB2m-A a 120 buněk po transfekci pB2m-C bylo nasazeno na kultivační misky a zbytek buněk byl použit pro ověření úspěšnosti transfekce a izolace transfekovaných buněk průtokovou cytometrií (obr. 9).



Obr. 9: Výsledek průtokové cytometrie značící úspěšnost izolace transfekovaných CD4⁺ buněk TC-1. Buňky byly barveny protilátkou *Human CD4 R-PE conjugate*.

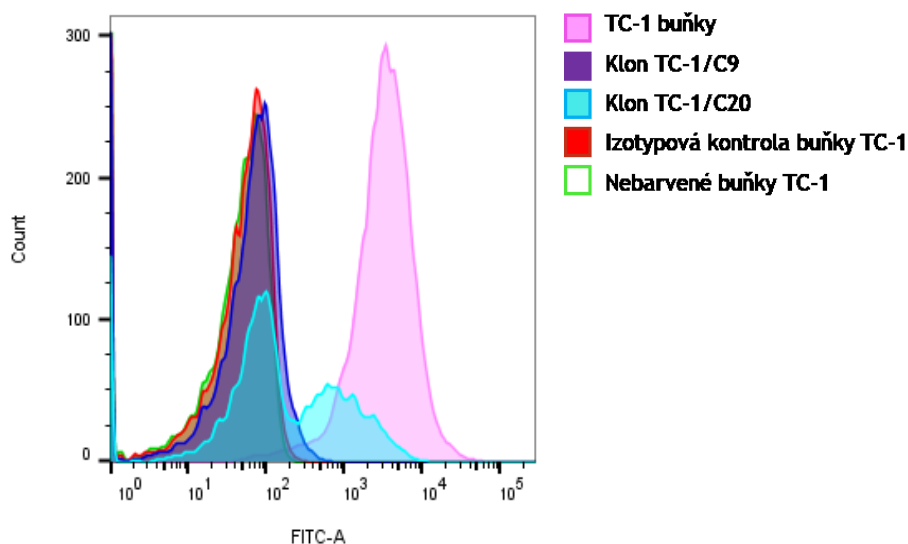
Z grafu vyplývá, že ve vyizolovaných buňkách bylo 89,3 % CD4⁺ buněk.

Na kultivačních miskách narostlo přes 20 kolonií. Z každé misky bylo vybráno 8 jednotlivě rostoucích kolonií, které byly vyizolovány a nasazeny na destičku. Z kolonií narostlých na destičce bylo vybráno 10, které byly poté znovu přepasážovány a jednotlivé klony byly následně použity pro analýzu průtokovou cytometrií.

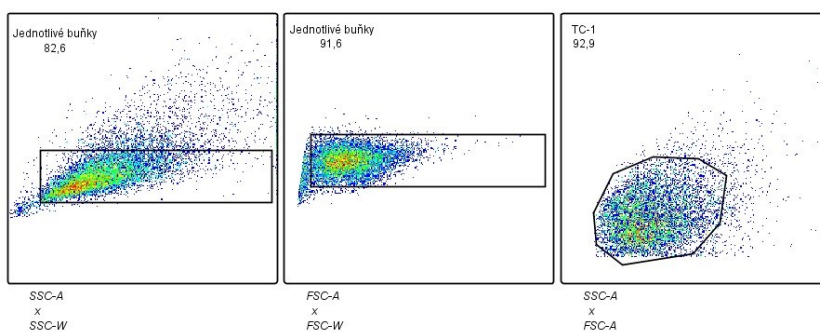
5.3 U klonů s modifikovaným B2m nedochází ke konstitutivní expresi MHCI na povrchu buněk

Průtokovou cytometrií byla ověřena inaktivace genu pro *B2m*, která vedla k zabránění produkce funkčního proteinu B2m. Jelikož B2m je spolu s α řetězcem součástí komplexu MHCI, který se dostává na povrch buněk, použili jsme k detekci inaktivace B2m měření povrchové exprese MHCI. Dle výsledků z průtokové cytometrie byly vybrány klony, které se používaly k dalšímu testování. Celkově bylo otestováno 27 klonů získaných po transfekci plazmidem pB2m-A a 24 klonů po transfekci plazmidem pB2m-C. U většiny testovaných klonů docházelo k povrchové expresi MHCI srovnatelné s původními TC-1 buňkami.

Z testovaných klonů byly pro další analýzu vybrány 2 – TC-1/C9 a TC-1/C20 (obr. 10) – získané po transfekci plazmidem pB2m-C. Při gatování byly ve dvou krocích odstraněny dublety (SSC-A \times SSC-W a FSC-A \times FSC-W) a poté byla vybrána populace TC-1 (SSC-A \times FSC-A; obr. 11).

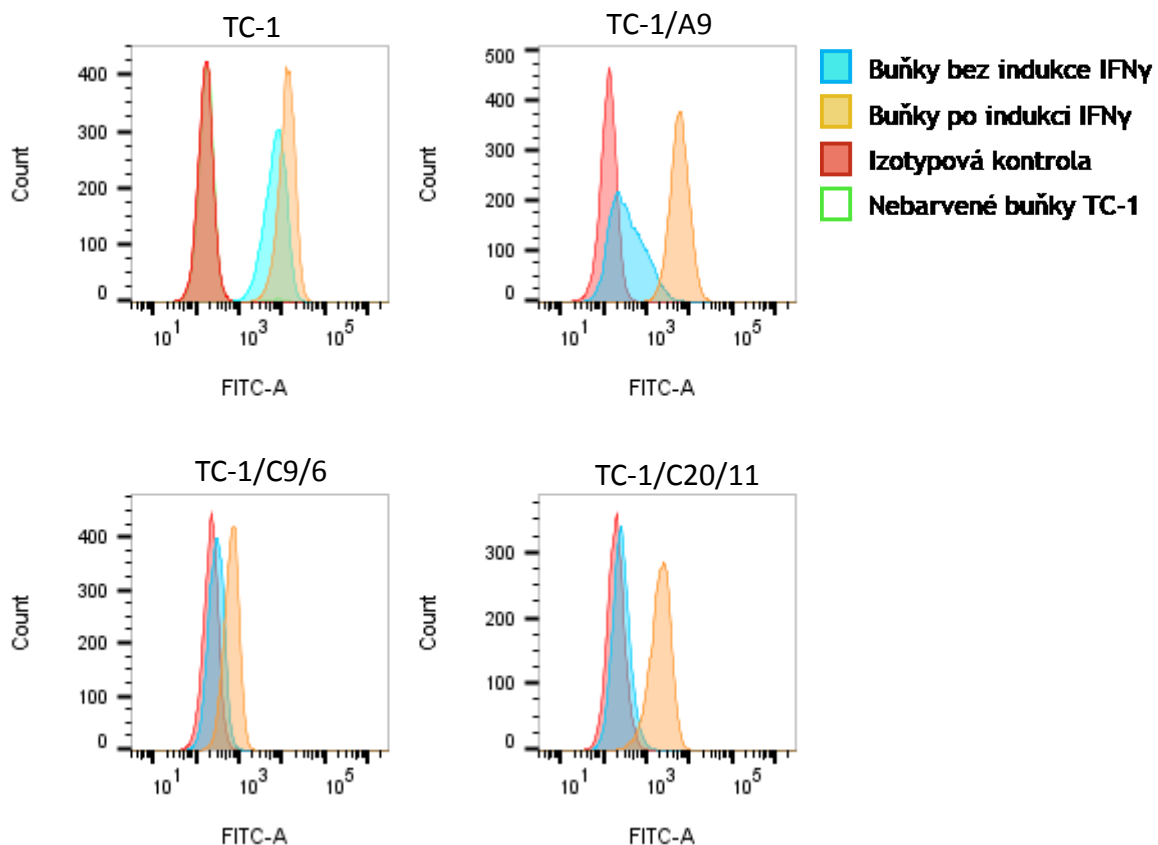


Obr. 10: Průtoková cytometrie detekující povrchovou expresi MHCI u vybraných klonů TC-1/C9 a TC-1/C20 v porovnání s původními buňkami TC-1. Buňky byly barveny protilátkou FITC anti-mouse MHC Class I. Buňky TC-1 sloužící jako izotypová kontrola byly barveny protilátkou FITC mouse IgG2b.



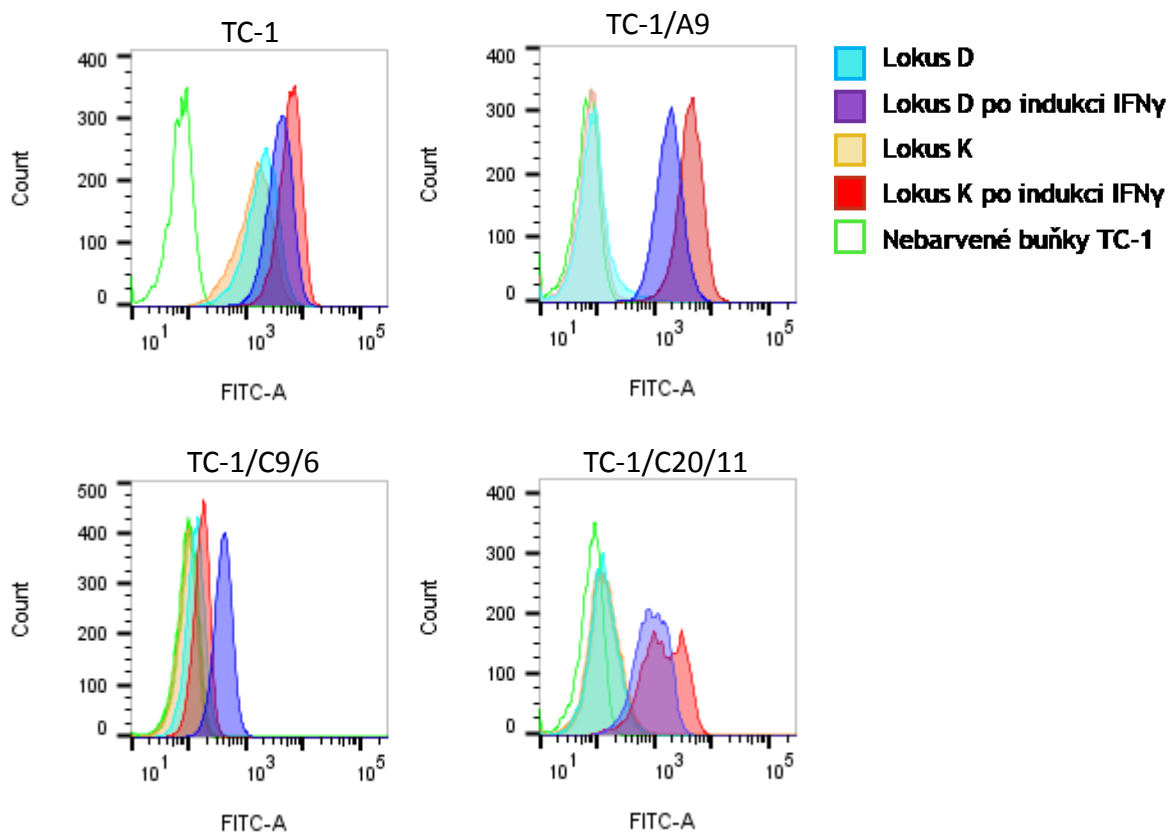
Obr. 11: Gatovací strategie pro selekci buněk TC-1 a jejich klonů pro další analýzu.

Jak je patrné z grafu, u klonu TC-1/C20 byly detekovány jak buňky MHCII⁺, tak MHCII⁻, což znamená, že pochází buď z více než jedné buňky, nebo u něj došlo k inaktivaci 2. alely *B2m* až po vysetí buněk na misku. Jelikož při opakované průtokové cytometrii byla i u klonu TC-1/C9 detekovaná MHCII⁺ populace, byly oba klony, TC-1/C9 a TC-1/C20, dále rozklonovány a opětovně testovány průtokovou cytometrií. Na obr. 11 jsou zobrazeny histogramy získané z průtokové cytometrie vybraných klonů TC-1/C9/6 a TC-1/C20/11. Produkce MHCII byla porovnána s originálními TC-1, které jsou MHCII⁺, a s klonem TC1/A9 s reverzibilně sníženou produkcí MHCII. Zároveň byla porovnána produkce MHCII po indukci IFN γ (obr. 12).



Obr. 12: Průtoková cytometrie – porovnání povrchové exprese MHCII u buněk TC-1, klonu TC-1/A9 s reverzibilně sníženou expresí MHCII a vybraných klonů s inaktivovaným genem *B2m*. Buňky byly barveny protilátkou FITC anti-mouse H-2K^b/H-2D^b. Buňky sloužící jako izotypová kontrola byly barveny protilátkou FITC mouse IgG2a,κ. Indukce IFN γ při koncentraci 200 U/ml probíhala po dobu 2 dní.

Z výsledků průtokové cytometrie vyplývá, že oba zvolené klony jsou MHCII negativní, ale po indukci IFN γ vykazují slabou pozitivitu na MHCII. Myši C57BL/6 mají dva lokusy kódující těžké řetězce MHCII – K a D. Pro zjištění, zda dochází ke zvýšené povrchové expresi MHCII pouze u molekul z jednoho lokusu K nebo D, nebo obou, byla provedena průtoková cytometrie s protilátkami specifickými pro jednotlivé lokusy (obr. 13).

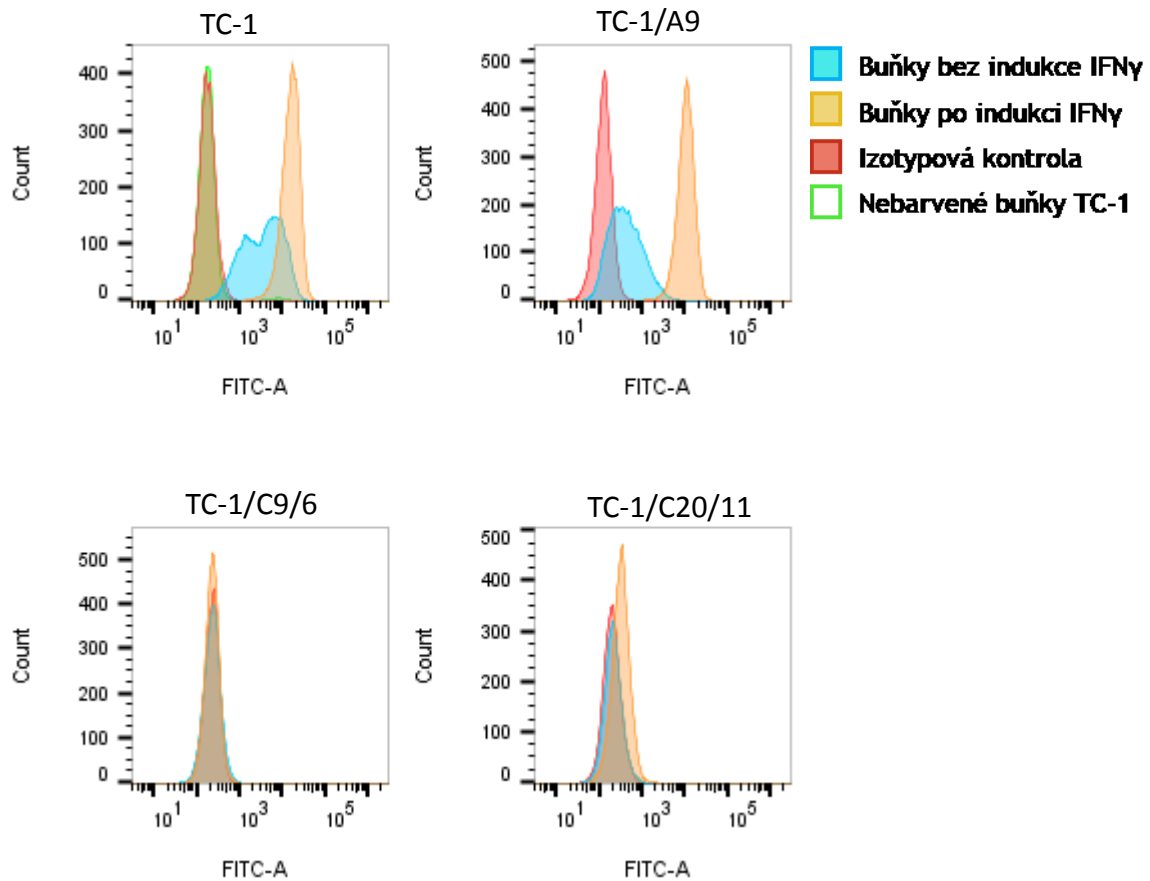


Obr. 13: Průtoková cytometrie porovnávající povrchovou expresi MHC I lokusů K a D u původních buněk TC-1, klonu TC-1/A9 s reverzibilně sníženou expresí MHC I a vybraných klonů s inaktivovaným genem *B2m*. Buňky byly barveny protilátkami FITC MHC Class I H-2K^b a FITC MHC Class I H-2D^b. Indukce IFN γ při koncentraci 200 U/ml probíhala po dobu 2 dní.

Z průtokové cytometrie detekující povrchovou expresi MHC I z jednotlivých lokusů vyplývá, že u klonu TC-1/C9/6 dochází ke slabé indukci molekul z obou lokusů, nicméně molekuly z lokusu D se po působení IFN γ dostávají na povrch buňky ve větší míře. U klonu TC-1/C20/11 dochází k silnější indukci molekul z obou lokusů.

5.4 Klony s modifikovaným *B2m* jsou negativní na povrchovou expresi B2m

Jelikož byl inaktivován gen *B2m* a všechny testované klony byly po indukci IFN γ slabě pozitivní na MHCI, byla průtokovou cytometrií otestována povrchová exprese samotného B2m (obr. 14).

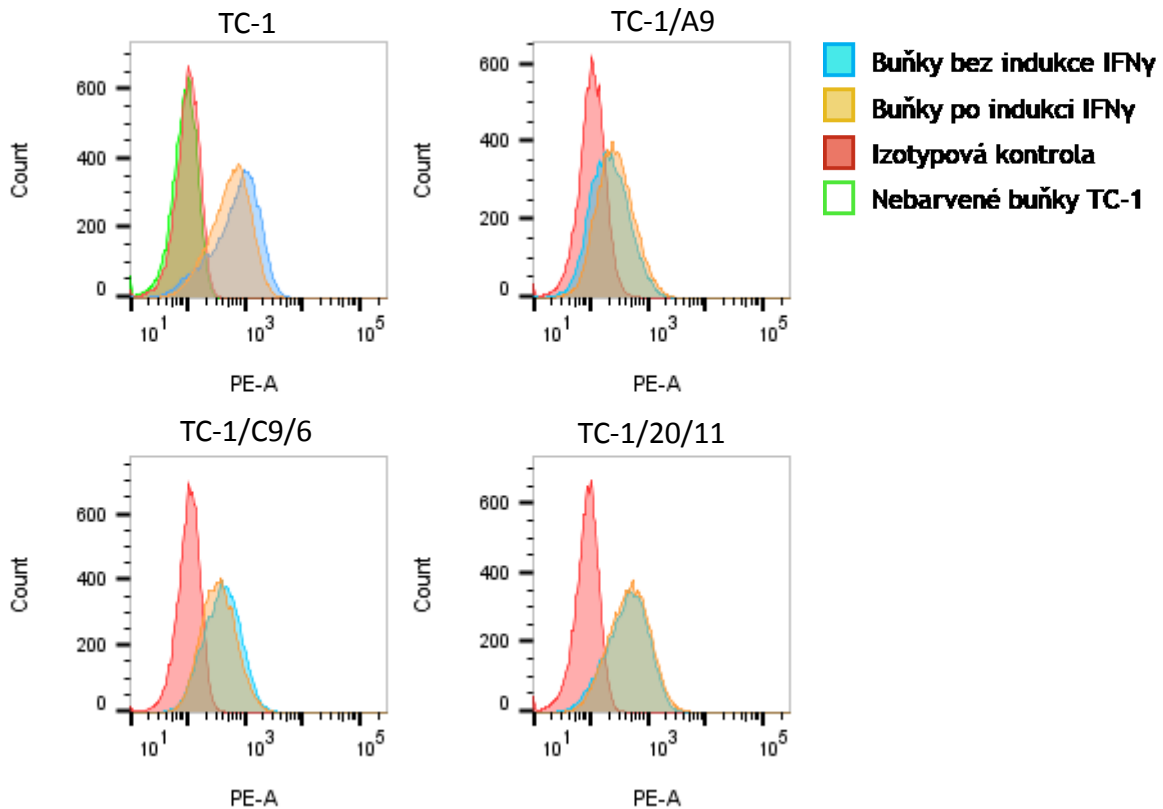


Obr. 14: Průtoková cytometrie – porovnání povrchové exprese B2m u buněk TC-1, klonu TC-1/A9 s reverzibilně sníženou expresí MHCI a vybraných klonů s inaktivovaným genem *B2m*. Buňky byly barveny primární protilátkou B2-Microglobulin a sekundární protilátkou FITC goat anti-mouse Ig. Buňky sloužící jako izotypová kontrola byly barveny sekundární protilátkou FITC goat anti-mouse Ig. Indukce IFN γ při koncentraci 200 U/ml probíhala po dobu 2 dní.

Průtokovou cytometrií detekující povrchovou expresi B2m bylo dokázáno, že u klonu TC-1/C9/6 nedochází k produkci funkčního B2m, a to ani po indukci IFN γ .

5.5 Povrchová exprese CD1d nebyla ovlivněna inaktivací B2m

Jelikož B2m může tvořit komplexy nejen s α řetězcem MHC I, ale i s neklasickými MHC I molekulami CD1d, byla provedena průtoková cytometrie pro detekci CD1d na povrchu původních buněk TC-1, u buněk TC-1/A9 s reverzibilně sníženou expresí MHC I a u vytvořených klonů TC-1/C9/6 a TC-1/C20/11 (obr. 15).

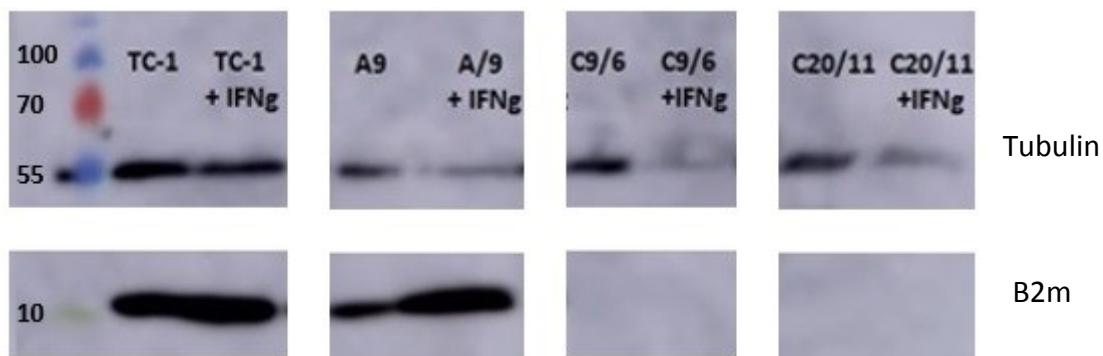


Obr. 15: Průtoková cytometrie porovnávající povrchovou expresí CD1d u originálních buněk TC-1, klonu TC-1/A9 s reverzibilně sníženou expresí MHC I a vybraných klonů s inaktivovaným genem *B2m*. Buňky byly barveny protilátkou PE Rat Anti-Mouse CD1d. Buňky TC-1 sloužící jako izotypová kontrola byly barveny protilátkou PE anti-mouse IgG2a. Indukce IFN γ při koncentraci 200 U/ml probíhala po dobu 2 dní.

Dle histogramů z průtokové cytometrie lze usuzovat na to, že inaktivace B2m nezabraňuje vycestování CD1d na povrch buněk.

5.6 U vybraných klonů TC-1/C9 a TC-1/C20 nedochází k produkci B2m.

Zároveň s průtokovou cytometrií byla produkce B2m u vybraných klonů TC-1/C9/6 a TC-1/C20/11 testována i pomocí WB (obr 16).

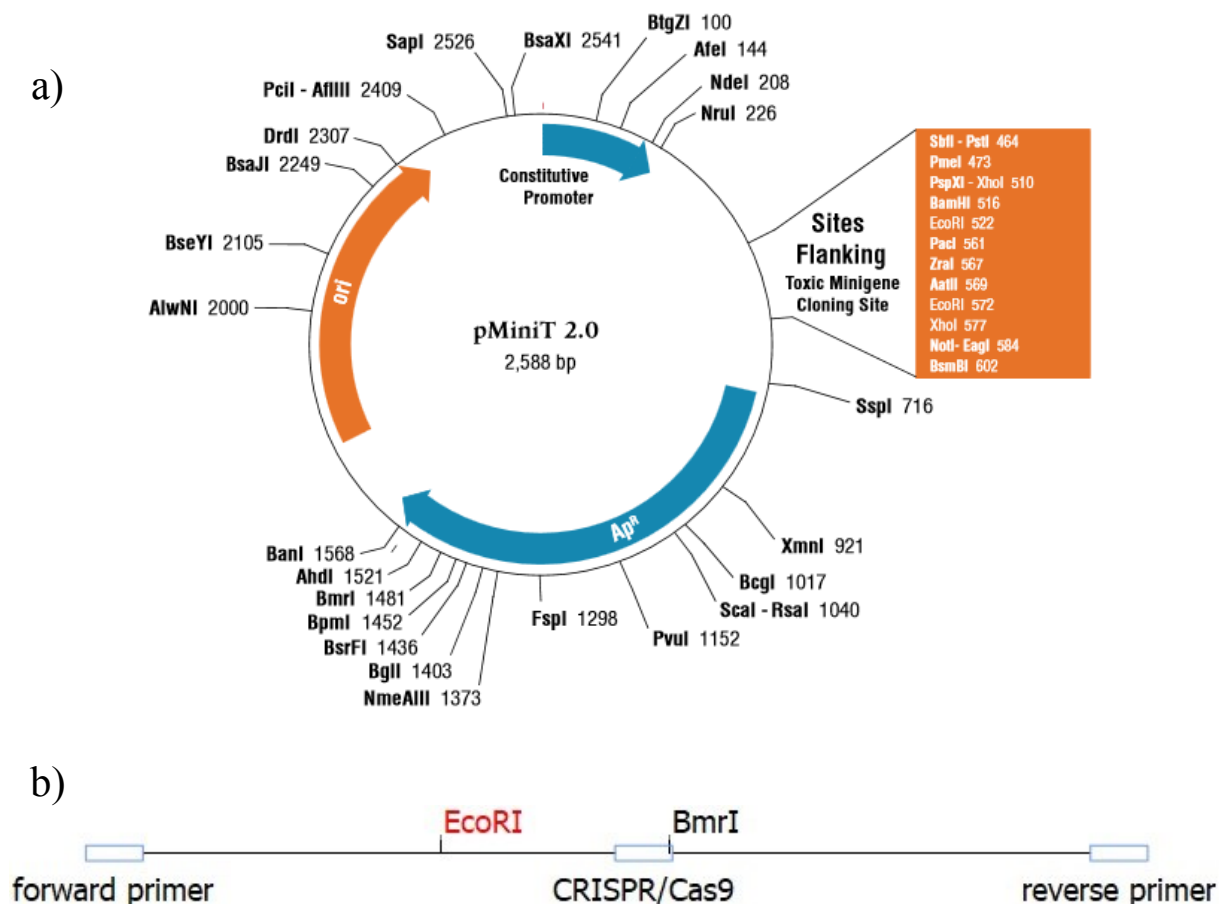


Obr. 16: Western blot porovnávající produkci B2m u originálních buněk TC-1, klonu TC-1/A9 s reverzibilně sníženou expresí MHC I a vybraných klonů s inaktivovaným genem *B2m*. Buňky byly nasazeny dva dny předem, každý klon byl inkubován i s 200 U/ml IFN γ . Poté byly vytvořeny lyzáty s využitím modifikovaného Laemmliho lyzačního pufru. Vzorky byly analyzovány na 12% gelu SDS PAGE a přebíly na polyvinylidenfluoridovou membránu, která byla barvena protilátkou proti B2m a protilátkou proti tubulinu. Velikost B2m je 12 kD. Tubulin (55 kD) byl použit jako kontrola naneseného množství vzorku. Jako marker byl použit *Prestained Protein Ladder PageRuler*.

Na výsledku z WB lze vidět, že u buněk TC-1 dochází k produkci B2m, u klonu TC-1/A9 s reverzibilně sníženou expresí dochází k nízké tvorbě B2m, která je zvýšená po indukci IFN γ a u vybraných klonů TC-1/C9/6 a TC-1/C20/11 k produkci B2m nedochází, a to ani po indukci IFN γ .

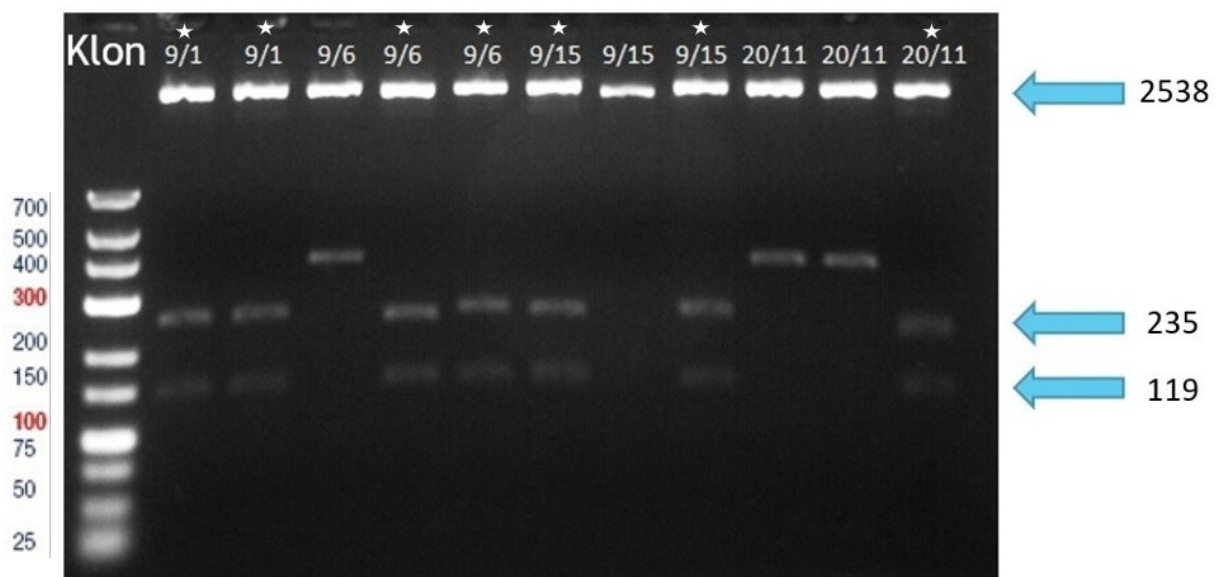
5.7 Inaktivace všech alel *B2m* byla ověřena sekvenací

Jelikož ze začátku nebyla k dispozici protilátka detekující expresi *B2m* a nedařilo se ním získat buněčné klony s úplnou inaktivací povrchové exprese MHCII, uvažovali jsme o tom, že došlo k inaktivaci pouze jedné alely genu *B2m*. Byla proto provedena sekvenace jednotlivých alel genu *B2m*. K tomu byla izolována genomová DNA z vybraných klonů po inaktivaci *B2m*. Pomocí PCR byl namnožen zvolený úsek o délce 354 nukleotidů obsahující cílovou oblast CRISPR/Cas9. PCR směs byla separována na gelové elektroforéze a fragment o správné velikosti byl vyizolován. Tento fragment DNA byl následně vložen do vektoru pMiniT (obr. 17), a to do klonovací oblasti plazmidu s toxickým minigenem, který se vložením fragmentu *B2m* inaktivoval, a tak umožnil přežití a proliferaci kompetentních buněk natransformovaných plazmidem.



Obr. 17: a) Plazmid pMiniT 2.0 s vyznačenými štěpnými místy a klonovací oblastí. b) Namnožený úsek genomové DNA vybraných klonů obsahující cílovou oblast CRISPR/Cas9 s vyznačenými štěpnými místy, který byl vkládán do plazmidu.

Pro ověření správnosti vložení amplifikované oblasti *B2m* do plazmidu pMiniT byla z bakterií vyizolována plazmidová DNA, která byla následně naštěpena restriční endonukleázou EcoRI. V plazmidu pMiniT se na okrajích inzertu nacházela 2 štěpná místa pro EcoRI a ve vkládaném úseku se nacházelo 1 štěpné místo pro EcoRI. Po naštěpení tedy vznikly 3 fragmenty DNA, které by v případě nezměněné genetické informace měly mít délku 119 párů bází, 235 párů bází a 2538 párů bází. Po působení CRISPR/Cas9 a zanesení mutací do genu *B2m* se velikosti fragmentů lehce liší. Správnost vložení byla testována u bakteriálních klonů odvozených ze 4 buněčných klonů – TC-1/C9/1, TC-1/C9/6, TC-1/C9/15 a TC-1/C20/11. Velikost fragmentů byla detekována pomocí gelové elektroforézy (obr. 18), analyzováno bylo celkem 32 vzorků. Vzorky, u kterých došlo k očekávanému štěpení, jsou označeny hvězdičkou.



Obr. 18: Gelová elektroforéza znázorňující fragmenty DNA vzniklé po naštěpení plazmidu pMiniT restriční endonukleázou EcoRI. Jako marker byl použit *Gene Ruler Low Range DNA Ladder*.

Dle elektroforézy byly vybrány klony určené k sekvenaci (obr. 19). U všech sekvenovaných klonů byly nalezeny mutace v cílovém místě CRISPR/Cas9. Jednalo se především o delece, v jednom případě byla prokázána inserce a v jednom substituce.

TC-1/C9/6

```
151 ctgcagagttaagcatgccagtatggccgagcccaagaccgtctactggg
116 ctgcagagttaagcatgccagtatgg-----ctactggg
119 ctgcagagttaagcatgccagtatggccgagcccaagaccg--tactggg
119 ctgcagagttaagcatgccagtatggccgagcccaagaccg--tactggg
118 ctgcagagttaagcatgccagtatggccgagcccaagaccg--tactggg
117 ctgcagagttaagcatgccagtatggccgagcccaagaccg--tactggg
```

TC-1/C20/11

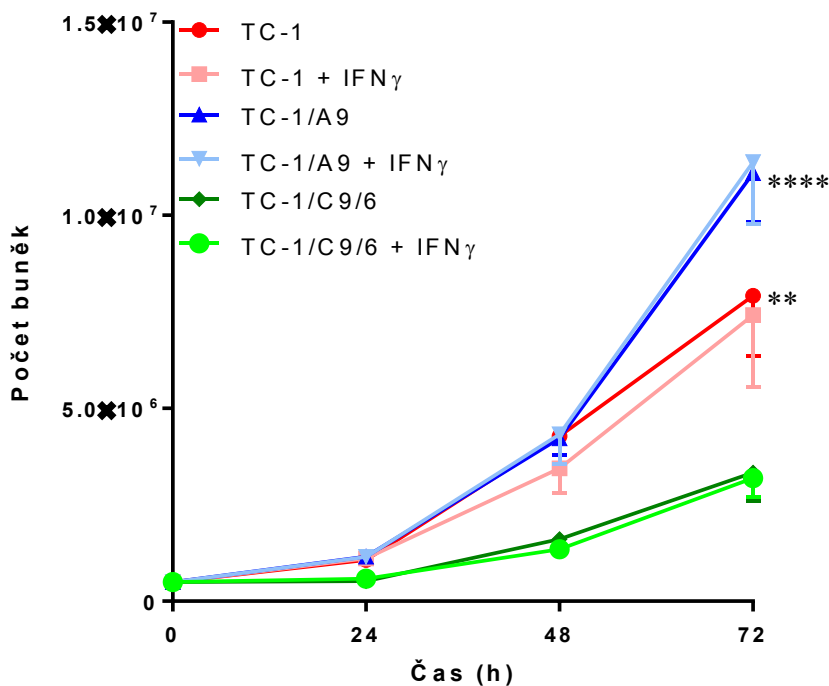
```
151 ctgcagagttaagcatgccagtatggccgagcccaagaccgtct-actggg
118 ctgcagagttaagcatgccagtatggccgagcccaagaccgtcttactggg
117 ctgcagagttaagcgtgccagtatggccgagcccaagacc-----gg
118 ctgcagagttaagcatgccagtatggccgagcccaagaccgtc--gctggg
135 ctgcagagttaagcatgccagtatggccgagcc-----
```

Obr. 19: Sekvence jednotlivých alel genu *B2m*. Mutované sekvence jsou vždy porovnány s referenční sekvencí originálního fragmentu *B2m* na 1. řádku. Červeně je vyznačeno cílové místo CRISPR/Cas9.

Sekvenací jednotlivých alel bylo ověřeno, že došlo ke vzniku mutací ve všech alelách genu. Všechny nalezené mutace vedly ke změně čtecího rámce a vzniku předčasného STOP kodonu, čímž byla zablokována translace, a tedy produkce kompletního proteinu *B2m*.

5.8 Buněčná linie TC-1/C9/6 s inaktivovaným B2m proliferuje pomaleji *in vitro*

Při provádění předchozích pokusů bylo zpozorováno, že buňky bez B2m proliferují pomaleji než původní TC-1 a klon TC-1/A9. Pro ověření byl proveden proliferační pokus, ve kterém byla srovnána rychlost růstu těchto 3 buněčných linií (obr. 20) a byl spočítán jejich čas zdvojení (tabulka 11).



Obr. 20: Proliferační křivka. Buněčné linie TC-1, TC-1/A9 a TC-1/C9/6 byly nasazeny na kulturační misky o průměru 10 cm v množství 5×10^5 buněk a následně byly buňky spočítány po 24, 48 a 72 hodinách. Indukce 200 U/ml IFN γ probíhala po dobu 2 dní. Graf zobrazuje výsledek 3 nezávislých experimentů. Statistická signifikance (**P < 0,01, ****P < 0,0001) rychlosti proliferace buněk TC-1/C9/6 v porovnání s buňkami TC-1 a TC-1/A9. Na grafu jsou vyznačeny střední chyby průměru (SEM).

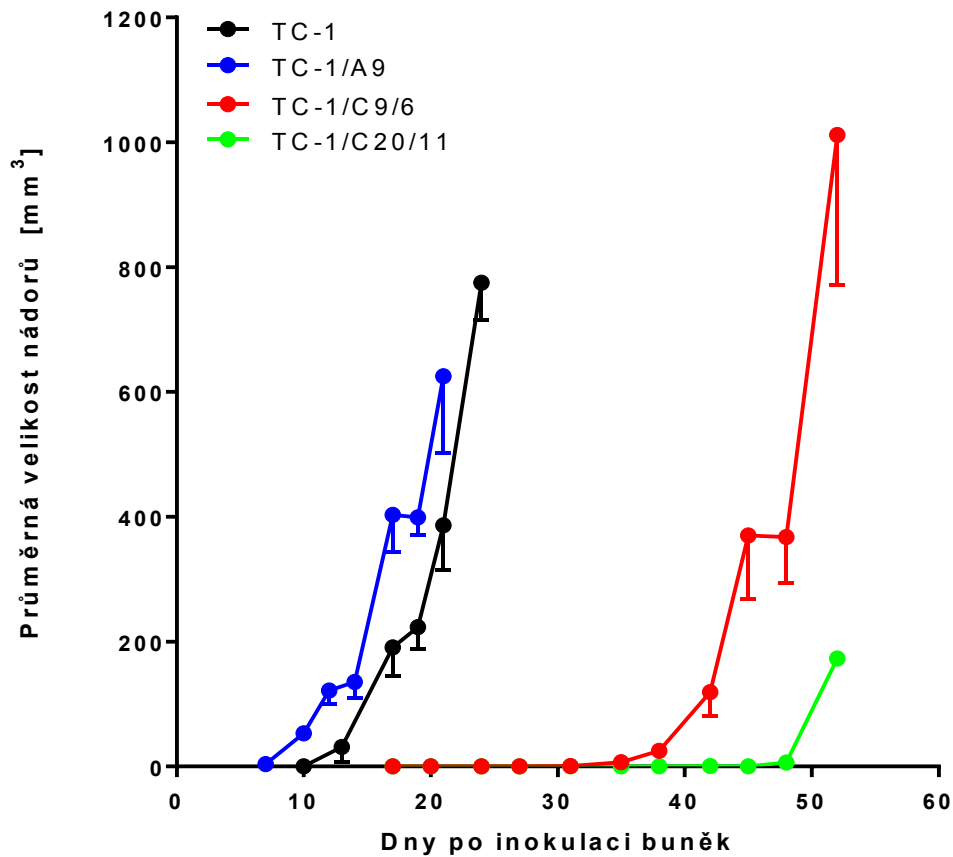
Tabulka 11: Čas zdvojení buněčných linií TC-1, TC-1/A9 a TC-1/C9/6. Čas je uveden v hodinách.

TC-1	TC-1 + IFN γ	TC-1/A9	TC-1/A9 + IFN γ	TC-1/C9/6	TC-1/C9/6 + IFN γ
18,5	19,2	16,2	16,2	27,9	27,8

Po inaktivaci B2m rostla buněčná linie TC-1/C9/6 signifikantně pomaleji než původní buňky TC-1 a buňky TC-1/A9. Čas zdvojení se prodloužil v porovnání s buňkami TC-1 z původních 18,5 hodin na 27,9 hodin. Indukce IFN γ signifikantně neovlivnila rychlost proliferace u žádné z linií, nicméně u buněk TC-1 došlo k prodloužení doby zdvojení z 18,5 h na 19,2 h.

5.9 Inaktivace B2m snížila rychlost růstu nádorů

Pro zjištění onkogenity vybraných klonů s inaktivovaným B2m (obr. 21) byly nádorové buňky inokulovány do syngenních myší C57BL/6NCrI.

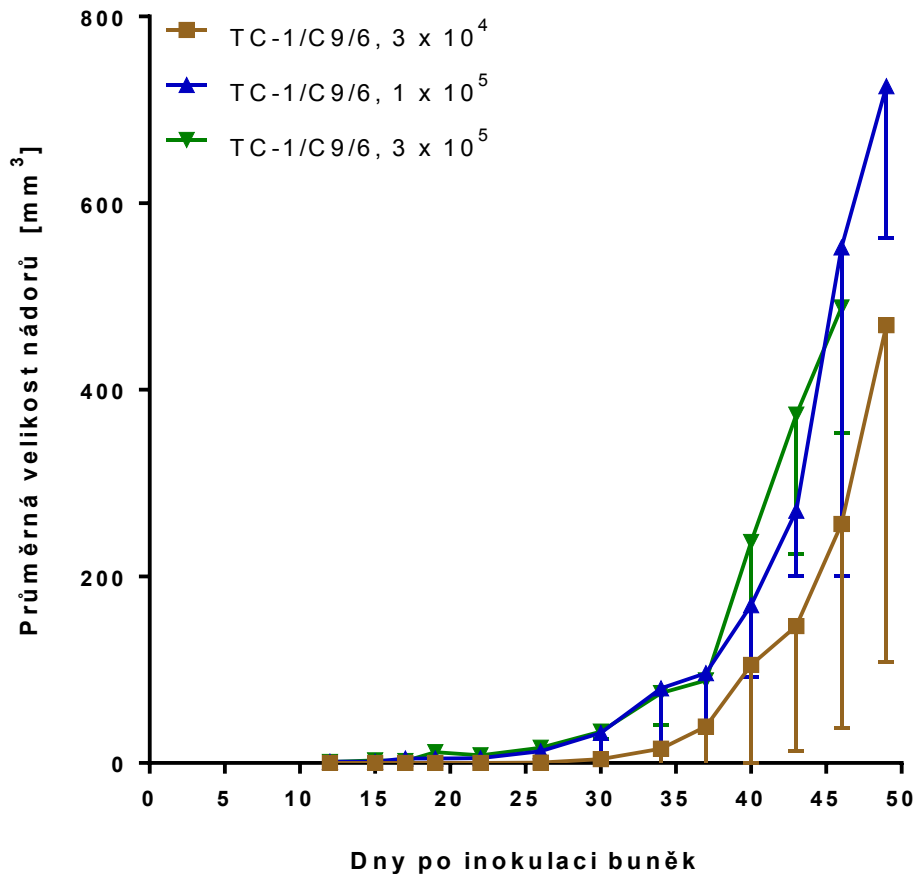


Obr. 21: Růst nádorů vyvolaných klonem TC-1/C9/6 a TC-1/C20/11. Buňky byly inokulovány subkutánně (s.c.) v množství 3×10^4 . Jako kontroly sloužily původní buňky TC-1 a buňky TC-1/A9. Na grafu jsou vyznačeny střední chyby průměru (SEM).

Vznik nádorů vyvolaný klonem TC-1/C9/6 byl o několik dní opožděn ve srovnání s nádory tvořenými původními buňkami TC-1 a od nich odvozeného klonu TC-1/A9, nicméně po vzniku nádorů byl jejich růst podobný. U myší s inokulovanými buňkami klonu TC-1/C20/11 se nádor vytvořil pouze u jedné myši.

5.10 Růst nádorů vyvolaný buňkami TC-1/C9/6 je rychlejší po inokulaci většího množství buněk

Jelikož buňky s inaktivovaným B2m tvořily nádory později než původní buňky TC-1, byl testován růst nádorů při podání nádorových buněk ve vyšším množství (obr. 22).

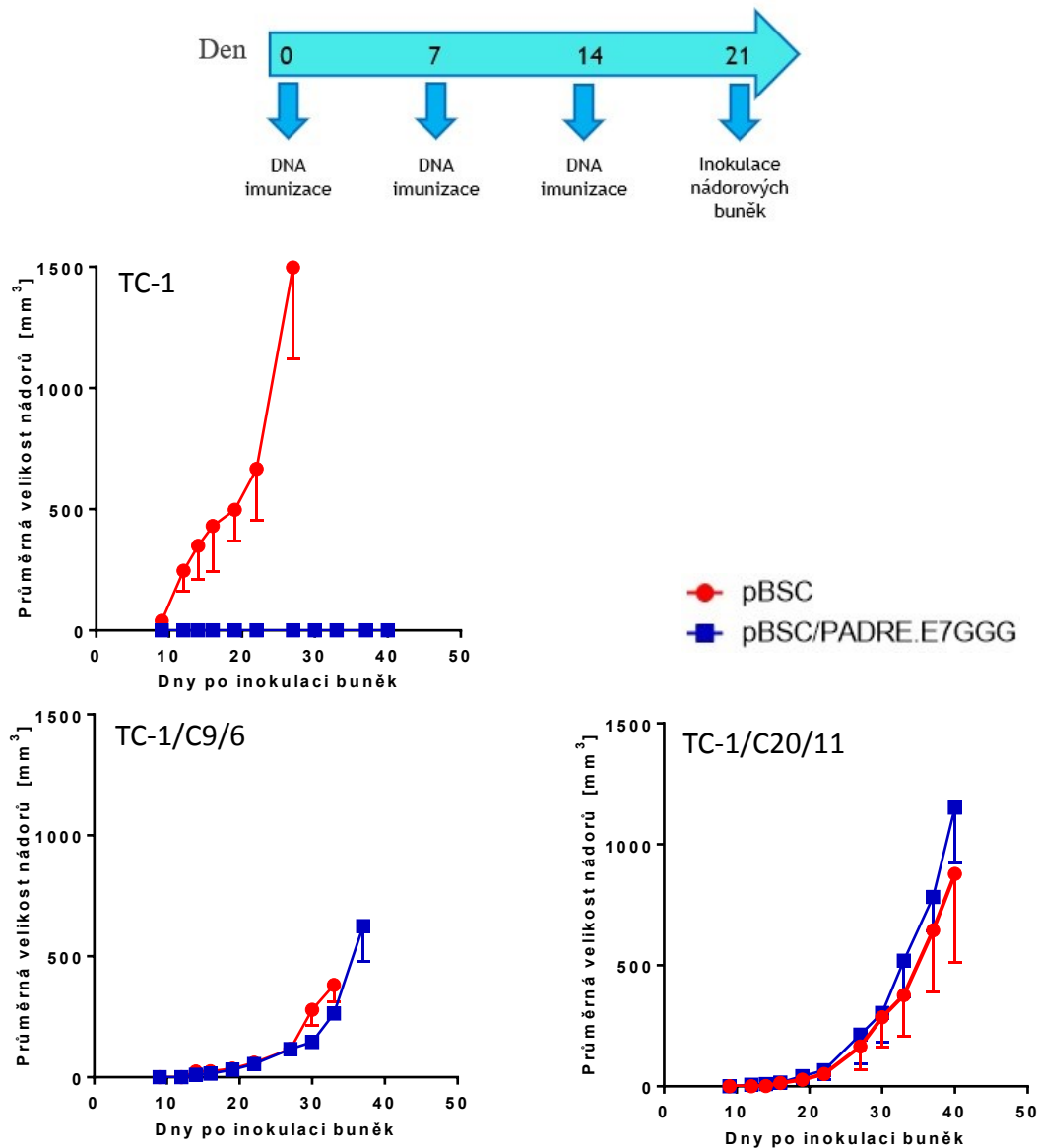


Obr. 22: Onkogenita nádorových buněk při různých koncentracích. Linie TC-1/C9/6 byla inokulována s.c. v množství 3×10^4 , 1×10^5 a 3×10^5 buněk. Na grafu jsou vyznačeny střední chyby průměru (SEM).

Při inokulaci nádorových buněk ve větším množství došlo k rychlejšímu růstu nádorů, přičemž ke vzniku nádorů došlo u všech myší. Pro další pokusy byla k vyvolání růstu nádorů zvolena dávka 3×10^5 nádorových buněk.

5.11 Klony TC-1/C9/6 a TC-1/C20/11 nejsou citlivé k DNA imunizaci

U klonů TC-1/C9/6 a TC-1/C20/11 byla testována jejich citlivost k DNA imunizaci v porovnání s citlivostí buněk TC-1 (obr. 23). K DNA imunizaci byl použit plazmid pBSC/PADRE.E7GGG. Tato vakcína vyvolává specifickou imunitní odpověď proti onkoproteinu E7.

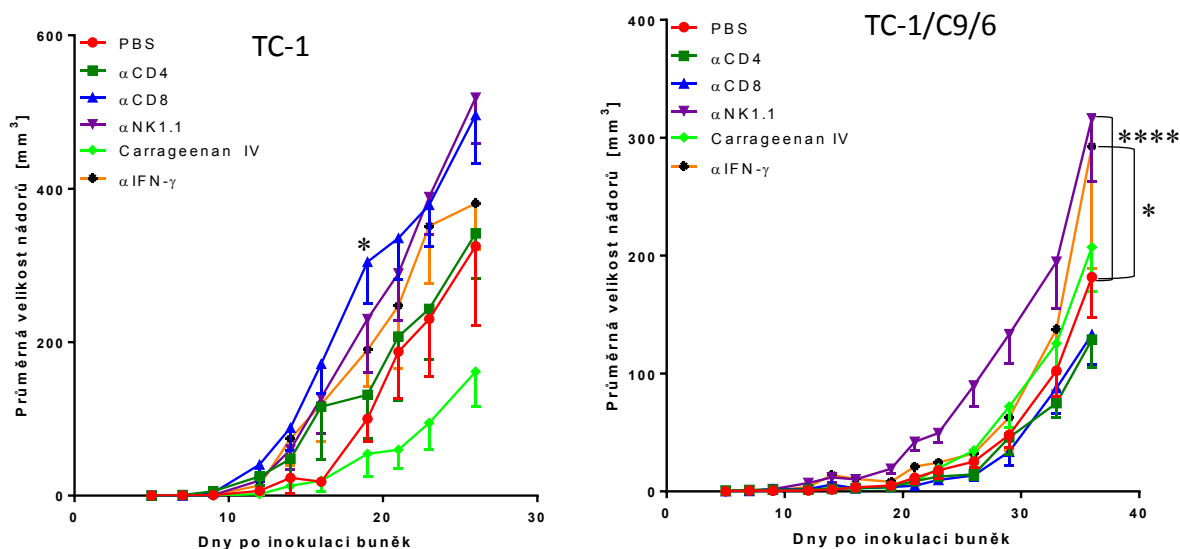


Obr. 23: Citlivost k imunizaci u buněk TC-1 a u vybraných klonů TC-1/C9/6 a TC-1/C20/11. Myši byly imunizovány 3× vždy 2 μg DNA – buď plazmidem pBSC/PADRE.E7GGG, nebo kontrolním plazmidem pBSC. Poté byly inokulovány s.c. nádorové buňky TC-1 v množství 3×10^4 nebo buňky TC-1 C9/6 a TC-1/C20/11 v množství 3×10^5 . Na grafu jsou vyznačeny střední chyby průměru (SEM).

Z grafů vyplývá, že klony TC-1/C9/6 a TC-1/C20/11 nejsou citlivé k DNA imunizaci, narozdíl od buněk TC-1, po jejichž inokulaci nevznikl nádor u žádné myši. Při vyšší dávce nádorových buněk vyrostly i nádory indukované buňkami TC-1/C20/11, ač při dávce 3×10^4 nádorových buněk vyrostl nádor pouze u jedné myši (viz 5.9).

5.12 Hlavní roli v protinádorové imunitě hrají u nádorů vyvolaných buňkami TC-1/C9/6 NK1.1⁺ buňky

Pro zjištění, které buňky zprostředkovávají u nádorů způsobených buněčnou linií TC-1/C9/6 protinádorovou odpověď, byly buněčné populace CD4⁺ T lymfocytů, CD8⁺ T lymfocytů a NK1.1⁺ buněk depletovány protilátkami. Zároveň byl protilátkou neutralizován cytokin IFN γ . Populace makrofágů byla depletována sulfatovaným mukopolysacharidem *carrageenan IV* (obr. 24).



Obr. 24: Deplece populací imunitních buněk a neutralizace IFN γ *in vivo*. CD4⁺ T lymfocyty, CD8⁺ T lymfocyty a NK1.1⁺ buňky byly depletovány protilátkami a makrofágy byly depletovány *carrageenem*. IFN γ byl neutralizován protilátkou. α CD4 (100 μ g), α CD8 (100 μ g), α NK1.1 (100 μ g) a *carrageenan* (1 mg) byly injikovány dva dny před inokulací nádorových buněk a následně vždy 2 \times týdně až do ukončení pokusu. α IFN γ (300 μ g) byla injikována dva dny před inokulací nádorových buněk a poté 4 \times vždy po týdnu. Pro tento pokus byly myšim inokulovány buňky TC-1 v množství 3×10^4 a buňky TC-1/C9/6 v množství 3×10^5 . Statistická signifikance udává porovnání (*P < 0,05, ****P < 0,0001) průměrné velikosti nádorů po depleci imunitních populací se skupinou bez deplece. Na grafu jsou vyznačeny střední chyby průměru (SEM).

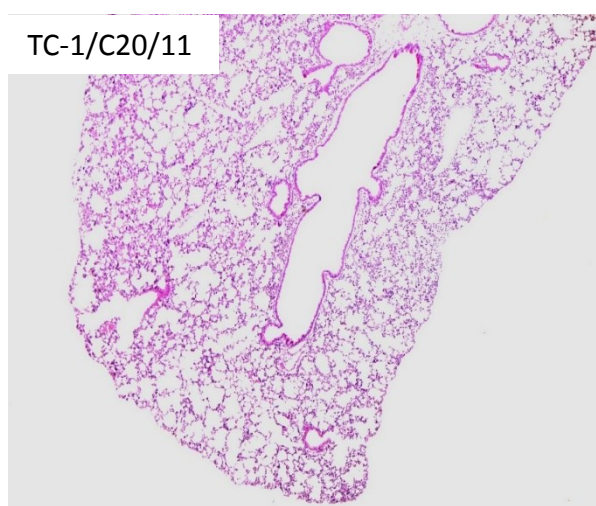
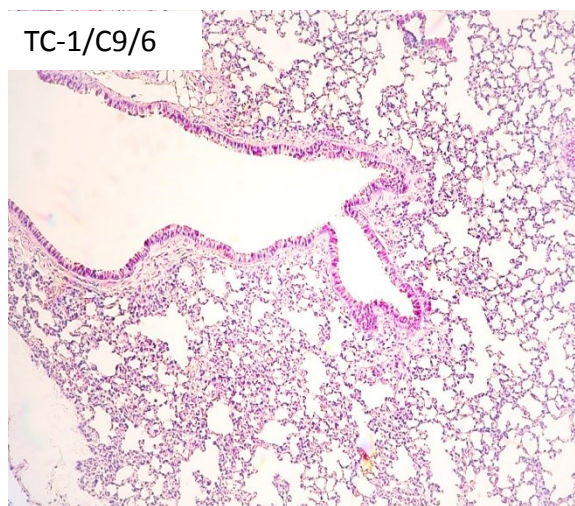
V imunitě proti nádorům vyvolaných buňkami TC-1/C9/6 hrají hlavní úlohu NK1.1⁺ buňky, přičemž důležitou roli hraje IFN γ . CD8⁺ a CD4⁺ T lymfocyty nehrají při ochraně před nádory roli. U buněk TC-1 jsou hlavními efektorovými buňkami CD8⁺ T lymfocyty a NK1.1⁺ buňky. Důležitou roli hraje též produkce cytokinu IFN γ . Makrofágy podporují růst nádorů vyvolaných

buňkami TC-1, u nádorů vyvolaných buňkami TC-1/C9/6 však jejich deplece neovlivnila růst nádorů.

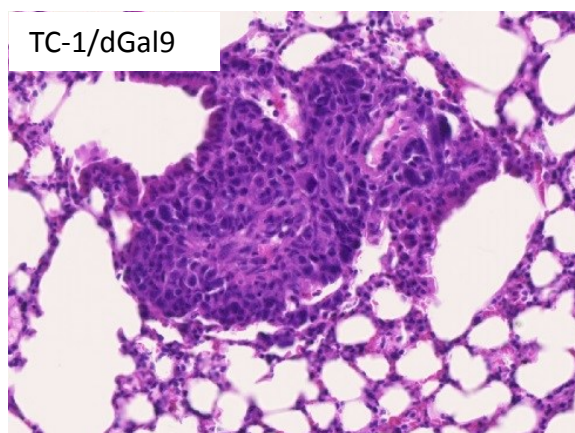
5.13 Nádory pocházející z buněk s inaktivovaným B2m netvoří metastáze v plicích

Buňky TC-1 aplikované subkutánně netvoří metastáze. Nicméně inaktivace MHCI může ovlivnit metastatickou aktivitu nádorových buněk. Proto byly plice myši s inokulovanými buňkami TC-1/C9/6 a TC-1/C20/11 vyjmuty a prohlédnuty, zda se v nich nevytvořily makrometastázy viditelné okem. Jelikož makrometastázy nebyly nalezeny, byly plice analyzovány v histologické laboratoři. Na mikroskopických snímcích (obr. 25) nebyly nalezeny mikrometastázy.

a)



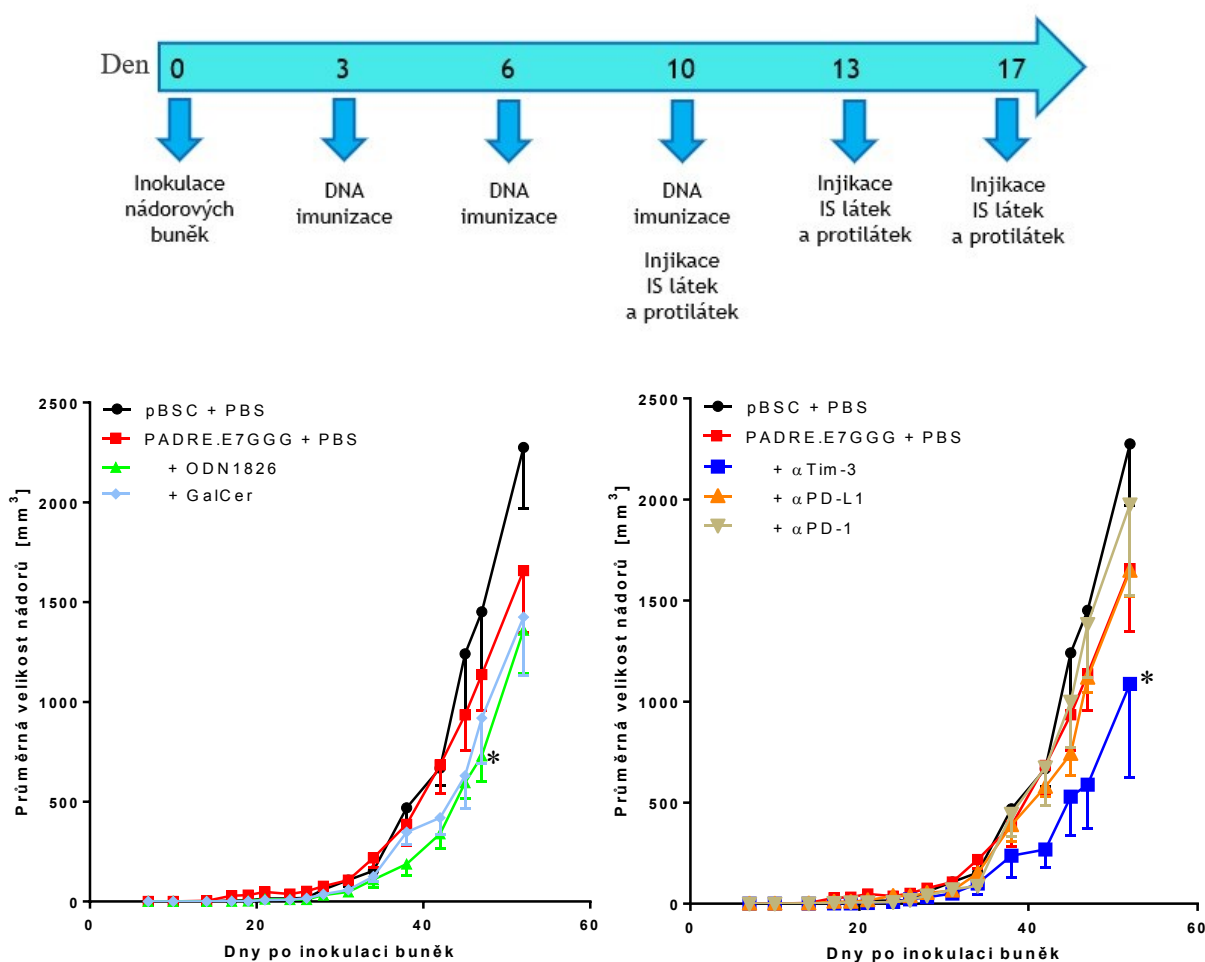
b)



Obr. 25: Řezy plic. a) Myšim byly inokulovány nádorové buňky TC-1/C9/6 a TC-1/C20/11 v množství 3×10^5 . Poté, co velikost nádorů přesáhla v jakémkoliv směru 2 cm, byly myši usmrceny cervikální dislokací a byly z nich vyjmuty plice. Barvení hematoxylinem a eosinem. Zvětšení 40x. b) Pro srovnání – plicní metastázy vytvořené buňkami TC-1 s inaktivovaným galektinem 9. Zvětšení 100x.

5.14 Teraupeutické pokusy

Po vytvoření a charakterizaci klonů s inaktivovaným B2m byly provedeny imunoterapeutické pokusy. Dle předchozích výsledků byl pro tyto pokusy zvolen klon TC-1/C9/6. Nejprve se testoval účinek DNA vakcinace v kombinaci s IS látkami ODN1826 a GalCer a protilátkami α Tim-3, α PD-L1 a α PD-1 (obr. 26).

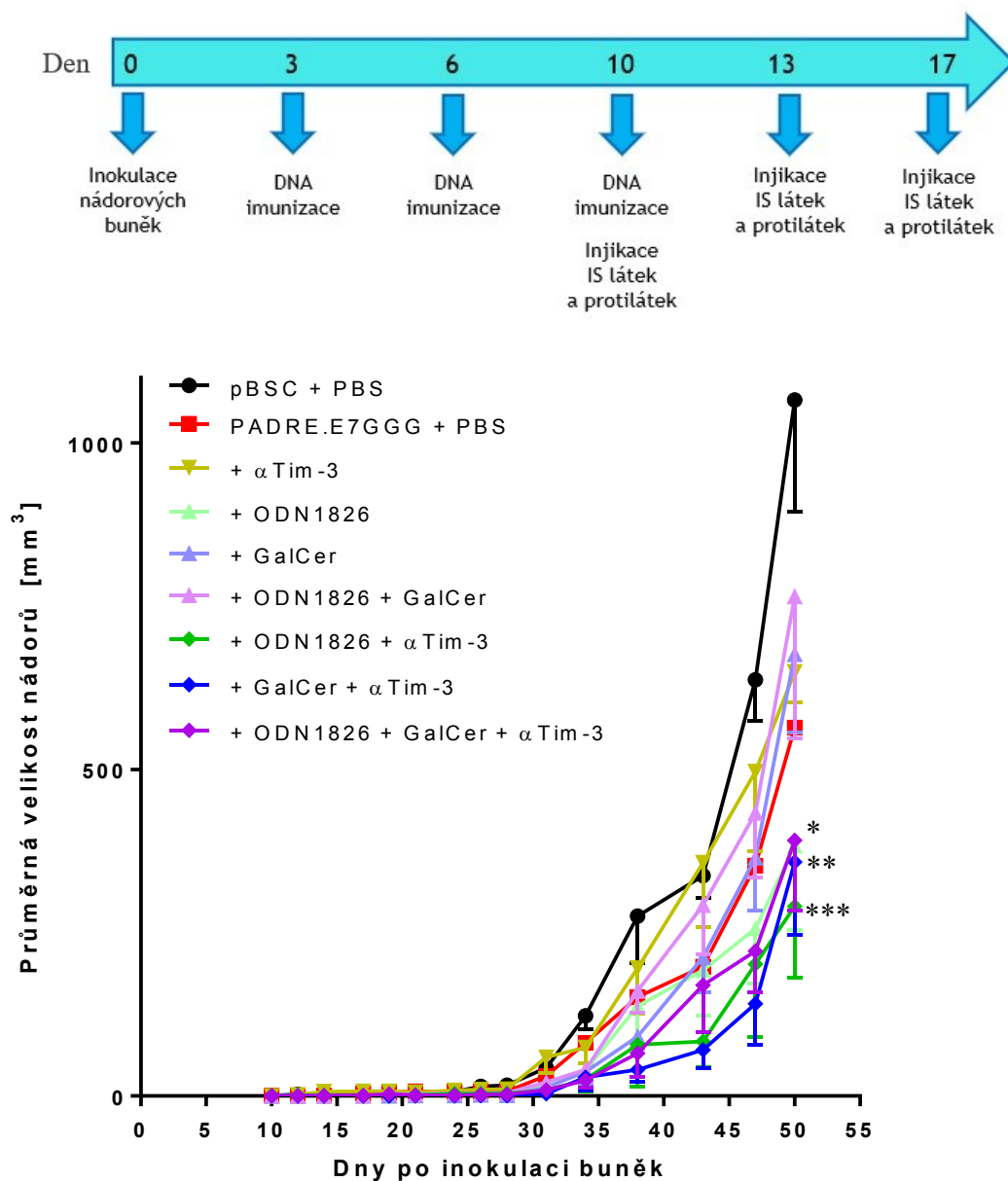


Obr. 26: Imunoterapie nádorů. Myším byly inokulovány s.c. nádorové buňky v množství 3×10^5 , poté byly myši $3 \times$ imunizovány 2 μ g plazmidu pBSC/PADRE.E7GGG a následně jim byly $3 \times$ intraperitoneálně (i. p.) podány adjuvantia. K injikaci byly použity IS látky ODN1826 (50 μ g) a GalCer (2 μ g) a blokační protilátky α Tim3 (200 μ g), α PD-1 (200 μ g) a α PD-L1 (200 μ g). Jako kontrolní plazmid byl použit pBSC a jako kontrola pro protilátky a IS látky byl použit PBS. Statistická signifikance udává porovnání (* $P < 0,05$) průměrné velikosti nádorů se skupinou imunizovanou pBSC/PADRE.E7GGG + PBS. Na grafu jsou vyznačeny střední chyby průměru (SEM).

Adjuvantní efekt se projevil u skupiny, která byla očkována ODN1826. Velikost nádorů 48. den po inokulaci nádorových buněk byla signifikantně nižší v porovnání se skupinou, která byla pouze imunizována DNA vakcinací. Podobně to bylo u skupiny očkové protilátkou α Tim-3, u které byla zaznamenána signifikantně menší velikost nádorů 52. den po inokulaci nádorových

buněk. U skupin myši, které byly očkovány α PD-1 nebo α PD-L1 nebylo zaznamenáno zmenšení velikosti nádorů v porovnání se skupinou, která byla pouze imunizována DNA vakcínou, a proto s těmito protilátkami nebyly provedeny další pokusy.

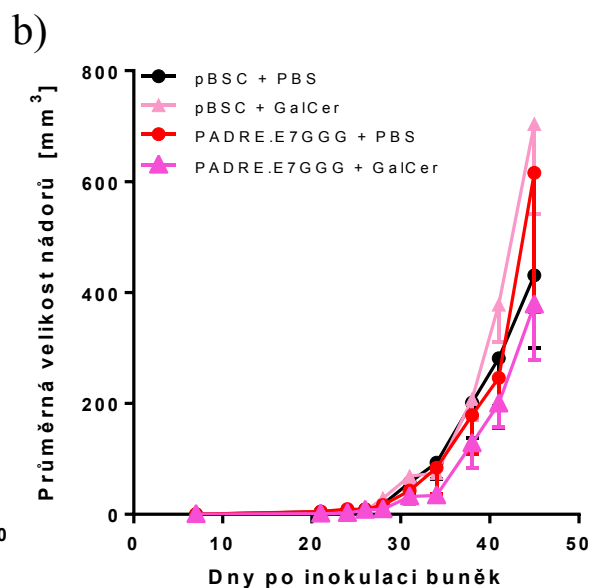
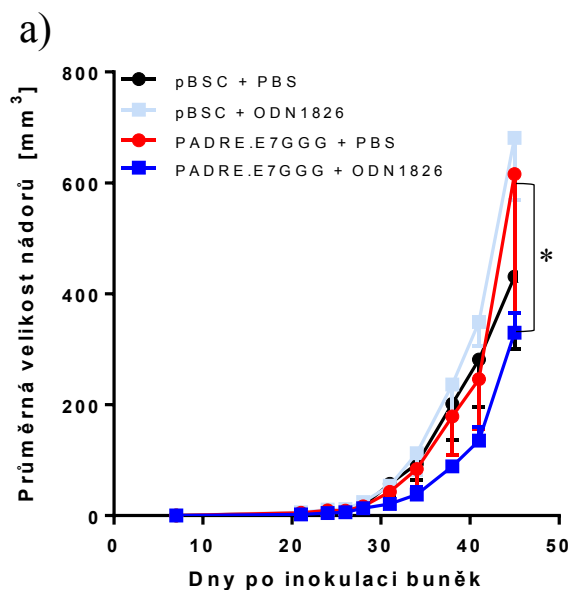
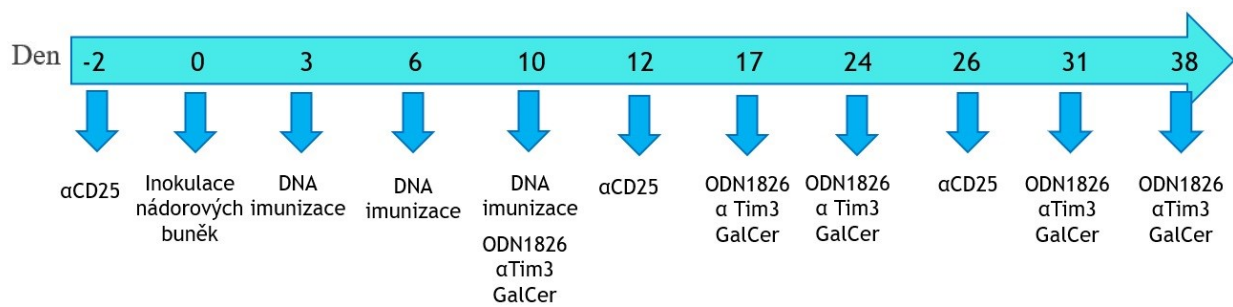
V následném pokusu byl vyzkoušen terapeutický efekt kombinace více IS látek či kombinace IS látek a protilátky proti Tim-3 (obr. 27).

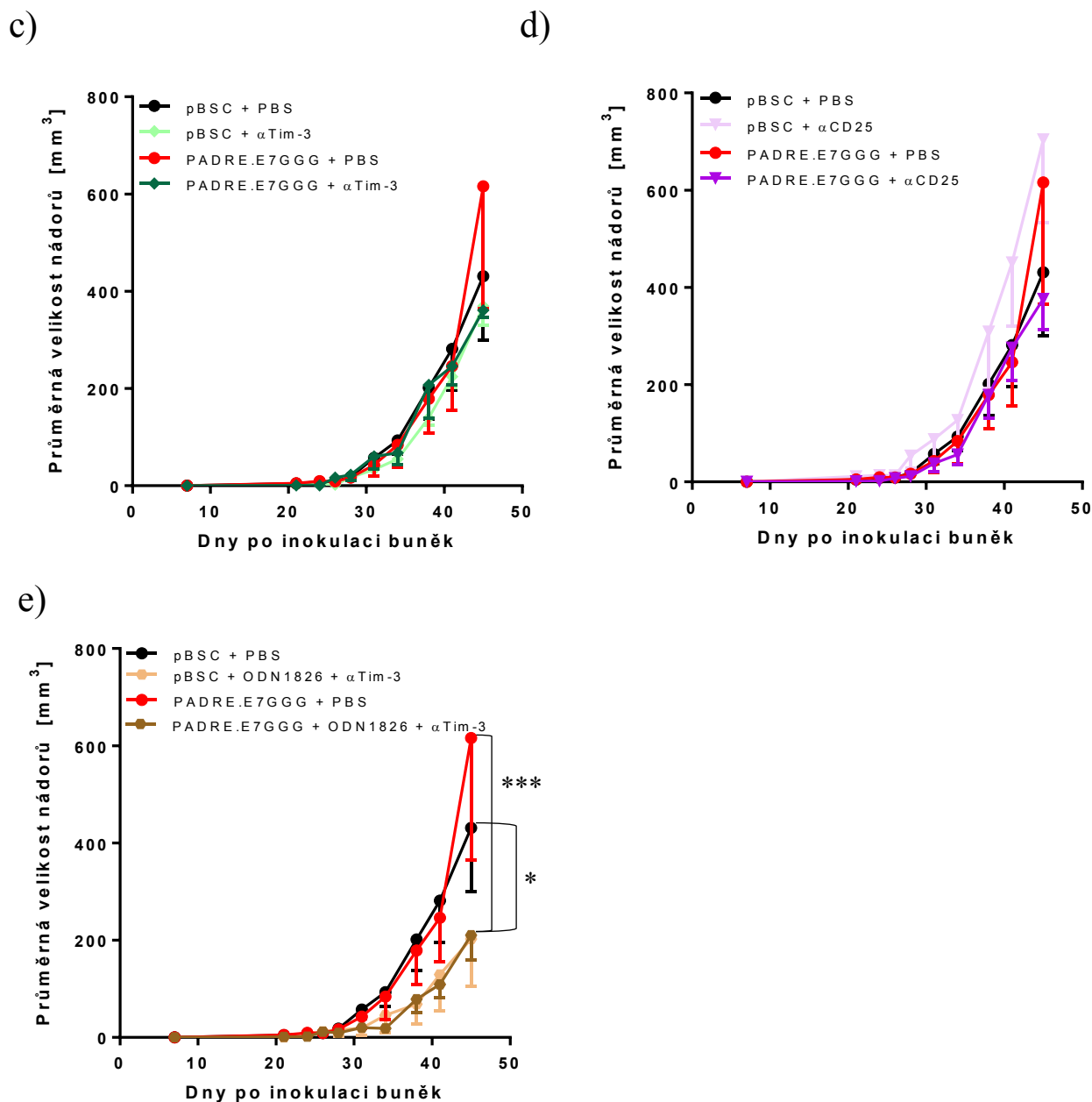


Obr. 27: Kombinovaná imunoterapie nádorů s využitím DNA vakcinace v kombinaci s protilátkou a/nebo IS látkami. Nádorové buňky TC-1/C9/6 byly inokulovány s.c. v množství 3×10^5 , poté byly myši $3 \times$ imunizovány 2 μ g plazmidu pBSC/PADRE.E7GGG a následně jim byly $3 \times$ i.p. podány adjuvancia. K injikaci byla použita blokační protilátka α Tim3 (200 μ g) a IS látky ODN1826 (50 μ g) a GalCer (2 μ g). Jako kontrolní plazmid byl použit pBSC a pro kontrolu protilátky a IS látek byl použit PBS. Statistická signifikance udává porovnání (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$) průměrné velikosti nádorů se skupinou imunizovanou pBSC/PADRE.E7GGG + PBS. Na grafu jsou vyznačeny střední chyby průměru (SEM).

Žádná z IS látek ani α Tim-3 v kombinaci se samotnou DNA vakcinací neprokázaly statisticky významný adjuvantní efekt. Kombinace DNA vakcíny s ODN1826 a GalCer adjuvantní efekt jednotlivých látek nezvýšila. Jako nejlepší kombinace se jevila kombinace ODN1826 a α Tim-3, která v signifikantní míře podpořila protinádorový účinek vakcíny v porovnání s terapií zahrnující samotnou DNA imunizaci. Účinek se projevil i u kombinace DNA vakcíny s GalCer a α Tim-3. Kombinace vakcíny se všemi třemi adjuvantními látkami sice měla za následek mírné snížení velikosti nádorů v porovnání s podáním samotného plazmidu s fúzním genem PADRE.E7GGG, ale účinek této terapie už dále nezvyšoval efekt kombinací DNA vakcinace se dvěma adjuvantními látkami.

V následném pokusu bylo testováno, zda je adjuvantní efekt výše zmíněných látek důsledkem kombinace s DNA vakcinací, či zda se projeví i bez ní. Pro zvýšení účinnosti byla prodloužena terapie na 5 injekcí těchto látek. Zároveň byl testován i adjuvantní účinek další látky – depleční protilátky α CD25 (obr. 28).





Obr. 28: Testování vlivu DNA imunizace na protinádorovou léčbu v kombinaci s protilátkami či IS látkami. Nádorové buňky TC-1/C9/6 byly inokulovány s.c. v množství 3×10^5 . Poté byla polovina myší $3 \times$ imunizována 2 μ g plazmidu pBSC/PADRE.E7GGG, druhé polovině byl aplikován kontrolní plazmid pBSC. a) DNA imunizace v kombinaci s ODN1826. b) DNA imunizace v kombinaci s GalCer. c) DNA imunizace v kombinaci s α Tim-3. d) DNA imunizace v kombinaci s α CD25. e) DNA imunizace v kombinaci s ODN1826 a α Tim-3. Statistická signifikance udává porovnání (* $P < 0,05$, *** $P < 0,001$) průměrné velikosti nádorů při srovnání skupin imunizovaných DNA vakcínou se skupinami imunizovanými DNA vakcínou a přidanou protilátkou/IS látkou a skupin neimunizovaných DNA vakcínou se skupinami neimunizovanými DNA vakcínou s přidanou protilátkou/IS látkou. Na grafu jsou vyznačeny střední chyby průměru (SEM).

Znovu se potvrdil adjuvantní efekt ODN1826, ať už v případě jeho samostatného podání s DNA vakcínou (obr. a) či v kombinaci s α Tim-3 (obr. e). Protinádorový účinek kombinace ODN1826 a α Tim-3 se projevil i bez DNA imunizace (obr. e). Deplece Treg neměla prokazatelný terapeutický efekt (obr. d).

6 Diskuze

Nádorová onemocnění jsou celosvětově jednou z hlavních příčin úmrtí. Přispívá k tomu i skutečnost, že nádorové buňky jsou schopny vyhnout se imunitní odpovědi. Jedním z hlavních způsobů, jak se nádorové buňky vyhýbají imunitní odpovědi, je snížení povrchové exprese molekul MHCI.

Tato diplomová práce se zabývá vytvořením a charakterizací nového klinicky relevantního modelu nádorů s ireverzibilně sníženou povrchovou expresí MHCI, čehož bylo dosaženo inaktivací B2m. Pro tuto inaktivaci byl využit systém CRISPR/Cas9. K ověření, že opravdu došlo k inaktivaci genu *B2m*, byly využity metody průtokové cytometrie, WB a sekvenace Sangerovou metodou. *In vitro* byla charakterizována doba zdvojení buněčné linie s inaktivovaným B2m a *in vivo* byla stanovena onkogenita, odpovídavost na DNA imunizaci a schopnost tvořit plicní metastázy. Pomocí deplečního pokusu byly určeny buňky účastnící se imunity vedené proti nádorům způsobeným buňkami s inaktivovaným B2m. Nakonec bylo provedeno několik imunoterapeutických pokusů s vytvořenou buněčnou linií.

6.1 Vytvoření klonů TC-1 buněk s inaktivovaným B2m a ověření jeho inaktivace

Pomocí systému CRISPR/Cas9 byly do genu *B2m* buněčné linie TC-1 zaneseny mutace. Předpokládalo se, že tyto mutace povedou k inaktivaci proteinu B2m, čímž dojde k zamezení povrchové exprese MHCI. Ačkoliv analýza povrchové exprese MHCI provedená průtokovou cytometrií odhalila u většiny klonů prakticky nezměněnou expresi MHCI, podařilo se vybrat 2 populace buněčných klonů, TC-1/C9 a TC-1/C20, které obsahovaly jak buňky MHCI⁺, tak buňky MHCI⁻. Tyto linie buď vznikly z více než jedné buňky, nebo došlo k inaktivaci druhé alely *B2m* až po vysetí buněk vyizolovaných po transfekci na kultivační misky. Po opětovném rozklonování těchto linií byly vybrány dva klony, TC-1/C9/6 a TC-1/C20/11, u nichž bylo prokázáno, že na jejich povrchu nedochází ke konstitutivní expresi MHCI. Nicméně po indukci IFN γ , který skrze Jak/STAT dráhu zvyšuje expresi genů pro MHCI a B2m (Darnell, Kerr and Stark, 1994), došlo k částečné povrchové expresi MHCI. Možným vysvětlením je skutečnost, že po indukci IFN γ došlo ke zvýšení genové exprese α řetězce MHCI, který se následně dostával na povrch buňky i bez B2m. Již v dřívějších výzkumech byly nalezeny α řetězce bez B2m na povrchu buněk (Bix and Raulet, 1992). Tyto komplexy MHCI bez B2m jsou schopny vázat peptidy s využitím jiných kotvících aminokyselin, přičemž CD8⁺ T lymfocyty jsou schopny rozpoznávat takto prezentované epitopy (Schell *et al.*, 2002).

Protože bylo popsáno, že na povrch myších buněk neprodukcujících protein B2m se dostávají zejména molekuly pocházející z lokusu D (Bix and Raulet, 1992), bylo také testováno, zda se liší povrchová exprese molekul MHCI po indukci IFN γ dle toho, z jakého lokusu pocházejí. Pro ověření této možnosti byla provedena průtoková cytometrie detekující molekuly z jednotlivých lokusů K a D. U klonu TC-1/C9/6 došlo po indukci IFN γ ke zvýšené povrchové expresi molekul MHCI z obou lokusů, nicméně molekuly z lokusu D se dostávaly na povrch ve větší míře. U klonu TC-1/C20/11 však došlo k silnější indukci molekul z obou lokusů.

Jelikož nejprve nebyla k dispozici protilátka proti B2m a nedařilo se nám získat buněčné klony s úplnou inaktivací povrchové exprese MHCI, byla testována možnost, že došlo k inaktivaci pouze jedné z alel *B2m*. Abychom tuto možnost ověřili, byla provedena sekvenace úseku genomové DNA vybraných klonů obsahující cílové místo pro CRISPR/Cas9. Sekvenací Sangerovou metodou bylo prokázáno, že došlo ke vzniku mutací u všech testovaných vzorků a tedy k inaktivaci všech alel *B2m*. Nejčastěji byly detekovány delece, v jednom případě byla nalezena inserce a substituce, což odpovídá tomu, že při působení CRISPR/Cas9 dochází po přerušení vláken a nehomologním spojení konců k delečním a inzerčním mutacím (Komor, Badran and Liu, 2017). Všechny nalezené mutace vedly ke vzniku předčasných STOP kodónů, což znamená, že by mělo docházet ke tvorbě zkrácené formy B2m. Ta je však pravděpodobně nefunkční a nedostává se na povrch buňky, což bylo potvrzeno průtokovou cytometrií detekující povrchovou expresi B2m. Při tvorbě zkrácené formy by B2m měl být detekován pomocí WB, což se však nepotvrdilo. To může být způsobeno tím, že monoklonální protilátka proti B2m nedetekuje zkrácené formy B2m nebo jsou tyto formy nestabilní.

Jelikož B2m se může vázat kromě α řetězce i s molekulou CD1d patřící k neklasickým MHC molekulám, bylo testováno, zda inaktivace B2m ovlivní povrchovou expresi CD1d. Tato hypotéza nebyla potvrzena. CD1d se tedy dostává na povrch buněk i bez B2m a jeho inaktivace ji neovlivní. CD1d může být exprimován bez B2m, což však vede ke změnám v citlivosti ke glykozylázám (Kim *et al.*, 1999).

6.2 Změny v proliferaci buněk *in vitro*

Při provádění pokusů ověřujících inaktivaci B2m bylo zpozorováno, že buňky s inaktivovaným B2m rostou pomaleji než původní buňky TC-1. Byl proto proveden proliferační test a z něj pak byla spočítána doba zdvojení. Doba zdvojení se prodloužila z 18,5 hodiny na 27,9 hodiny. Pozorování zpomalení proliferace buněk po inaktivaci B2m je v souladu s výzkumem Sun *et al* (2016), naopak zvýšená exprese B2m je spojena s vyšší proliferací buněk (Nomura *et al.*, 2006).

Indukce IFN γ neměla u buněk TC-1/C9/6 a TC-1/A9 vliv na dobu zdvojení. U buněk TC-1 dobu zdvojení prodloužila z 18,5 h na 19,2 h. Působení IFN γ je většinou spojováno s antiproliferačními účinky (Platanias *et al.*, 1999; Stavropoulos *et al.*, 1999), nicméně bylo prokázáno, že IFN γ může nádorovou proliferaci naopak podporovat a to v závislosti na množství IFN γ . Dle průzkumu He *et al.* (2005) na myších vede dlouhodobé vystavení vysokému množství IFN γ k inhibici růstu nádorů a naopak dlouhodobé vystavení malému množství IFN γ k jeho podpoře. Krátkodobé působení IFN γ v jakékoliv dávce nemělo na růst nádorových buněk vliv. Je tedy možné, že efekt IFN γ se v našem pokusu neprojevil, protože jeho působení bylo příliš krátké, případně by bylo třeba použitou dávku dále optimalizovat.

6.3 Charakteristika klonů s inaktivovaným B2m *in vivo*

6.3.1 Onkogenita

Nejprve bylo zkoumáno, zda vybrané klony TC-1/C9/6 a TC-1/C20/11 tvoří nádory v syngenních myších. TC-1 buňky tvoří nádory při inokulaci 3×10^4 nádorových buněk, proto bylo toto množství použito i u výše zmíněných klonů. K vytvoření nádorů došlo u všech myší inokulovaných buňkami TC-1/C9/6 a růst byl podobný jako u nádorů vytvořených po inokulaci buněk TC-1, nicméně ke vzniku nádorů došlo o několik dní později. U myší inokulovaných buňkami TC-1/C20/11 došlo k vytvoření nádoru pouze u jedné myši a taktéž s několikadenním zpožděním. Pozdější vznik nádorů je pravděpodobně spojen s pomalejší proliferací buněk TC-1/C9/6 *in vitro*. *In vivo* může k pomalejšímu růstu nádoru přispívat fakt, že při chybějící expresi MHCI na povrchu buněk se tyto buňky stávají cílem NK buněk. Pro ověření této hypotézy a pro zjištění, jaké buňky hrají hlavní roli v protinádorové imunitě myší inokulovaných TC-1/C9/6 buňkami, byly provedeny pokusy depletující některé subpopulace imunitních buněk. Byla sledována role CD4⁺ T lymfocytů, CD8⁺ T lymfocytů, NK1.1⁺ buněk a makrofágů a také důležitost cytokinu IFN γ . Jak se předpokládalo, nejdůležitější roli hrají NK1.1⁺ buňky, kam se řadí NK a NKT buňky, které mohou cílit nádorové buňky bez MHCI a nádorové buňky exprimující CD1d molekulu. V literatuře je zvýšená exprese B2m spojována s rychlejším růstem nádorů (Josson *et al.*, 2011), k čemuž pravděpodobně dochází po aktivaci PI3K/Akt dráhy (Yang *et al.*, 2009). Při vyšší dávce nádorových buněk, konkrétně při inokulaci 3×10^5 nádorových buněk, došlo ke zvýšené tvorbě nádorů, přičemž nádory se vytvořily u všech myší inokulovaných jak buňkami TC-1/C9/6, tak buňkami TC-1/C20/11.

Dále bylo zkoumáno, zda inaktivace B2m hraje roli v metastatické aktivitě buněk s inaktivovaným B2m. Původní buňky TC-1, pokud jsou injikovány subkutánně, metastázy netvoří. Nicméně mohou tvořit plicní metastázy při intravenózním podání (Ji *et al.*, 1998).

Nádorové buňky v našem pokusu byly podány subkutánně a žádné plicní metastázy nebyly detekovány, což je v souladu s dřívějšími výzkumy, ve kterých bylo prokázáno, že inaktivace B2m vede k signifikantnímu snížení migrace a invazivity nádorových buněk *in vitro* (Sun *et al.*, 2016) a naopak zvýšená exprese B2m je spojena s vyšší migrací a invazivitou nádorových buněk (Josson *et al.*, 2011).

6.3.2 Imunosenzitivita

Při testování citlivosti buněk TC-1/C9/6 k DNA imunizaci proti papilomavirovému onkoproteinu E7 byla potvrzena hypotéza, že buňky ztratí svou schopnost odpovídat na DNA vakcinaci, ač u TC-1 buněk je DNA vakcína schopna plně zabránit vzniku nádoru. To je způsobeno nejspíše tím, že jedním z hlavních účinků DNA imunizace je aktivace CD8⁺ T lymfocytů, které sice dle Thoreau *et al.* (2015) nejsou hlavními efektorovými buňkami v imunitní odpovědi proti nádorům vzniklým po inokulaci buněk TC-1, nicméně je zásadní jejich kooperace s makrofágy, které pomocí fagocytózy a produkce TNF α cytotoxicky ničí nádorové buňky. V našem deplečním pokusu však bylo prokázáno, že CD8⁺ T lymfocyty se imunitní odpovědi vedené proti nádorům z buněk TC-1/C9/6 neúčastní. Tento pokus byl proveden u myši, které nebyly imunizované a je pravděpodobné, že po imunizaci se bude zastoupení jednotlivých subpopulací imunitních buněk lišit. K tomu je v budoucnu potřeba provést depleční pokus u imunizovaných myši.

6.4 Terapeutické pokusy

Po *in vitro* a *in vivo* charakterizaci klonů s inaktivovaným B2m bylo s klonem TC-1/C9/6 provedeno několik terapeutických imunizačních pokusů. Cílem těchto pokusů bylo zvýšit účinnost DNA vakcinace přidáním různých adjuvans. V předchozím pokusu bylo sice zjištěno, že myši inokulované nádorovými buňkami TC-1/C9/6 nejsou, narozdíl od buněk TC-1, citlivé k DNA imunizaci, ale předpokládali jsme, že aktivované CD8⁺ a CD4⁺ T lymfocyty by mohly přispívat k zesílení přirozené imunity aktivované pomocí adjuvans (Thoreau *et al.*, 2015; van der Sluis *et al.*, 2015). Jako adjuvancia se využívala protilátka α Tim-3, přičemž Tim-3 hraje roli v širokém spektru imunologických procesů jako jsou aktivace NK buněk, aktivace žírných buněk či polarizace makrofágů do typu M2. Dále se využívaly protilátky α PD-1 a α PD-L1, přičemž PD-1 a PD-L1 vykazují zvýšenou expresi při nádorových onemocněních vedoucí k inhibici proliferace a funkce aktivovaných T lymfocytů. Dále byly použity CpG ODN1826, které aktivují přirozenou imunitu skrze TLR9 vedoucí k polarizaci imunitní odpovědi směrem k Th1 a jejichž účinek byl prokázán u nádorů s vysokou a ireverzibilně sníženou expresí MHCI (Reiniš, Šimová and Bubeník, 2006) a také GalCer, který aktivuje NKT buňky. V našich

pokusech s buňkami TC-1/A9 byl prokázán silný adjuvantní účinek kombinace ODN1826 a α GalCer, proto jsme je použili i u buněk TC-1/C9/6 (Grzelak *et al.*, 2018).

V prvním pokusu byl testován účinek DNA vakcinace v kombinaci s jednotlivými adjuvanciemi. Po tomto pilotním pokusu byly z dalších pokusů vyřazeny α PD-1 a α PD-L1, které neprokázaly u myši s inokulovanými buňkami TC-1/C9/6 žádný terapeutický efekt. Nesignifikantně snížená účinnost léčby pomocí α PD-1 a α PD-L1 byla prokázána i u pacientů s nádory plic, které vykazovaly sníženou expresi MHCI (Pereira *et al.*, 2017). Zároveň mutace B2m vedoucí ke ztrátě MHCI jsou spojeny se získanou rezistencí na α PD-1 po progresi onemocnění (Zaretsky *et al.*, 2016).

Zbývající tři látky – α Tim-3, ODN1826 a GalCer, u nichž se v prvním pokusu projevil adjuvantní efekt, byly použity v následném pokusu, kde byly myši nejprve imunizovány DNA vakcínou a následně bylo testováno, zda kombinace vybraných látek zvýší jejich protinádorový účinek. V navazujícím terapeutickém pokusu byla sledována nezbytnost použití DNA imunizace v kombinaci s imunostimulačními látkami.

V těchto pokusech se opakovaně prokázal mírně signifikantní účinek kombinace DNA vakcíny s ODN1826. Samotná DNA vakcinace ani samotné ODN1826 u buněk TC-1/C9/6 nevede ke zmenšení průměrné velikosti nádorů ani ke zpomalení růstu nádorů, z čehož vyplývá, že je důležitá kombinace obou imunoterapeutik. Jedním z možných způsobů přispění DNA vakcinace je indukce CD8⁺ T lymfocytů specifických proti onkoproteinu E7, které sice nemohou cílit buňky bez MHCI, ale mohou rozeznávat antigeny prezentované na dendritických buňkách a makrofázích, které předtím pohltily nádorové buňky, což by vedlo k aktivaci CD8⁺ T lymfocytů uvnitř nádorů. Jejich účinek by pak nespočíval v cytotoxicitě, ale v produkci cytokinů přitahujících další buňky imunitního systému. ODN1826 aktivuje TLR9, což vede k polarizaci imunitní odpovědi typu Th1 a k produkci prozánětlivých cytokinů přitahujících také další buňky imunitního systému. Jelikož jedněmi z hlavních buněk exprimujících TLR9 jsou plazmacytoidní dendritické buňky, které aktivují maturaci a proliferaci NK buněk, T lymfocytů a monocytů/makrofágů, účinek ODN1826 by mohl spočívat právě v aktivaci NK buněk, které jsou hlavními buňkami protinádorové imunity myši s inokulovanými buňkami TC-1/C9/6, jak se ukázalo v našem deplečním pokusu. Tento depleční pokus byl však proveden u myši, které nebyly léčeny žádnou imunoterapií a je tedy možné, že po imunoterapii se mohou buňky účastníci se protinádorové imunity lišit. Kombinace ODN1826 a DNA vakcinace by tedy mohla být účinná díky tomu, že skrze ODN1826 došlo k aktivaci dendritických buněk, které pohlcují nádorové buňky a na svém povrchu prezentují antigeny aktivující CD8⁺ T lymfocyty.

Překvapivě bylo zjištěno, že pokud se zkombinuje účinek ODN1826 s α Tim-3, DNA imunizace protinádorový účinek nezvyšuje. Jedním z hlavních účinku α Tim-3 je aktivace NK buněk, které, jak bylo řečeno výše, hrají hlavní roli v imunitě nádorů způsobených buňkami TC-1/C9/6, přičemž ODN1826 jsou skrze aktivaci plazmacytoidních dendritických buněk taky schopny NK buňky aktivovat, což by mohlo znamenat, že právě zvýšená aktivace NK buněk skrze tato dvě adjuvancia je zodpovědná za jejich slabě signifikantní terapeutický efekt.

V následujících pokusech bude testováno, které imunitní buňky infiltrují nádory vytvořené buňkami TC-1/C9/6 a k jakým změnám dochází v případě, že se tyto nádory vytvoří po imunoterapii myši. Buňky přispívající k účinku imunoterapie budou zjišťovány také pomocí deplece *in vivo*. Tyto pokusy by mohly osvětlit, jaký je mechanismus protinádorového účinku jednotlivých adjuvans a DNA imunizace těchto nádorů.

7 Souhrn

Tato práce měla za cíl inaktivovat gen *B2m* v nádorové linii TC-1, ověřit tuto inaktivaci několika metodami a následně klon charakterizovat z hlediska onkogenity a imunosenzitivity v myším modelu.

Pomocí systému CRISPR/Cas9 se podařilo inaktivovat *B2m*, který je součástí komplexu MHCI. Tato inaktivace byla potvrzena průtokovou cytometrií a WB. Sekvenací Sangerovou metodou bylo potvrzeno, že v genu *B2m* vznikly mutace, především delece, ve všech alelách genu a všechny z nalezených mutací vedly ke vzniku předčasného STOP kodonu.

In vitro pak byl charakterizován pomalejší růst buněk, kdy se doba zdvojení protáhla z původních 18,5 h u buněk TC-1 na 27,9 h u buněk TC-1/C9/6 s inaktivovaným *B2m*.

V myším modelu bylo potvrzeno, že buňky jsou onkogenní, tedy jsou schopné tvořit nádory, nicméně vznik nádorů je o několik dní opožděn oproti nádorům způsobeným původními buňkami TC-1. Nádory tvořené po inokulaci buněk TC-1/C9/6 netvoří plicní metastáze a nejsou citlivé k DNA imunizaci cílené proti onkoproteinu E7.

V terapeutických pokusech zabývajících se kombinovanou imunoterapií nádorů se podařilo opakovaně mírně zvýšit protinádorový efekt DNA vakcíny pomocí adjuvans ODN1826. Zároveň se protinádorový efekt projevil u kombinace adjuvancií ODN1826 a α Tim-3, přičemž DNA imunizace tento efekt nezvyšovala.

Vytvořená nádorová linie TC-1/C9/6 bude nadále využívána pro testování imunoterapeutických přístupů.

8 Seznam použité literatury

Aggarwal, C. *et al.* (2018) 'Immunotherapy Targeting HPV16/18 Generates Potent Immune Responses in HPV-Associated Head and Neck Cancer', *Clinical Cancer Research*. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-1763.

Alberts, D. S. *et al.* (2008) 'Randomized phase 3 trial of interferon gamma-1b plus standard carboplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel alone for first-line treatment of advanced ovarian and primary peritoneal carcinomas: results from a prospectively designed analysis of prog', *Gynecologic oncology*, 109(2), pp. 174–81. doi: 10.1016/j.ygyno.2008.01.005.

Alexander, J. *et al.* (1994) 'Development of high potency universal DR-restricted helper epitopes by modification of high affinity DR-blocking peptides', *Immunity*. Cell Press, 1(9), pp. 751–761. doi: 10.1016/S1074-7613(94)80017-0.

Ang, K. K. *et al.* (2014) 'Randomized phase III trial of concurrent accelerated radiation plus cisplatin with or without cetuximab for stage III to IV head and neck carcinoma: RTOG 0522.', *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. American Society of Clinical Oncology, 32(27), pp. 2940–50. doi: 10.1200/JCO.2013.53.5633.

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

Annels, N. E. *et al.* (2014) 'The effects of gemcitabine and capecitabine combination chemotherapy and of low-dose adjuvant GM-CSF on the levels of myeloid-derived suppressor cells in patients with advanced pancreatic cancer', *Cancer Immunology, Immunotherapy*. Springer Berlin Heidelberg, 63(2), pp. 175–183. doi: 10.1007/s00262-013-1502-y.

Ansell, S. M. *et al.* (2015) 'PD-1 Blockade with Nivolumab in Relapsed or Refractory Hodgkin's Lymphoma', *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society, 372(4), pp. 311–319. doi: 10.1056/NEJMoa1411087.

Arce Vargas, F. *et al.* (2017) 'Fc-Optimized Anti-CD25 Depletes Tumor-Infiltrating Regulatory T Cells and Synergizes with PD-1 Blockade to Eradicate Established Tumors', *Immunity*, 46(4), pp. 577–586. doi: 10.1016/j.immuni.2017.03.013.

Benitez, R. *et al.* (1998) 'Mutations of the β 2 - microglobulin gene result in a lack of HLA class I molecules on melanoma cells of two patients immunized with MAGE peptides', *Tissue Antigens*, 52(6), pp. 520–529. doi: 10.1111/j.1399-0039.1998.tb03082.x.

Berggard, I. and Bearn, A. G. (1968) 'Isolation and Properties of a Low Molecular Weight β 2-Globulin Occurring in Human Biological Fluids', *J. Biol. Chem.*, 243(15), pp. 4095–4103. PMID: 4175239.

Berkowitz, J. L. *et al.* (2014) 'Safety, efficacy, and pharmacokinetics/pharmacodynamics of daclizumab (anti-CD25) in patients with adult T-cell leukemia/lymphoma', *Clinical Immunology*, 155(2), pp. 176–187. doi: 10.1016/j.clim.2014.09.012.

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

0999-1.

Besser, M. J. *et al.* (2013) 'Adoptive transfer of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with metastatic melanoma: intent-to-treat analysis and efficacy after failure to prior immunotherapies.', *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. American Association for Cancer Research, 19(17), pp. 4792–800. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0380.

Best, S. R. *et al.* (2009) 'Administration of HPV DNA vaccine via electroporation elicits the strongest CD8+ T cell immune responses compared to intramuscular injection and intradermal gene gun delivery', *Vaccine*. Elsevier, 27(40), pp. 5450–5459. doi: 10.1016/J.VACCINE.2009.07.005.

Bijen, C. B. M. *et al.* (2010) 'The prognostic role of classical and nonclassical MHC class I expression in endometrial cancer', *International Journal of Cancer*. Wiley-Blackwell, 126(6), p. NA-NA. doi: 10.1002/ijc.24852.

Bix, M. and Raulet, D. (1992) 'Functionally Conformed Free Class I Heavy Chains Exist On The Surface Of 32 Microglobulin Negative Cells'. doi: 10.1084/jem.176.3.829.

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

Borghaei, H. *et al.* (2015) 'Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non–Small-Cell Lung Cancer', *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society, 373(17), pp. 1627–1639. doi: 10.1056/NEJMoa1507643.

Browning, M. *et al.* (1996) 'Mechanisms of loss of HLA class I expression on colorectal tumor cells', *Tissue Antigens*, 47(5), pp. 364–371. doi: 10.1111/j.1399-0039.1996.tb02571.x.

Bu, M. *et al.* (2016) 'Ovarian carcinoma-infiltrating regulatory T cells were more potent suppressors of CD8+ T cell inflammation than their peripheral counterparts, a function dependent on TIM3 expression', *Tumor Biology*. Springer Netherlands, 37(3), pp. 3949–3956. doi: 10.1007/s13277-015-4237-x.

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

Chan, E. *et al.* (2015) 'Open-label phase 1b study of FOLFIRI plus cetuximab plus IMO-2055 in patients with colorectal cancer who have progressed following chemotherapy for advanced or metastatic disease', *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. Springer Berlin Heidelberg, 75(4), pp. 701–709. doi: 10.1007/s00280-015-2682-2.

Cui, J. *et al.* (2013) 'The Efficacy of Bevacizumab Compared with Other Targeted Drugs for Patients with Advanced NSCLC: A Meta-Analysis from 30 Randomized Controlled Clinical Trials', *PLoS ONE*. Edited by M. Kuwano. Public Library of Science, 8(4), p. e62038. doi: 10.1371/journal.pone.0062038.

Van Cutsem, E. *et al.* (2015) 'Fluorouracil, Leucovorin, and Irinotecan Plus Cetuximab Treatment and RAS Mutations in Colorectal Cancer', *Journal of Clinical Oncology*, 33(7), pp.

692–700. doi: 10.1200/JCO.2014.59.4812.

Darnell, J. E., Kerr, I. M. and Stark, G. R. (1994) 'Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins.', *Science (New York, N.Y.)*, 264(5164), pp. 1415–1421. doi: 10.1126/science.8197455.

DeMuth, P. C. *et al.* (2013) 'Polymer multilayer tattooing for enhanced DNA vaccination', *Nature Materials*. Nature Publishing Group, 12(4), pp. 367–376. doi: 10.1038/nmat3550.

Douillard, J.-Y. *et al.* (2013) 'Panitumumab–FOLFOX4 Treatment and RAS Mutations in Colorectal Cancer', *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society, 369(11), pp. 1023–1034. doi: 10.1056/NEJMoa1305275.

Du, W. *et al.* (2017) 'TIM-3 as a Target for Cancer Immunotherapy and Mechanisms of Action', *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 18(3), p. 645. doi: 10.3390/ijms18030645.

Faber, H. E. *et al.* (1976) 'beta2-microglobulin locus on human chromosome 15.', *Somatic cell genetics*, 2(2), pp. 141–53. PMID: 69326.

Ferlay, J. *et al.* (2018) 'Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018', *European Journal of Cancer*. Pergamon, 103, pp. 356–387. doi: 10.1016/J.EJCA.2018.07.005.

Garcia-Lora, A., Algarra, I. and Garrido, F. (2003) 'MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape', *Journal of Cellular Physiology*. Wiley-Blackwell, 195(3), pp. 346–355. doi: 10.1002/jcp.10290.

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

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

Gül, N. *et al.* (2014) 'Macrophages eliminate circulating tumor cells after monoclonal antibody therapy', *The Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation, 124(2), pp. 812–823. doi: 10.1172/JCI66776.

Hamanishi, J. *et al.* (2015) 'Safety and Antitumor Activity of Anti-PD-1 Antibody, Nivolumab, in Patients With Platinum-Resistant Ovarian Cancer Precision Medicine in Gynecologic Oncology View project MORE-IC View project', *Article in Journal of Clinical Oncology*. doi: 10.1200/JCO.2015.62.3397.

He, Y.-F. *et al.* (2005) 'Sustained low-level expression of interferon- γ promotes tumor development: potential insights in tumor prevention and tumor immunotherapy', *Cancer Immunology, Immunotherapy*. Springer-Verlag, 54(9), pp. 891–897. doi: 10.1007/s00262-004-0654-1.

Heckl, D. *et al.* (2014) 'Generation of mouse models of myeloid malignancy with combinatorial genetic lesions using CRISPR-Cas9 genome editing.', *Nature biotechnology*, 32(9), pp. 941–6.

doi: 10.1038/nbt.2951.

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

Ishizaka, S., Kuriyama, S. and Tsujii, T. (1989) 'In vivo depletion of macrophages by desulfated iota-carrageenan in mice.', *Journal of immunological methods*, 124(1), pp. 17–24. doi: 10.1016/0022-1759(89)90180-4.

Iwai, Y. *et al.* (2002) 'Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 99(19), pp. 12293–7. doi: 10.1073/pnas.192461099.

Jan, M. *et al.* (2011) 'Prospective separation of normal and leukemic stem cells based on differential expression of TIM3, a human acute myeloid leukemia stem cell marker.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 108(12), pp. 5009–14. doi: 10.1073/pnas.1100551108.

Janikovits, J. *et al.* (2018) 'High numbers of PDCD1 (PD-1)-positive T cells and *B2M* mutations in microsatellite-unstable colorectal cancer', *Oncot Immunology*, 7(2), p. e1390640. doi: 10.1080/2162402X.2017.1390640.

Ji, H. *et al.* (1998) 'Antigen-specific immunotherapy for murine lung metastatic tumors expressing human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein', *International Journal of Cancer*. John Wiley & Sons, Ltd, 78(1), pp. 41–45. doi: 10.1002/(SICI)1097-0215(19980925)78:1<41::AID-IJC8>3.0.CO;2-X.

Jordan, M. and Waxman, D. J. (2016) 'CpG-1826 immunotherapy potentiates chemotherapeutic and anti-tumor immune responses to metronomic cyclophosphamide in a preclinical glioma model', *Cancer Letters*. Elsevier, 373(1), pp. 88–96. doi: 10.1016/J.CANLET.2015.11.029.

Joseph-Pietras, D. *et al.* (2010) 'DNA vaccines to target the cancer testis antigen PASD1 in human multiple myeloma', *Leukemia*, 24. doi: 10.1038/leu.2010.196.

Josson, S. *et al.* (2011) 'Molecular and Cellular Pathobiology b2-Microglobulin Induces Epithelial to Mesenchymal Transition and Confers Cancer Lethality and Bone Metastasis in Human Cancer Cells'. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3382.

Kawai, K. *et al.* (2013) 'Bacillus Calmette-Guerin (BCG) immunotherapy for bladder cancer: Current understanding and perspectives on engineered BCG vaccine', *Cancer Science*. Wiley/Blackwell (10.1111), 104(1), pp. 22–27. doi: 10.1111/cas.12075.

Kick, L., Kirchner, M. and Schneider, S. (2017) 'CRISPR-Cas9: From a bacterial immune system to genome-edited human cells in clinical trials', *Bioengineered*. Taylor & Francis, 8(3), pp. 280–286. doi: 10.1080/21655979.2017.1299834.

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

- Kikushige, Y. *et al.* (2015) 'A TIM-3/Gal-9 Autocrine Stimulatory Loop Drives Self-Renewal of Human Myeloid Leukemia Stem Cells and Leukemic Progression', *Cell Stem Cell*. Cell Press, 17(3), pp. 341–352. doi: 10.1016/J.STEM.2015.07.011.
- Kim, H.-A. *et al.* (2009) 'CpG-ODN-based immunotherapy is effective in controlling the growth of metastasized tumor cells', *Cancer Letters*. Elsevier, 274(1), pp. 160–164. doi: 10.1016/J.CANLET.2008.09.014.
- Kim, H. S. *et al.* (1999) *Biochemical Characterization of CD1d Expression in the Absence of 2-Microglobulin**. doi: 10.1074/jbc.274.14.9289.
- Kim, J. E. *et al.* (2017) 'Combination Therapy with Anti-PD-1, Anti-TIM-3, and Focal Radiation Results in Regression of Murine Gliomas.', *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. American Association for Cancer Research, 23(1), pp. 124–136. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1535.
- Kim, S.-T. *et al.* (2018) 'Response to "Unexpected mutations after CRISPR–Cas9 editing in vivo"', *Nature Methods*, 15(4), pp. 239–240. doi: 10.1038/nmeth.4554.
- Kim, T. J. *et al.* (2014) 'Clearance of persistent HPV infection and cervical lesion by therapeutic DNA vaccine in CIN3 patients', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 5(1), p. 5317. doi: 10.1038/ncomms6317.
- Kirszenbaum, M. *et al.* (1997) 'HLA-G gene polymorphism segregation within CEPH reference families.', *Human immunology*, 53(2), pp. 140–7. doi: 10.1016/S0198-8859(97)00038-4.
- Klinman, D. M. (2004) 'Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 4(4), pp. 249–259. doi: 10.1038/nri1329.
- Kobayashi, A. *et al.* (2008) 'Evolving immunosuppressive microenvironment during human cervical carcinogenesis', *Mucosal Immunology*. Nature Publishing Group, 1(5), pp. 412–420. doi: 10.1038/mi.2008.33.
- Komor, A. C., Badran, A. H. and Liu, D. R. (2017) 'CRISPR-Based Technologies for the Manipulation of Eukaryotic Genomes', *Cell*. Cell Press, 168(1–2), pp. 20–36. doi: 10.1016/J.CELL.2016.10.044.
- Koopman, L. A. *et al.* (2000) 'Multiple genetic alterations cause frequent and heterogeneous human histocompatibility leukocyte antigen class I loss in cervical cancer.', *The Journal of experimental medicine*. Rockefeller University Press, 191(6), pp. 961–76. doi: 10.1084/JEM.191.6.961.
- Kovats, S. *et al.* (1990) 'A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts', *Science*. American Association for the Advancement of Science, 248(4952), pp. 220–223. doi: 10.1126/science.2326636.
- Koyama, S. *et al.* (2016) 'Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune checkpoints', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 7, p. 10501. doi: 10.1038/ncomms10501.
- Krieg, A. M., Yi, A.-K. and Hartmann, G. (1999) *Mechanisms and therapeutic applications of immune stimulatory CpG DNA*, *Pharmacology & Therapeutics*. doi: 10.1016/S0163-7258(99)00023-6.

Lamm, L. U. *et al.* (1974) 'Assignment of the Major Histocompatibility Complex to Chromosome No. 6 in a Family with a Pericentric Inversion', *Human Heredity*. Karger Publishers, 24(3), pp. 273–284. doi: 10.1159/000152660.

Lasfar, A. *et al.* (2016) 'Concerted action of IFN- α and IFN- λ induces local NK cell immunity and halts cancer growth.', *Oncotarget*. Impact Journals, LLC, 7(31), pp. 49259–49267. doi: 10.18632/oncotarget.10272.

Lawson, D. H. *et al.* (2015) 'Randomized, Placebo-Controlled, Phase III Trial of Yeast-Derived Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) Versus Peptide Vaccination Versus GM-CSF Plus Peptide Vaccination Versus Placebo in Patients With No Evidence of Disease After Complete Surgical Resection of Locally Advanced and/or Stage IV Melanoma: A Trial of the Eastern Cooperative Oncology Group-American College of Radiology Imaging Network Cancer Research Group (E4697).', *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. American Society of Clinical Oncology, 33(34), pp. 4066–76. doi: 10.1200/JCO.2015.62.0500.

Lee, N. *et al.* (1998) 'HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(9), pp. 5199–5204. doi: 10.1073/pnas.95.9.5199.

Leone, P. *et al.* (2013) 'MHC class I antigen processing and presenting machinery: organization, function, and defects in tumor cells.', *Journal of the National Cancer Institute*. Oxford University Press, 105(16), pp. 1172–87. doi: 10.1093/jnci/djt184.

Lescarbeau, R. M. *et al.* (2018) 'Response to "Unexpected mutations after CRISPR–Cas9 editing in vivo"', *Nature Methods*, 15(4), pp. 237–237. doi: 10.1038/nmeth.4553.

Li, H. *et al.* (2012) 'Tim-3/galectin-9 signaling pathway mediates T-cell dysfunction and predicts poor prognosis in patients with hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma', *Hepatology*. Wiley-Blackwell, 56(4), pp. 1342–1351. doi: 10.1002/hep.25777.

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

Lin, K. Y. *et al.* (1996) 'Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen.', *Cancer research*, 56(1), pp. 21–6. PMID: 8548765.

Liu, J.-F. *et al.* (2017) 'T-cell immunoglobulin mucin 3 blockade drives an antitumor immune response in head and neck cancer', *Molecular Oncology*. John Wiley & Sons, Ltd, 11(2), pp. 235–247. doi: 10.1002/1878-0261.12029.

Lordick, F. *et al.* (2013) 'Capecitabine and cisplatin with or without cetuximab for patients with previously untreated advanced gastric cancer (EXPAND): a randomised, open-label phase 3 trial', *The Lancet Oncology*. Elsevier, 14(6), pp. 490–499. doi: 10.1016/S1470-2045(13)70102-5.

Lu, Y. *et al.* (2018) 'Abstract CT133: A phase I trial of PD-1 deficient engineered T cells with CRISPR/Cas9 in patients with advanced non-small cell lung cancer with PD-L1 expression', *Cancer Research*. American Association for Cancer Research, 78(13 Supplement), pp. CT133-

CT133. doi: 10.1158/1538-7445.AM2018-CT133.

Madjd, Z. *et al.* (2005) 'Total loss of MHC class I is an independent indicator of good prognosis in breast cancer.', *International journal of cancer*, 117(2), pp. 248–55. doi: 10.1002/ijc.21163.

Maes, W. *et al.* (2013) 'Depletion of Regulatory T Cells in a Mouse Experimental Glioma Model through Anti-CD25 Treatment Results in the Infiltration of Non-Immunosuppressive Myeloid Cells in the Brain', *Clinical and Developmental Immunology*, 2013, pp. 1–6. doi: 10.1155/2013/952469.

Morales, A., Eiding, D. and Bruce, A. W. (1976) 'Intracavitary Bacillus Calmette-guerin in the Treatment of Superficial Bladder Tumors', *The Journal of Urology*. Elsevier, 116(2), pp. 180–182. doi: 10.1016/S0022-5347(17)58737-6.

Moreira, D. *et al.* (2018) 'STAT3 Inhibition Combined with CpG Immunostimulation Activates Antitumor Immunity to Eradicate Genetically Distinct Castration-Resistant Prostate Cancers.', *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. American Association for Cancer Research. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-1277.

Moretta, L. *et al.* (2002) 'Human natural killer cells: their origin, receptors and function', *European Journal of Immunology*. Wiley-Blackwell, 32(5), p. 1205. doi: 10.1002/1521-4141(200205)32:5<1205::AID-IMMU1205>3.0.CO;2-Y.

Motzer, R. J. *et al.* (2015) 'Nivolumab for Metastatic Renal Cell Carcinoma: Results of a Randomized Phase II Trial.', *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. American Society of Clinical Oncology, 33(13), pp. 1430–7. doi: 10.1200/JCO.2014.59.0703.

Mou, H. *et al.* (2015) 'Precision cancer mouse models through genome editing with CRISPR-Cas9', *Genome Medicine*. BioMed Central, 7(1), p. 53. doi: 10.1186/s13073-015-0178-7.

Ndhlovu, L. C. *et al.* (2012) 'Tim-3 marks human natural killer cell maturation and suppresses cell-mediated cytotoxicity.', *Blood*. American Society of Hematology, 119(16), pp. 3734–43. doi: 10.1182/blood-2011-11-392951.

Nie, Y. (2001) 'DNA hypermethylation is a mechanism for loss of expression of the HLA class I genes in human esophageal squamous cell carcinomas', *Carcinogenesis*. Oxford University Press, 22(10), pp. 1615–1623. doi: 10.1093/carcin/22.10.1615.

Nomura, T. *et al.* (2006) 'B 2-Microglobulin Promotes the Growth of Human Renal Cell Carcinoma through the Activation of the Protein Kinase A, Cyclic AMP ^ Responsive Element-Binding Protein, and Vascular Endothelial Growth Factor Axis'. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2060.

Norell, H. *et al.* (2010) 'Vaccination with a plasmid DNA encoding HER-2/neu together with low doses of GM-CSF and IL-2 in patients with metastatic breast carcinoma: a pilot clinical trial', *Journal of Translational Medicine*. BioMed Central, 8(1), p. 53. doi: 10.1186/1479-5876-8-53.

Paschen, A. *et al.* (2006) 'The Coincidence of Chromosome 15 Aberrations and 2-Microglobulin Gene Mutations Is Causative for the Total Loss of Human Leukocyte Antigen Class I Expression in Melanoma', *Clinical Cancer Research*, 12(11), pp. 3297–3305. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-2174.

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

Pereira, C., Gimenez-Xavier, P., Pros, E., Pajares, M. J., *et al.* (2017) 'Genomic Profiling of Patient-Derived Xenografts for Lung Cancer Identifies B2M Inactivation Impairing Immunorecognition.', *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. American Association for Cancer Research, 23(12), pp. 3203–3213. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1946.

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

Pérez-Jacoiste Asín, M. A. *et al.* (2014) 'Bacillus Calmette-Guérin (BCG) infection following intravesical BCG administration as adjunctive therapy for bladder cancer: incidence, risk factors, and outcome in a single-institution series and review of the literature.', *Medicine*. Wolters Kluwer Health, 93(17), pp. 236–54. doi: 10.1097/MD.000000000000119.

Perez-Torres, M. *et al.* (2006) 'Epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody down-regulates mutant receptors and inhibits tumors expressing EGFR mutations.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 281(52), pp. 40183–92. doi: 10.1074/jbc.M607958200.

Perez, B. *et al.* (1999) 'A new beta2 microglobulin mutation found in a melanoma tumor cell line', *Tissue Antigens*, 53(6), pp. 569–572. doi: 10.1034/j.1399-0039.1999.530607.x.

Phong, B. L. *et al.* (2015) 'Tim-3 enhances FcεRI-proximal signaling to modulate mast cell activation.', *The Journal of experimental medicine*. Rockefeller University Press, 212(13), pp. 2289–304. doi: 10.1084/jem.20150388.

Platanias, L. C. *et al.* (1999) 'CrkL and CrkII participate in the generation of the growth inhibitory effects of interferons on primary hematopoietic progenitors', *Experimental Hematology*. Elsevier, 27(8), pp. 1315–1321. doi: 10.1016/S0301-472X(99)00060-0.

Plummer, M. *et al.* (2016) 'Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis', *The Lancet Global Health*, 4(9), pp. e609–e616. doi: 10.1016/S2214-109X(16)30143-7.

Radvanyi, L. G. *et al.* (2012) 'Specific lymphocyte subsets predict response to adoptive cell therapy using expanded autologous tumor-infiltrating lymphocytes in metastatic melanoma patients.', *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. American Association for Cancer Research, 18(24), pp. 6758–70. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1177.

Rech, A. J. *et al.* (2012) 'CD25 blockade depletes and selectively reprograms regulatory T cells in concert with immunotherapy in cancer patients.', *Science translational medicine*. American Association for the Advancement of Science, 4(134), p. 134ra62. doi: 10.1126/scitranslmed.3003330.

Reichel, J. *et al.* (2015) 'Flow sorting and exome sequencing reveal the oncogenome of primary

Hodgkin and Reed-Sternberg cells', *Blood*, 125(7), pp. 1061–1072. doi: 10.1182/blood-2014-11-610436.

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

Rekoske, B. T. *et al.* (2015) 'PD-1 or PD-L1 Blockade Restores Antitumor Efficacy Following SSX2 Epitope-Modified DNA Vaccine Immunization.', *Cancer immunology research*. American Association for Cancer Research, 3(8), pp. 946–55. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0206.

Ribas, A. *et al.* (2018) 'SD-101 in Combination with Pembrolizumab in Advanced Melanoma: Results of a Phase Ib, Multicenter Study.', *Cancer discovery*. American Association for Cancer Research, 8(10), pp. 1250–1257. doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-0280.

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

Roemer, M. G. M. *et al.* (2016) 'Classical Hodgkin Lymphoma with Reduced β 2M/MHC Class I Expression Is Associated with Inferior Outcome Independent of 9p24.1 Status.', *Cancer immunology research*. American Association for Cancer Research, 4(11), pp. 910–916. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-16-0201.

Rosa, F. *et al.* (1983) 'The beta2-microglobulin mRNA in human Daudi cells has a mutated initiation codon but is still inducible by interferon.', *The EMBO journal*, 2(2), pp. 239–43. PMID: 11894933.

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

Sandel, M. H. *et al.* (2005) 'c.', *Molecular immunology*, 42(4), pp. 541–6. doi: 10.1016/j.molimm.2004.07.039.

Schaefer, K. A. *et al.* (2017) 'Unexpected mutations after CRISPR–Cas9 editing in vivo', *Nature Methods*. Nature Publishing Group, 14(6), pp. 547–548. doi: 10.1038/nmeth.4293.

Schell, T. D. *et al.* (2002) 'The assembly of functional beta2-microglobulin-free MHC class I molecules that interact with peptides and CD8+ T lymphocytes', *International Immunology*. Oxford University Press, 14(7), pp. 775–782. doi: 10.1093/intimm/dxf041.

Setiadi, A. F. *et al.* (2008) 'Epigenetic enhancement of antigen processing and presentation promotes immune recognition of tumors.', *Cancer research*, 68(23), pp. 9601–7. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5270.

Shayan, G. *et al.* (2017) 'Adaptive resistance to anti-PD1 therapy by Tim-3 upregulation is mediated by the PI3K-Akt pathway in head and neck cancer', *Oncotarget*. Taylor & Francis, 6(1), p. e1261779. doi: 10.1080/2162402X.2016.1261779.

Shen, Y.-Q. *et al.* (2007) 'Low-molecular-weight protein (LMP)2/LMP7 abnormality underlies the downregulation of human leukocyte antigen class I antigen in a hepatocellular carcinoma

cell line.', *Journal of gastroenterology and hepatology*, 22(7), pp. 1155–61. doi: 10.1111/j.1440-1746.2006.04421.x.

Silvestrini, M. T. *et al.* (2016) 'Abstract LB-052: Activatable nanodelivery combined with CpG-ODN and anti-PD-1 achieves a complete response in directly-treated and contralateral tumors in a murine breast cancer model', *Cancer Research*. American Association for Cancer Research, 76(14 Supplement), p. LB-052-LB-052. doi: 10.1158/1538-7445.AM2016-LB-052.

Simpson, J. A. D. *et al.* (2010) 'Intratumoral T cell infiltration, MHC class I and STAT1 as biomarkers of good prognosis in colorectal cancer.', *Gut*. BMJ Publishing Group, 59(7), pp. 926–33. doi: 10.1136/gut.2009.194472.

van der Sluis, T. C. *et al.* (2015) 'Therapeutic Peptide Vaccine-Induced CD8 T Cells Strongly Modulate Intratumoral Macrophages Required for Tumor Regression', *Cancer Immunology Research*, 3(9), pp. 1042–1051. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0052.

Šmahel, M. *et al.* (2001) 'Modified HPV16 E7 Genes as DNA Vaccine against E7-Containing Oncogenic Cells', *Virology*. Academic Press, 281(2), pp. 231–238. doi: 10.1006/VIRO.2000.0794.

Šmahel, M. *et al.* (2003) 'Immunisation with modified HPV16 E7 genes against mouse oncogenic TC-1 cell sublines with downregulated expression of MHC class I molecules', *Vaccine*. Elsevier, 21(11–12), pp. 1125–1136. doi: 10.1016/S0264-410X(02)00519-4.

Šmahel, M. *et al.* (2011) 'Systemic administration of CpG oligodeoxynucleotide and levamisole as adjuvants for gene-gun-delivered antitumor DNA vaccines.', *Clinical & developmental immunology*. Hindawi, 2011, p. 176759. doi: 10.1155/2011/176759.

Šmahel, M. (2013) 'Biolistic DNA Vaccination Against Cervical Cancer', in *Biolistic DNA Delivery*. Totowa, NJ: Humana Press, pp. 339–355. doi: 10.1007/978-1-62703-110-3_25.

Smith, D. A. *et al.* (2014) 'Antitumor activity and safety of combination therapy with the Toll-like receptor 9 agonist IMO-2055, erlotinib, and bevacizumab in advanced or metastatic non-small cell lung cancer patients who have progressed following chemotherapy', *Cancer Immunology, Immunotherapy*. Springer Berlin Heidelberg, 63(8), pp. 787–796. doi: 10.1007/s00262-014-1547-6.

Springer, S. (2015) 'Transport and quality control of MHC class I molecules in the early secretory pathway', *Current Opinion in Immunology*, 34, pp. 83–90. doi: 10.1016/j.coi.2015.02.009.

Stavropoulos, N. E. *et al.* (1999) 'Antiproliferative activity of interferon gamma in superficial bladder cancer.', *Anticancer research*, 19(5C), pp. 4529–33. PMID:10650805.

Stroynowski, I. (1990) 'Molecules related to class-I major histocompatibility complex antigens.', *Annual review of immunology*. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA, 8, pp. 501–30. doi: 10.1146/annurev.iy.08.040190.002441.

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

- Swain, S. M. *et al.* (2015) 'Pertuzumab, Trastuzumab, and Docetaxel in HER2-Positive Metastatic Breast Cancer', *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society, 372(8), pp. 724–734. doi: 10.1056/NEJMoa1413513.
- Tagliamonte, M. *et al.* (2014) 'Antigen-specific vaccines for cancer treatment', *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. Taylor & Francis, 10(11), pp. 3332–3346. doi: 10.4161/21645515.2014.973317.
- Tan, C. *et al.* (2013) 'Impact of anti-CD25 monoclonal antibody on dendritic cell-tumor fusion vaccine efficacy in a murine melanoma model', *Journal of Translational Medicine*. BioMed Central, 11(1), p. 148. doi: 10.1186/1479-5876-11-148.
- Tang, L. *et al.* (2017) 'CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human zygotes using Cas9 protein', *Molecular Genetics and Genomics*. Springer Berlin Heidelberg, 292(3), pp. 525–533. doi: 10.1007/s00438-017-1299-z.
- Thoreau, M. *et al.* (2015) 'Vaccine-induced tumor regression requires a dynamic cooperation between T cells and myeloid cells at the tumor site.', *Oncotarget*. Impact Journals, LLC, 6(29), pp. 27832–46. doi: 10.18632/oncotarget.4940.
- Topalian, S. L. *et al.* (2014) 'Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab.', *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. American Society of Clinical Oncology, 32(10), pp. 1020–30. doi: 10.1200/JCO.2013.53.0105.
- Villegas, F. R. *et al.* (2002) 'Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer', *Lung Cancer*, 35(1), pp. 23–28. doi: 10.1016/S0169-5002(01)00292-6.
- Vlková, V. *et al.* (2014) 'Epigenetic regulations in the IFN γ signalling pathway: IFN γ -mediated MHC class I upregulation on tumour cells is associated with DNA demethylation of antigen-presenting machinery genes.', *Oncotarget*, 5(16), pp. 6923–35. doi: 10.18632/oncotarget.2222.
- Wang, H. *et al.* (2013) 'One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering.', *Cell*. NIH Public Access, 153(4), pp. 910–8. doi: 10.1016/j.cell.2013.04.025.
- Wang, H. L. *et al.* (2014) 'In vitro and in vivo evaluations of human papillomavirus type 16 (HPV16)-derived peptide-loaded dendritic cells (DCs) with a CpG oligodeoxynucleotide (CpG-ODN) adjuvant as tumor vaccines for immunotherapy of cervical cancer', *Archives of Gynecology and Obstetrics*. Springer Berlin Heidelberg, 289(1), pp. 155–162. doi: 10.1007/s00404-013-2938-1.
- Watson, N. F. S. *et al.* (2006) 'Immunosurveillance is active in colorectal cancer as downregulation but not complete loss of MHC class I expression correlates with a poor prognosis.', *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 118(1), pp. 6–10. doi: 10.1002/ijc.21303.
- Wilson, C. J. *et al.* (2018) 'Response to "Unexpected mutations after CRISPR–Cas9 editing in vivo"', *Nature Methods*, 15(4), pp. 236–237. doi: 10.1038/nmeth.4552.
- Witt, K. *et al.* (2018) 'Cripto-1 Plasmid DNA Vaccination Targets Metastasis and Cancer Stem

- Cells in Murine Mammary Carcinoma.', *Cancer immunology research*. American Association for Cancer Research, 6(11), pp. 1417–1425. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-17-0572.
- Wu, W.-H. *et al.* (2016) 'CRISPR Repair Reveals Causative Mutation in a Preclinical Model of Retinitis Pigmentosa', *Molecular Therapy*. Cell Press, 24(8), pp. 1388–1394. doi: 10.1038/MT.2016.107.
- Xu, B. *et al.* (2015) 'Circulating and tumor-infiltrating Tim-3 in patients with colorectal cancer.', *Oncotarget*. Impact Journals, LLC, 6(24), pp. 20592–603. doi: 10.18632/oncotarget.4112.
- Xu, L. *et al.* (2015) 'Increased Tim-3 expression in peripheral NK cells predicts a poorer prognosis and Tim-3 blockade improves NK cell-mediated cytotoxicity in human lung adenocarcinoma', *International Immunopharmacology*. Elsevier, 29(2), pp. 635–641. doi: 10.1016/J.INTIMP.2015.09.017.
- Yan, W. *et al.* (2015) 'Tim-3 fosters HCC development by enhancing TGF- β -mediated alternative activation of macrophages.', *Gut*. BMJ Publishing Group, 64(10), pp. 1593–604. doi: 10.1136/gutjnl-2014-307671.
- Yang, B. *et al.* (2014) 'DNA vaccine for cancer immunotherapy', *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. Taylor & Francis, 10(11), pp. 3153–3164. doi: 10.4161/21645515.2014.980686.
- Yang, H.-S. *et al.* (2009) 'Cancer Biology & Therapy Identification of beta2-microglobulin as a potential target for ovarian cancer', *Cancer Biology & Therapy 2323 ReseaRCh PaPeR Cancer Biology & Therapy*, 8, pp. 2323–2328. doi: 10.4161/cbt.8.24.9982.
- Yao, S. and Chen, L. (2014) 'PD-1 as an immune modulatory receptor.', *Cancer journal (Sudbury, Mass.)*. NIH Public Access, 20(4), pp. 262–4. doi: 10.1097/PPO.0000000000000060.
- Zaretsky, J. M. *et al.* (2016) 'Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma', *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society, 375(9), pp. 819–829. doi: 10.1056/NEJMoa1604958.
- Zhang, G. L. *et al.* (2014) 'Human Leukocyte Antigen Typing Using a Knowledge Base Coupled with a High-Throughput Oligonucleotide Probe Array Analysis', *Frontiers in Immunology*. Frontiers, 5, p. 597. doi: 10.3389/fimmu.2014.00597.
- Zhao, X. *et al.* (2018) 'B Cell Lymphoma Immunotherapy Using TLR9-Targeted Oligonucleotide STAT3 Inhibitors', *Molecular Therapy*. Cell Press, 26(3), pp. 695–707. doi: 10.1016/J.YMTHE.2018.01.007.
- Zhao, Y. *et al.* (no date) 'MOJ Cell Science and Report Developing CRISPR/Cas9 Technologies for Research and Medicine', *MOJ Cell Sci Report*, 2014(1), p. 6. doi: 10.15406/mojcsr.2014.01.00006.