

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát dizertační práce



**Rekombinantní vakcíny proti solidním a hematologickým nádorům:
vývoj a stanovení jejich účinnosti**

**Recombinant vaccines against solid and hematological cancer:
development and monitoring of vaccines-induced immunity**

RNDr. Katarína BABIAROVÁ

Praha, 2013

Doktorské studijní programy v biomedicině*Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky*

Obor: buněčná a molekulární biologie, genetika a virologie

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

Školící pracoviště: Laboratoř rekombinantních vakcín
Oddělení experimentální virologie
Ústav hematologie a krevní transfuze
U Nemocnice 1, 128 20 Praha 2

Školitel: RNDr. Šárka NĚMEČKOVÁ, DrSc.

OBSAH

1. SEZNAM ZKRATEK.....	2
2. ABSTRAKT.....	4
3. ABSTRACT.....	5
4. ÚVOD	6
5. CÍLE PRÁCE.....	7
6. MATERIÁL A HLAVNÍ METODIKA.....	7
7. VÝSLEDKY	9
8. DISKUZE.....	10
9. ZÁVĚRY.....	16
10. POUŽITÁ LITERATURA	17
CURRICULUM VITAE	21
VLASTNÍ PUBLIKACE	22

1. SEZNAM ZKRATEK

(k)bp	1000 base pairs
(r)VACV	(rekombinant) vaccinia virus
12B1	BCR-ABL transformed mouse (Balb/c) leukemic cells
5-azaC	5-azacytidine
A	adenine
ABL	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog
APC	antigen-presenting cells
Balb/c	type of inbreeding mice
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
BCR	Breakpoint Cluster Region
BCR-ABL	fusion protein encoded by Philadelphia chromosome in CML
C	cytosine
C57Bl/6	type of inbreeding mice
CD	Cluster of Differentiation
CD40L	CD40 ligand
CML	Chronic Myeloid Leukemia
CpG ODN	CpG oligodeoxynucleotides
CTL	cytotoxic T-lymphocyte
DC	dendritic cells
DNA	deoxyribonucleic acid
E/L	poxvirus early/late synthetic promotor
ELISPOT	Enzyme-Linked Immunosorbent Spot Assay
Fc	immunoglobulin fragment
Flt3	Fms-like tyrosinkinase 3
Flt3L	Fms related tyrosine kinase 3 Ligand
FoxP3	transcription factor Forkhead box P3
G	guanine
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
Gr-1	granulocyte differentiation antigen 1
GUS-WT1	fusion protein consisting of gene for β -glucuronidase and a part of gene for murine WT1
H5	promoter of poxvirus gene H5R
HLA	Human Leukocyte Antigen
HPV (16)	Human Papillomavirus (16)
HPV16-E6	oncoprotein E6 encoded by HPV16
HPV16-E7	oncoprotein E7 encoded by HPV16
i.c.	intracellular (y)
i.d.	intradermal(ly)

i.m.	intramuscular(y)
i.n.	intranasal(ly)
i.p.	intraperitoneal(ly)
IFA	incomplete Freund's adjuvant
IFN	interferon
Ig	immunoglobulin
IL	interleukin
K562	human acute myelocytic leukemia cell line
kDa	1000 Daltons
LAMP	lysosomal-associated membrane protein
mAb	monoclonal antibody(s)
MDSC	myeloid-derived suppressor cells
MHC	major histocompatibility complex
MPyV	Mouse Polyomavirus
mRNA	messenger ribonucleic acid
MVA	Modified Vaccinia virus Ankara
NK	Natural Killer
PBS	phosphate buffered saline
poly I:C	polyinosinic-polycytidylic acid
s.c.	subcutaneous(ly)
SigE7LAMP	fusion protein consisting of HPV16-E7 and signal sequence of LAMP1
T	thymine
TA	tumor antigen(s)
TC-1	HPV16-E6, HPV16-E7 and H-ras transformed murine (C57Bl/6 mice) cell line
TGF β	Transforming Growth Factor β
TGF β II-Fc	Transforming Growth Factor β Receptor II fused with immunoglobulin fragment
TGF β RI, II, III	Transforming Growth Factor β Receptor I, II, III
Th-lymfocyty	helper T lymphocytes
TRAMP-C2	WT1+ cell line of prostate cancer in C57Bl/6 mice
Treg	Regulatory T cells
VACV-E3	vaccinia virus protein E3
VLP	virus-like particles
WT1	Wilms' tumor 1

2. ABSTRAKT

Nádorová buňka je charakteristická produkcí nádorových antigenů, čímž se odlišuje od normální somatické buňky a stává se cílem efektorových mechanismů protinádorové imunity. Předložená práce byla zaměřena na vývoj a především studium buněčné imunitní odpovědi rekombinantních vakcín namířených proti několika nádorovým antigenům, specifickým pro hematologické a solidní nádory. Stanovení účinnosti těchto vakcín probíhalo na myším modelu, především pomocí testu ELISPOT-IFN γ .

V první části jsem se soustředila na vývoj a stanovení účinnosti genetických a peptidových vakcín proti WT1+ nádorům. Jako nejefektivnější se ukázaly peptidové vakcíny aplikované intradermálně (i.d.) tetováním, podávané společně s nemetylovanými CpG motivy a protilátkou neutralizující TGF β v nádoru.

Dále jsem sledovala protinádorovou imunitní odpověď na vakcíny nesoucí sekvenci ze spojové oblasti fúzního proteinu BCR-ABL, charakteristického pro chronickou myeloidní leukemii. V laboratoři Doc. Forstové byly připraveny vakcíny na bázi partikulí podobných myším polyomaviru (MPyV-VLP), v naší laboratoři jiné typy vakcín (rekombinantní virus vakcinie (rVACV), DNA). Vakcíny nebyly účinné, jelikož protein BCR-ABL není vhodný imunogen, jak se ukázalo později nejen z této studie.

V poslední části dizertační práce se podařilo zvýšit účinnost rVACV vakcín proti nádorům asociovaným s lidským papilomavirem 16 (HPV 16) pomocí ko-exprese různých imunomodulátorů (receptor II. typu pro TGF β , Flt3 ligand).

Klíčové slova: WT1 protein, BCR-ABL protein, MPyV-VLP, rVACV, protinádorové vakcíny

3. ABSTRACT

Cancer immunotherapy is concerned generally with the activation of cancer immunity specific for tumor antigens (TA) produced by cancer cells. My PhD thesis focused on the development of different types of cancer vaccines expressing various TA and predominantly on the determination of the efficacy of these vaccines. For studying TA-specific cancer cellular immunity in mice immunized with these vaccines, I used mainly the ELISPOT-IFN γ assay.

First, DNA, recombinant vaccinia virus (rVACV) and peptide vaccines against WT1 positive tumors were prepared. They consist of a fragment of WT1 protein with motifs predicted to bind to D^b murine MHC class I. The administration of peptide vaccines by tattoo delivery in combination with unmethylated CpG motifs and anti-TGF β monoclonal antibody was the most effective.

Next, I was interested in the immunotherapy of chronic myeloid leukemia (CML). Hruskova et al. prepared the mouse polyomavirus-like particles (MPyV-VLP) carrying the junction region of BCR-ABL fusion protein (16). In our laboratory, there were constructed the other types of CML vaccines with the expression of the junction region of BCR-ABL fusion protein, such as DNA or rVACV, too. Prepared vaccines failed to induce effective cancer immune response. It seems that BCR-ABL epitopes appeared to be a weakly immunogenic.

Finally, we were able to enhance the effectiveness of the rVACV vaccines against tumors expressing HPV16-E7 oncoprotein by co-expression of either soluble TGF β receptor II or Flt3 ligand.

Key words: WT1 protein, BCR-ABL protein, MPyV-VLP, rVACV, cancer vaccines

4. ÚVOD

Imunoterapie nádorů je založena na rozdílech nádorové buňky a jejího mikroprostředí oproti normálním buňkám zbytku těla, např. přítomnosti nádorových antigenů (TA; tumor antigens). Jedním z jejích úkolů je aktivace TA-specifických efektorových mechanismů. Cílem této práce byl vývoj rekombinantních vakcín proti nádorům pozitivním na TA a především studium jimi indukované imunitní odpovědi. Účinnost vakcín byla sledována na myším modelu.

V první části jsem se soustředila na vývoj a stanovení účinnosti genetických a peptidových vakcín proti WT1+ hematologickým a solidním nádorům. Genetické vakcíny exprimovaly fragment mezi 94. a 249. aminokyselinou myšího proteinu WT1, který sestával z několika známých epitopů specifických pro cytotoxické T-lymfocyty (CTL; cytotoxic T-lymphocytes). Jako nejefektivnější se ukázaly peptidové vakcíny aplikované i.d. tetováním a podávané společně s protilátkou vychytávající TGF β v nádoru (1).

Dalším úkolem mé doktorandské práce bylo studium chronické myeloidní leukémie (CML) a možnosti její terapie. Expresí fúzního proteinu BCR-ABL je charakteristická pro více než 90% pacientů s CML. Různé studie naznačovaly, že tento protein (především jeho unikátní zlomová oblast) je imunogen vhodný pro indukci protinádorové odpovědi. V našich laboratořích bylo vytvořeno několik typů vakcín exprimujících sekvenci dlouhou 25 aminokyselin ze zlomové oblasti uvedené části proteinu: plasmidové DNA vakcíny (21); vakcíny na bázi rVACV a vakcíny z dendritických buněk (Němečková, nepublikovaná data), či nádorové buněčné vakcíny (29-31). V laboratoři Doc. Forstové byly zkonstruovány také vakcíny na bázi MPyV-VLP, ve kterých jsem nedetekovala žádnou BCR-ABL-specifickou buněčnou protinádorovou odpověď. Ukázalo se, že nejsou účinné ani v terapii myších nádorů (16). Později se zjistilo, že protein BCR-ABL není vhodný imunogen.

Už několik let se v naší laboratoři věnuje pozornost přípravě rVACV vakcín proti nádorům asociovaným s lidským papilomavirem 16 (HPV 16), v poslední době především zvýšení jejich protinádorové účinnosti ko-expresí různých imunomodulátorů (receptoru II. typu pro TGF β , Flt3 ligand) (42,43). Náplní mojí části práce bylo studium protinádorové imunity indukované těmito rVACV.

5. CÍLE PRÁCE

Vývoj rekombinatních vakcín proti nádorovým antigenům specifickým pro hematologické a solidní nádory:

- 1) Vývoj vakcíny proti nádorům exprimujícím WT1 a studium efektorových mechanismů protinádorové imunitní odpovědi.
- 2) Studium imunitní odpovědi proti nádorovému antigenu BCR-ABL po imunizaci vakcínami na bázi partikulí podobných myšímu polyomaviru.
- 3) Studium buněčné imunitní odpovědi vyvolané imunizací vakcínami rekombinantního viru vakcinie proti nádorům asociovaným s lidským papilomavirem 16, u kterých byla jejich protinádorová účinnost zvýšená ko-expresí imunomodulátorů (receptoru II. typu pro TGF β ; Flt3 ligand).

6. MATERIÁL A HLAVNÍ METODIKA

V této dizertační práci byly metodami genového inženýrství zkonstruovány různé typy protinádorových vakcín. V první části jsme připravili DNA vakcíny nebo rVACV, které nesly fúzní gen GUS-WT1 (GUS = pomocný gen pro β -glukuronidázu z bakterie *E. coli*; WT1 = fragment myšího proteinu WT1 o velikosti 155 aminokyselin, mezi 94. a 249. aminokyselinou) nebo nechali nasyntetizovat různé peptidové vakcíny odvozené od proteinu WT1. V další části práce byly v laboratoři Doc. Forstové připraveny chimerické BCR-ABL VLP, tj. MPyV-VLP, které nesly fragment, o velikosti 177 aminokyselin, ze spojové oblasti fúzního proteinu BCR-ABL. Poslední námi zkonstruované rVACV vakcíny exprimovaly účinný, vysoce imunogenní nádorový onkoprotein HPV16-E7 v rekombinantní formě SigE7LAMP (Sig = signální sekvence membránového proteinu asociovaného s lyzozomem 1 (LAMP1); E7 = virový onkoprotein HPV16-E7; LAMP = transmembránová a intracelulární doména LAMP1) společně s následujícími imunomodulátory: extracelulární část receptoru II. typu pro TGF β (TGF β RII), resp. jeho upravenou variantu fúzovanou s Fc fragmentem IgG (TGF β RII-Fc) nebo Flt3 ligand (Flt3L).

Pro stanovení účinnosti těchto vakcín byly v této práci používány myší modely Balb/c (vakcíny pro terapii CML, resp. BCR-ABL+ nádory) a C57Bl/6 (vakcíny pro terapii WT1+ anebo HPV16-E7+ nádorů). Ve všech experimentech byly myši imunizovány jednotlivými vakcínami nebo jejich kombinacemi (viz níže popsání imunizačního schéma). Ve většině experimentů byly 12 dní po poslední imunizaci myším odebrány sleziny. Vyizolované splenocyty se používaly jako výchozí materiál pro testování protinádorové buněčné imunity *in vitro*, indukované vakcínami. Na stanovení funkčnosti T-lymfocytů indukovaných danou vakcínou jsme využívali převážně test ELISPOT-IFN γ (CTL, Th-1 odpověď). Tato metoda byla prováděna ihned po izolaci splenocytů (*ex vivo*, tj. 20hod inkubace *in vitro*) nebo po 6-denní kultivaci *in vitro* s daným stimulantem. Jako stimulanty byly použity převážně epitopy odvozené z daného TA.

Při sledování imunologického účinku vakcín namířených proti HPV16-E7 byl test ELISPOT-IFN γ doprovázen detekcí HPV16-E7-specifických CTL pomocí průtokové cytometrie, kde jsme měřili buňky pozitivní na marker CD8 a na fluorescenčně značený (R-phycoerythrin) tetramer H-2D^b/E7₄₉₋₅₇ (Pelimer, Sanquin, NL).

V některých experimentech jsme na průtokovém cytometru sledovali také imunosupresivní faktory, především populaci Treg prostřednictvím fluorescenčně značených protilátek proti markerům CD4, CD25, FoxP3, a to hlavně v čerstvě izolovaných buňkách lymfatických uzlin z imunizovaných myší.

Účinnost připravených protinádorových vakcín se sledovala také *in vivo* na myším modelu na základě pozorování zpomalení růstu, resp. ústupu nádorů. Většina experimentů byla zaměřena na sledování imunoterapeutického efektu dané vakcíny. Nejdříve byly myším subkutánně (s.c.) aplikovány modelové nádorové buněčné linie (WT1+ linie TRAMP-C2 odvozena z nádoru prostaty myší C57Bl/6; BCR-ABL+ leukemická myší buněčná linie 12B1 odvozená z myší Balb/c; HPV16-E7+ linie TC-1 odvozena z plicního epitelu myší kmene C57Bl/6). Den poté myši obdržely danou vakcínu. DNA vakcíny byly podávány intradermálně (i.d.) pomocí genové pistole, rVACV intraperitoneálně (i.p.), MPyV-VLP i.p. anebo intranazálně (i.n.) a peptidy nejdříve s.c., později i.d. tetováním. Následně byla v časových intervalech měřena velikost nádorů. V některých experimentech jsme sledovali potenciál připravených vakcín v preventivním schématu imunizace. V tomto případě byla myším nejdříve podána daná vakcína, o dva týdny později daná modelová nádorová buněčná linie.

7. VÝSLEDKY

Předkládaná dizertační práce byla zaměřena na vývoj a především stanovení účinnosti rekombinantních vakcín proti následujícím nádorovým antigenům: (a) WT1, autologní protein, jehož zvýšená exprese anebo mutovaná forma je typická pro různé solidní a hematologické nádory; (b) fúzní protein BCR-ABL, charakteristický pro hematologické onkologické onemocnění CML; (c) virový onkoprotein HPV16-E7, jehož působení (ve spolupráci s HPV16-E6) vede k vzniku cervikálního karcinomu po perzistentní infekci rizikovým typem papilomaviru. Byly připraveny různé typy vakcín: genetické (DNA, rVACV), VLP a peptidové.

V první části jsme připravili několik typů vakcín exprimujících fúzní protein GUS-WT1 (DNA, rVACV a peptidové vakcíny). Peptidy WT₁₂₂₋₁₄₀ a WT₁₂₆₋₁₃₄, podávané i.d. tetováním společně s nemetylovanými CpG oligonukleotidy (CpG ODN), vyvolávaly signifikantně vyšší IFN γ + WT1-specifickou T-buněčnou imunitní odpověď než ty samé vakcíny podávané s.c. společně s CpG ODN v kombinaci s nekompletním Freundovým adjuvans (IFA) nebo než imunizace jinými typy vakcín. V terapii myších TRAMP-C2 nádorů se ukázaly peptidy WT₁₂₂₋₁₄₀ a WT₁₂₆₋₁₃₄ nejúčinnější ze všech připravených vakcín pouze tehdy, když byl pomocí monoklonální protilátky (mAb) neutralizován TGF β , jež buňky TRAMP-C2 produkují v hojné míře. Jiné ovlivnění, jako odstranění Treg, deregulace exprese pomocí 5-azacytidinu nebo zvýšení molekul MHC I. třídy pomocí poly I:C protinádorový efekt imunizace proti WT1 nezvýšilo. Při srovnání s genetickými vakcínami (DNA, rVACV) mělo tetování peptidovými vakcínami největší inhibiční účinek na růst TRAMP-C2 nádorů.

Dalším úkolem mé dizertační práce bylo studium imunitní odpovědi proti nádorovému antigenu BCR-ABL po imunizaci vakcínami na bázi MPyV-VLP. V laboratoři Doc. Forstové byly zkonstruovány chimerické virové partikule BCR-ABL VLP, sestávající ze sekvence o velikosti 171 aminokyselin ze zlomové oblasti BCR-ABL, vložené do MPyV-VLP. Nezjistila jsem žádnou aktivitu BCR-ABL-specifických CTL, ani přítomnost IFN γ pozitivní BCR-ABL specifické T-buněčné imunitní odpovědi. Detekce IgG a IgM protilátek specifických proti BCR-ABL vedla též k negativním výsledkům. Pozorování potvrzují, že zlomová oblast fúzního proteinu BCR-ABL je hodně slabým imunogenem.

Poslední část této práce byla zaměřena na studium buněčné imunitní odpovědi vyvolané imunizací vakcínami rVACV proti nádorům asociovaným s lidským papilomavirem 16, u kterých byla jejich protinádorová účinnost zvýšená ko-expresí imunomodulátorů

(TGF β R2); Flt3L). Zkonstruovali jsme rVACV vakcíny exprimující SigE7LAMP s ko-expresí solubilní formy TGF β R2 nebo TGF β R2-Fc nebo s ko-expresí Flt3L. Ko-exprese těchto imunomodulátorů byla řízená pod časným H5 nebo syntetickým časně/pozdním E/L promotorem rVACV.

Exprese TGF β R2 a TGF β R2-Fc neovlivnila množení rVACV *in vitro*, ani *in vivo*. Rozdíly ve vyvolání HPV16-E7 specifické IFN γ pozitivní T-buněčné imunitní odpovědi mezi dvojitými rVACV a rVACV exprimujícími jenom SigE7LAMP byly minimální. Zjistila jsem zvýšenou buněčnou imunitu specifickou pro VACV-E3 po imunizaci dvojitými rekombinantami rVACV. Produkce TGF β R2 pod kontrolou H5 promotoru VACV významně zvýšila účinnost rVACV vakcíny při terapii TC-1 nádorů u myši.

Testování produkce Flt3L *in vitro* ukázalo vyšší produkci Flt3L pod kontrolou promotoru E/L než pod H5, *in vivo* naopak vyšší expresi Flt3L pod kontrolou H5 než pod E/L. Množení těchto virů *in vitro* a *in vivo* nebylo ovlivněné produkcí Flt3L. V některých intervalech po imunizaci ukázala detekce buněčné imunitní odpovědi zvýšené množství IFN γ + T-lymfocytů specifických pro HPV16-E7 u dvojitě rekombinanty rVACV s expresí Flt3L pod H5 promotorem rVACV. Pozitivní efekt protinádorové imunity vyvolané touto rekombinantou rVACV se projevil jak v terapii, tak v protekci myši proti HPV16-E6 a HPV16-E7 pozitivních nádorových buněk TC-1. Zvýšená exprese Flt3L pod H5 vedla k inhibici expanze CD11b+Gr-1+ MDSC a k nárůstu CD11b+CD11c+ DC ve slezinách imunizovaných myši.

8. DISKUZE

Cílem této práce bylo především studium buněčné imunitní odpovědi rekombinantních vakcín namířených proti několika nádorovým antigenům, specifickým pro hematologické a solidní nádory. Účinnost připravených vakcín se sledovala *in vivo* na myším modelu na základě dvou hlavních kritérií. Prvním bylo pozorování zpomalení růstu, resp. ústupu nádorů. Druhým, a zároveň mým hlavním úkolem, byla detekce protinádorové imunity, kterou tyto vakcíny vyvolávají.

Na sledování funkčnosti T-lymfocytů indukovaných některou z připravených vakcín jsem využívala převážně test ELISPOT-IFN γ . I když je sekrece IFN γ typická i pro jiné složky imunity (např. NK-buňky), jeho nejvyšší hladiny jsou produkovány aktivovanými

T-lymfocyty (35). Jelikož nestimulované T-lymfocyty produkují nepatrné množství cytokinů, je potřebná jejich stimulace *in vitro* s vybranými peptidy (33). Jako stimulační peptidy jsem používala převážně CTL epitopy, specifické pro MHC molekuly I. třídy. Vzhledem na extrémní citlivost množících se CTL na koncentraci peptidu v kultivačním mediu a na jejich různou afinitu k H2-D^b, jsem nejdříve musela vybrat vhodný peptid-epitop a stanovit jeho optimální koncentraci pro experimenty *in vitro*. CTL epitopy byly vybrány na základě literatury a predikce použitím algoritmů RANKPEP a SYFPEITHI. Detekce HPV16-E7-specifické T-buněčné imunitní odpovědi byla v naší laboratoři už zavedená (H-2D^b peptid HPV16-E7₄₉₋₅₇, tj. RAHYNIVTF) (23). Optimalizovala a zaváděla jsem test ELISPOT-IFN γ pro stanovení WT1-specifické T-buněčné imunity a VACV-specifické imunity.

Nejdřív jsem otestovala odpověď proti CTL epitopům z proteinu WT1, predikovaným z literatury a dle výše popsaného algoritmu. Myši byly imunizovány s.c. syntetickými nonapeptidy (odvozené od té části myšího proteinu WT1, kterou exprimují zkonstruované genetické vakcíny, tj. WT1₁₂₆₋₁₃₅, WT1₁₃₆₋₁₄₄, WT1₁₃₀₋₁₃₈, WT1₂₂₅₋₂₃₃, WT1₂₃₅₋₂₄₃) v kombinaci s IFA ve směsi s CpG ODN pro nespecifickou stimulaci imunity. Zjistila jsem, že nejimunogennější je peptid WT1₁₂₆₋₁₃₅, který jsem pak používala ve všech experimentech pro testování WT1-specifické imunitní odpovědi imunizovaných myší.

Pro optimalizaci metody ELISPOT-IFN γ na stanovení VACV-specifické T-buněčné imunitní odpovědi byl nejdřív vybrán (použitím výše popsaného algoritmu) peptid VACV-E3₁₄₀₋₁₄₈ (VGPSNSPTF). Byl popsán jako H2-D^d afinitní, mezi poxviry vysoce konzervovaný epitop, vhodný pro detekci VACV-specifických CTL u Balb/c myší (39). V naší laboratoři byla nalezena vhodnost tohoto peptidu pro detekci odpovědi C57Bl/6 myší, kde se peptid váže na molekulu H-2D^b. Myši C57Bl/6 byly imunizovány viry rVACV s expresí GUS (1). Zjistila jsem, že splenocyty z těchto myší vykazovaly vysoké množství VACV-E3₁₄₀₋₁₄₈ specifických IFN γ + spotů, zatímco kontrolní skupina myší (po aplikaci PBS) byla negativní. Podobně negativní výsledky jsem získala po stimulaci splenocytů z těchto myší s kontrolním, irelevantním peptidem HPV16-E7₄₉₋₅₇.

Vývoj vakcíny proti nádorům exprimujícím WT1 a studium efektorových mechanismů protinádorové imunitní odpovědi

Dnes úspěšně aplikované peptidové vakcíny pro terapii WT1+ nádorů jsou omezeny na léčbu pacientů s konkrétními HLA molekulami, kterými jsou tyto epitopy prezentovány. Proto byly v naší laboratoři připraveny DNA a rVACV vakcíny, které měly být použitelné na léčbu u všech pacientů, bez ohledu na typ HLA. Zkonstruované genetické vakcíny exprimovaly fúzní gen GUS-WT1. GUS udílí fúzovaným antigenům větší imunogennost. Daný fragment myšího proteinu WT1 byl vybrán hlavně proto, že obsahuje vícero CTL epitopů specifických pro H-2D^b myší molekuly: WT1₁₂₆₋₁₃₅ (RMFPNAPYL), WT1₁₃₆₋₁₄₄ (SCLESQPTI) a WT1₂₃₅₋₂₄₃(CMTWNQMNL) (14,27) a má vysokou homologii (96% aminokyselinové sekvence) s molekulou lidského proteinu WT1 (5,12).

DNA a rVACV vakcíny nebyly dostatečně imunogenní, co může souviset se strukturou fúzního genu. Zdá se, že GUS je vhodnější pro imunizaci proti virovým proteinům, ale ne proti autolognímu proteinu WT1. Do studie byly proto zahrnuty i peptidové vakcíny odvozené od myšího proteinu WT1, u kterých byla předpovězena nebo popsána funkce epitopu specifického pro MHC molekuly I. a/nebo II. třídy (WT1₁₂₆₋₁₃₅, WT1₁₂₂₋₁₄₀, WT1₁₂₂₋₁₄₄).

Dodnes bylo uskutečněno několik experimentálních a klinických studií, které prokázaly účinnost peptidových vakcín, odvozených od proteinu WT1, aplikovaných s.c. anebo i.d. V této práci jsme zavedli nový způsob i.d. podání WT1 peptidů, tetování. V naší laboratoři bylo úspěšně použito už pro imunizaci onkoproteiny HPV16-E6 a HPV16-E7, kdy se ukázalo, že efektivnost peptidových vakcín výrazně ovlivňuje způsob aplikace (32). Zjistila jsem, že i.d. podání peptidů tetováním v kombinaci s CpG ODN vyvolává signifikantně vyšší WT1-specifickou IFN γ + T-buněčnou imunitní odpověď než s.c. podání těch samých peptidů v kombinaci s IFA+CpG ODN. Dále jsem pozorovala, že delší peptidy WT1₁₂₂₋₁₄₀ a WT1₁₂₂₋₁₄₄ jsou imunogennější než nonapeptid WT1₁₂₆₋₁₃₅. Tento výsledek je v souladu s pozorováním v laboratoři RNDr. Reiniše, kde zkoušeli účinnost peptidových vakcín proti tumoru exprimujícímu onkoproteiny HPV16-E6 a HPV16-E7 s deficiencí MHC molekul I. třídy (36). Delší peptid WT1₁₂₂₋₁₄₀ indukoval WT1-specifickou IFN γ + T-buněčnou imunitní odpověď jenom proti peptidu, kterým byla myš imunizována, avšak ne proti CTL specifickým pro epitop WT1₁₂₆₋₁₃₅ (jenž je jeho součástí). Příčinou může být nedostatečné zpracování WT1 proteinu v APC.

Buněčná linie TRAMP-C2 je typická sníženou expresí MHC molekul I. třídy na svém povrchu (19), co může být způsobeno epigenetickými mechanizmy. Bylo prokázáno, že inkubace nádorových buněk s inhibitory deacetyláz histonů (jako 5-azacytidin (5-azaC) nebo poly I:C) vede ke zvýšené expresi MHC molekul I. třídy na povrchu těchto nádorových buněk, především prostřednictvím stimulace produkce IFN γ (9,13,24,26). I v této dizertační práci se potvrdilo, že inkubace TRAMP-C2 s IFN γ , 5-aza-C nebo poly I:C zvyšuje expresi těchto molekul na povrchu TRAMP-C2, avšak vliv těchto látek na imunizační efekt zkonstruovaných vakcín nebyl prokázán.

Ověřovali jsme také, zda přítomnost Treg v nádoru (jako inhibitoru protinádorové imunity) může potlačit imunogennost zkonstruovaných vakcín. Aplikace mAb anti-CD25 myším sice vedla k polovičnímu snížení Treg i 50. den po jejím podání, avšak kýžený efekt na vakcínami vyvolanou imunitu i na růst TRAMP-C2 nádoru nebyl pozorován.

Důležitou roli v diferenciaci a indukci Treg v tumoru sehrává TGF β , jehož efekt je možné blokovat pomocí protilátek (6,20,25). Nádorová linie buněk TRAMP-C2 produkuje TGF β v hojné míře. I když neutralizace TGF β nijak neovlivnila imunitní odpověď indukovanou peptidovými vakcínami po i.d. aplikaci tetováním, růst nádorů TRAMP-C2 byl v přítomnosti mAb anti-TGF β signifikantně zpomalen. Imunizace peptidy toto zpomalení ještě prohloubila. Zdá se, že hlavním cílem imunosupresivního působení TGF β v TRAMP-C2 nádorech nejsou Treg, ale jiný, zatím neznámý mechanismus, který vede k inhibici efektu protinádorové imunity indukované peptidovými vakcínami.

Studium imunitní odpovědi proti nádorovému antigenu BCR-ABL po imunizaci vakcínami na bázi MPyV-VLP

Mnohé studie poukázaly na to, že unikátní zlomová oblast BCR-ABL (fúzní protein typický pro CML) může být vhodným imunogenem pro indukci protinádorové imunity (2,7,41). Všechny zkonstruované vakcíny (chimerické BCR-ABL VLP, zkonstruované v laboratoři Doc. Forstové; různé DNA a rVACV vakcíny, exprimující část BCR-ABL, připravené v naší laboratoři) selhaly v protekci Balb/c myši nebo v terapii jejich nádorů způsobených podáním nádorové buněčné linie 12B1. Taktéž jsem nedetekovala žádnou IFN γ +, ani IL-2+ BCR-ABL specifickou protinádorovou imunitní odpověď ve splenocytech myši imunizovaných jednotlivými vakcínami. Ze všech těchto pozorování (21)(Publikace 2; nepublikovaná data) je možné usoudit, že zlomová oblast BCR-ABL není vhodný imunogen,

jelikož nevyvolává indukci BCR-ABL specifických CTL, ani B-buněk zodpovědných za tvorbu anti-BCR-ABL protilátek. Tyto výsledky jsou v souladu i s pozorováním jiných skupin (40). Objevila se studie, která vedla k indukci CTL prostřednictvím DC transfekovaných BCR-ABL mRNA (z buněk K562 nebo CML blastů). Vzniklé CTL však nebyly schopny rozeznávat epitopy odvozené z fúzního proteinu BCR-ABL (15). V jiné studii se zjistilo, že imatinibem navozená inhibice tyrozin-kinázové aktivity BCR-ABL proteinu způsobuje úbytek exprese TA (včetně WT1, Bcl-2), což vede k poklesu CML-specifických CTL (3).

Dle nové hypotézy, nikoli protein BCR-ABL jako takový, ale právě jeho biologická aktivita může mít vliv na expresi jiných genů kódujících potenciální TA, a tím na indukci CTL namířených proti leukemickým buňkám CML (15,37).

Studium buněčné imunitní odpovědi vyvolané imunizací rVACV proti nádorům asociovaným s HPV 16, u kterých byla jejich protinádorová účinnost zvýšena ko-expresí imunomodulátorů (TGFβRII; Flt3L)

Účinnost protinádorové rVACV vakcíny lze zvýšit, když jsou různé imunomodulátory (cytokiny, chemokiny, růstové faktory, kostimulační molekuly) exprimovány tím samým rVACV vektorem jako TA, např. GM-CSF (17), CD40L (10) apod.

Záměrem této části práce bylo zvýšení terapeutického potenciálu rVACV vakcíny s expresí SigE7LAMP simultánní ko-expresí inhibitorů TGFβ. Díky blokaci tohoto cytokinu může dojít k aktivaci dostatečně silné protinádorové HPV16-E7 specifické imunitní odpovědi a k efektivnější terapii nádorů TC-1. Dřívější studie ukázala, že TA-specifickou imunitní odpověď je možné zvýšit aplikací DNA vakcíny s inkorporovaným genem pro solubilní formu TGFβRII (18). Inhibice TGFβ pomocí tohoto receptoru vedla ke zvýšení CD8+ CTL ve slezinách myši a jejich nádorech, účinných proti malignímu mezoteliomu (38).

Jelikož jsem u dvojité rekombinanty rVACV, exprimující solubilní TGFβRII pod H5 promotorem, nezjistila zvýšené množství T-lymfocytů specifických pro TA HPV16-E7 a růst nádorů TC-1 byl zpomalen, hledali jsme jiné vysvětlení.

Naše hypotéza vychází ze zjištění, že tato rekombinanta produkuje kromě solubilní formy TGFβRII i větší množství méně glykozylované formy TGFβRII. Ta může být vylučována z buňky odlišnými mechanismy než klasický TGFβRII, např. exozomy. Protože mohou fúzovat s membránami sousedících buněk, napomáhají transportu různých proteinů

mezi buňkami. Tímto způsobem by mohl být do CTL anebo NK-buněk doručen TGF β navázaný na membránový receptor a snižovat jejich aktivitu (8).

Další možností pro zvýšení imunogenicity rVACV vakcíny je vložení genu pro solubilní faktor, který přímo aktivuje APC, což vede k lepší stimulaci rVACV vakcínou indukované protinádorové imunity. Tuto funkci splňuje růstový faktor Flt3L, který indukuje expanzi plasmacytoidních DC *in vitro*, a též je znám svými adjuvantními vlastnostmi a protinádorovou aktivitou *in vivo*. Extracelulární doména Flt3L a účinky tohoto cytokinu jsou u člověka a myši zaměnitelné, proto jsme zkonstruovali rVACV, které exprimovaly kromě SigE7LAMP i lidský Flt3L.

Zjistili jsme, že ko-exprese Flt3L vede ke zvýšenému výskytu HPV16-E7-specifické i VACV-E3 specifické imunitní odpovědi v porovnání s rVACV exprimující pouze SigE7LAMP. Pozitivní efekt protinádorové imunity vyvolané touto dvojitou rekombinantou rVACV se projevil jak v terapii, tak protekci myši proti HPV16-E6 a HPV16-E7 pozitivním nádorovým buňkám TC-1. Léčba vedla k regresi nádorů menších než 4 mm², ale neovlivnila růst větších nádorů.

Z různých studií se ukázalo, že aplikace Flt3L myším vede k expanzi DC, a tím k zvýšené frekvenci NK-buněk a B- a T-lymfocytů (11,22,34). Na druhou stranu, rVACV jsou známé indukci imunosuprese adaptivní imunitní odpovědi, která je zprostředkována MDSC v nádoru (napomáhající úniku nádoru před imunitou) (4). Ukázalo se, že nejúčinnější vakcína v našem modelu inhibuje expanzi CD11b⁺ Gr-1⁺ MDSC a zvyšuje hladinu CD11b⁺ CD11c⁺ DC ve slezině myši imunizovaných touto vakcínou. Taktéž se ví, že na výše popsanou expanzi DC a přepnutí na Th1 typ imunitní odpovědi je třeba opakovaně podávat Flt3L, nejlépe v průběhu 10 dnů (28). Stejného efektu, jak se ukázalo v této práci, je schopna jedna dávka rVACV ko-exprimujícího tento cytokin. Ovšem pod podmínkou, že kmen VACV, který se použije na konstrukci takového typu vakcíny, musí být schopný replikace uvnitř savčích buněk. Pokud byly myši imunizovány dvojitou rekombinantou rVACV kmene MVA, který se v savčích buňkách nereplikuje, exprese Flt3L byla krátkodobá. Ačkoli jsme detekovali vyšší imunitní odpověď, omezená koncentrace uvedeného cytokinu nevedla k dostatečnému protinádorovému efektu.

9. ZÁVĚRY

V této práci jsme zkonstruovali a především na myším modelu stanovili účinnost rekombinantních vakcín proti několika nádorovým antigenům, specifickým pro hematologické a solidní nádory.

Proti nádorům pozitivním na autologní protein WT1 byly zkonstruovány DNA vakcíny a vakcíny na bázi rVACV, které exprimovaly sekvenci myšího proteinu WT1 (mezi 94. a 249. aminokyselinou). Peptidové vakcíny byly odvozeny z té samé části uvedeného proteinu. Našli jsme vhodný biologický model pro stanovení vlivu připravených vakcín na růst nádorů, tj. WT1+ buněčnou linii TRAMP-C2, charakteristickou vysokou produkcí imunosupresivního TGF β . Zavedli jsme a optimalizovali test ELISPOT-IFN γ pro detekci vakcínami vyvolané WT1-specifické, jako i rVACV vakcínami vyvolané VACV-E3 specifické T-buněčné imunitní odpovědi. Protinádorový efekt připravených vakcín se podařilo zvýšit jenom neutralizací TGF β . Jiné ovlivnění nebylo účinné (zvýšení molekul MHC I. třídy pomocí poly I:C nebo demetylace těchto genů pomocí 5-azacytidinu, či odstranění Treg). V přítomnosti protilátky proti TGF β se jako nejúčinnější ukázaly peptidy aplikované i.d. tetováním, jak v terapii nádorů TRAMP-C2, tak v indukci IFN γ + protinádorové odpovědi namířené proti WT1.

V laboratoři Doc. Forstové byly připraveny vakcíny na bázi partikulí podobných myšímu polyomaviru, které nesly fragment o velikosti 177 aminokyselin ze spojové oblasti fúzního proteinu BCR-ABL. V naší laboratoři byly zkonstruovány i jiné typy vakcín (rVACV, DNA) s expresí peptidu dlouhého 25 aminokyselin z té samé oblasti proteinu charakteristického pro CML. Ani jedna z těchto vakcín neindukovala BCR-ABL-specifickou T-buněčnou imunitní odpověď, ani nebyla účinná v terapii myších leukemických nádorů. Ukázalo se, že protein BCR-ABL není vhodný imunogen.

Proti nádorům asociovaným s HPV16 byly zkonstruovány rVACV vakcíny s expresí SigE7LAMP, tj. imunogenní formy onkoproteinu HPV16-E7, jejichž činnost se podařilo zvýšit ko-expresí TGF β RII či Flt3L. Všechny dvojité rekombinanty vyvolaly imunitu, která vedla k redukci myších nádorů TC-1, pozitivních na HPV16-E6 a HPV16-E7. Ko-exprese Flt3L snižovala expanzi imunosupresivních MDSC, zvyšovala množství DC a měla pozitivní vliv na indukci funkční HPV16-E7-specifické protinádorové imunity. Ačkoli produkce TGF β RII nezvýšila buněčnou imunitu namířenou proti HPV16-E7, vedla ke zvýšení protinádorové imunity jako takové, v důsledku neutralizace imunosupresivního vlivu TGF β v nádorovém mikroprostředí.

10. POUŽITÁ LITERATURA

1. **Babiarova, K., L. Kutinova, K. Zurkova, J. Krystofova, E. Brabcova, P. Hainz, J. Musil, and S. Nemeckova.** 2012. Immunization with WT1-derived peptides by tattooing inhibits the growth of TRAMP-C2 prostate tumor in mice. *J.Immunother.* 35:478-487.
2. **Bocchia, M., T. Korontsvit, Q. Xu, S. Mackinnon, S. Y. Yang, A. Sette, and D. A. Scheinberg.** 1996. Specific human cellular immunity to bcr-abl oncogene-derived peptides. *Blood.* 87:3587-3592.
3. **Brauer, K. M., D. Werth, S. K. von, A. Bringmann, L. Kanz, F. Grunebach, and P. Brossart.** 2007. BCR-ABL activity is critical for the immunogenicity of chronic myelogenous leukemia cells. *Cancer Res.* 67:5489-5497.
4. **Bronte, V., M. Wang, W. W. Overwijk, D. R. Surman, F. Pericle, S. A. Rosenberg, and N. P. Restifo.** 1998. Apoptotic death of CD8+ T lymphocytes after immunization: induction of a suppressive population of Mac-1+/Gr-1+ cells. *J.Immunol.* 161:5313-5320.
5. **Buckler, A. J., J. Pelletier, D. A. Haber, T. Glaser, and D. E. Housman.** 1991. Isolation, characterization, and expression of the murine Wilms' tumor gene (WT1) during kidney development. *Mol.Cell Biol.* 11:1707-1712.
6. **Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K. J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady, and S. M. Wahl.** 2003. Conversion of peripheral CD4+ CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J.Exp.Med.* 198:1875-1886.
7. **Chen, W., D. J. Peace, D. K. Rovira, S. G. You, and M. A. Cheever.** 1992. T-cell immunity to the joining region of p210BCR-ABL protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 89:1468-1472.
8. **Clayton, A., J. P. Mitchell, J. Court, M. D. Mason, and Z. Tabi.** 2007. Human tumor-derived exosomes selectively impair lymphocyte responses to interleukin-2. *Cancer Res.* 67:7458-7466.
9. **Coral, S., L. Sigalotti, A. Gasparollo, I. Cattarossi, A. Visintin, A. Cattelan, M. Altomonte, and M. Maio.** 1999. Prolonged upregulation of the expression of HLA class I antigens and costimulatory molecules on melanoma cells treated with 5-aza-2'-deoxycytidine (5-AZA-CdR). *J.Immunother.* 22:16-24.
10. **Feder-Mengus, C., E. Schultz-Thater, D. Oertli, W. R. Marti, M. Heberer, G. C. Spagnoli, and P. Zajac.** 2005. Nonreplicating recombinant vaccinia virus expressing CD40 ligand enhances APC capacity to stimulate specific CD4+ and CD8+ T cell responses. *Hum.Gene Ther.* 16:348-360.

11. **Fernandez, N. C., A. Lozier, C. Flament, P. Ricciardi-Castagnoli, D. Bellet, M. Suter, M. Perricaudet, T. Tursz, E. Maraskovsky, and L. Zitvogel.** 1999. Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat.Med.* 5:405-411.
12. **Fraizer, G. C., P. Patmasiriwat, X. Zhang, and G. F. Saunders.** 1995. Expression of the tumor suppressor gene WT1 in both human and mouse bone marrow. *Blood* 86:4704-4706.
13. **Friboulet, L., C. Gourzones, S. W. Tsao, Y. Morel, C. Paturel, S. Temam, C. Uzan, and P. Busson.** 2010. Poly(I:C) induces intense expression of c-IAP2 and cooperates with an IAP inhibitor in induction of apoptosis in cancer cells. *BMC.Cancer* 10:327.
14. **Gaiger, A., V. Reese, M. L. Disis, and M. A. Cheever.** 2000. Immunity to WT1 in the animal model and in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 96:1480-1489.
15. **Grunebach, F., V. Mirakaj, V. Mirakaj, M. R. Muller, T. Brummendorf, and P. Brossart.** 2006. BCR-ABL is not an immunodominant antigen in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Res.* 66:5892-5900.
16. **Hruskova, V., A. Moravkova, K. Babiarova, V. Ludvikova, J. Fric, V. Vonka, and J. Forstova.** 2009. Bcr-Abl fusion sequences do not induce immune responses in mice when administered in mouse polyomavirus based virus-like particles. *Int.J.Oncol.* 35:1247-1256.
17. **Kim, J. H., J. Y. Oh, B. H. Park, D. E. Lee, J. S. Kim, H. E. Park, M. S. Roh, J. E. Je, J. H. Yoon, S. H. Thorne, D. Kirn, and T. H. Hwang.** 2006. Systemic armed oncolytic and immunologic therapy for cancer with JX-594, a targeted poxvirus expressing GM-CSF. *Mol.Ther.* 14:361-370.
18. **Kontani, K., K. Kajino, C. L. Huangi, S. Fujino, O. Taguchi, A. Yamauchi, H. Yokomise, and K. Ogasawara.** 2006. Spontaneous elicitation of potent antitumor immunity and eradication of established tumors by administration of DNA encoding soluble transforming growth factor-beta II receptor without active antigen-sensitization. *Cancer Immunol.Immunother.* 55:579-587.
19. **Kwon, E. D., A. A. Hurwitz, B. A. Foster, C. Madias, A. L. Feldhaus, N. M. Greenberg, M. B. Burg, and J. P. Allison.** 1997. Manipulation of T cell costimulatory and inhibitory signals for immunotherapy of prostate cancer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94:8099-8103.
20. **Li, M. O., S. Sanjabi, and R. A. Flavell.** 2006. Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity.* 25:455-471.
21. **Lucansky, V., E. Sobotkova, R. Tachezy, M. Duskova, and V. Vonka.** 2009. DNA vaccination against bcr-abl-positive cells in mice. *Int.J.Oncol.* 35:941-951.

22. **Lynch, D. H., A. Andreasen, E. Maraskovsky, J. Whitmore, R. E. Miller, and J. C. Schuh.** 1997. Flt3 ligand induces tumor regression and antitumor immune responses in vivo. *Nat.Med.* 3:625-631.
23. **Mackova, J., L. Kutinova, P. Hainz, J. Krystofova, V. Sroller, P. Otahal, P. Gabriel, and S. Nemeckova.** 2004. Adjuvant effect of dendritic cells transduced with recombinant vaccinia virus expressing HPV16-E7 is inhibited by co-expression of IL12. *Int.J.Oncol.* 24:1581-1588.
24. **Manning, J., M. Indrova, B. Lubyova, H. Pribylova, J. Bieblova, J. Hejnar, J. Simova, T. Jandlova, J. Bubenik, and M. Reinis.** 2008. Induction of MHC class I molecule cell surface expression and epigenetic activation of antigen-processing machinery components in a murine model for human papilloma virus 16-associated tumours. *Immunology* 123:218-227.
25. **Marie, J. C., D. Liggitt, and A. Y. Rudensky.** 2006. Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor-beta receptor. *Immunity.* 25:441-454.
26. **Martini, M., M. G. Testi, M. Pasetto, M. C. Picchio, G. Innamorati, M. Mazzocco, S. Ugel, S. Cingarlini, V. Bronte, P. Zanovello, M. Krampera, F. Mosna, T. Cestari, A. P. Riviera, N. Brutti, O. Barbieri, L. Matera, G. Tridente, M. Colombatti, and S. Sartoris.** 2010. IFN-gamma-mediated upmodulation of MHC class I expression activates tumor-specific immune response in a mouse model of prostate cancer. *Vaccine* 28:3548-3557.
27. **Oka, Y., K. Udaka, A. Tsuboi, O. A. Elisseeva, H. Ogawa, K. Aozasa, T. Kishimoto, and H. Sugiyama.** 2000. Cancer immunotherapy targeting Wilms' tumor gene WT1 product. *J.Immunol.* 164:1873-1880.
28. **Parajuli, P., R. L. Mosley, V. Pisarev, J. Chavez, A. Ulrich, M. Varney, R. K. Singh, and J. E. Talmadge.** 2001. Flt3 ligand and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor preferentially expand and stimulate different dendritic and T-cell subsets. *Exp.Hematol.* 29:1185-1193.
29. **Petrackova, M., E. Sobotkova, M. Duskova, P. Jinoch, and V. Vonka.** 2009. Isolation and properties of gene-modified mouse bcr-abl-transformed cells expressing various immunostimulatory factors. *Neoplasma.* 56:194-201.
30. **Petrackova, M., L. Stanek, V. Mandys, P. Dundr, and V. Vonka.** 2012. Properties of bcr-abl-transformed mouse 12B1 cells secreting interleukin-2 and granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF): II. Adverse effects of GM-CSF. *Int.J.Oncol.* 40:1915-1922.
31. **Petrackova, M., R. Tachezy, and V. Vonka.** 2012. Properties of bcr-abl-transformed mouse 12B1 cells secreting interleukin-2 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: I. Derivation, genetic stability, oncogenicity and immunogenicity. *Int.J.Oncol.* 40:1668-1676.

32. **Pokorna, D., I. Polakova, M. Kindlova, M. Duskova, V. Ludvikova, P. Gabriel, L. Kutinova, M. Muller, and M. Smahel.** 2009. Vaccination with human papillomavirus type 16-derived peptides using a tattoo device. *Vaccine* 27:3519-3529.
33. **Prussin, C.** 1997. Cytokine flow cytometry: understanding cytokine biology at the single-cell level. *J.Clin.Immunol.* 17:195-204.
34. **Pulendran, B., J. L. Smith, M. Jenkins, M. Schoenborn, E. Maraskovsky, and C. R. Maliszewski.** 1998. Prevention of peripheral tolerance by a dendritic cell growth factor: flt3 ligand as an adjuvant. *J.Exp.Med.* 188:2075-2082.
35. **Reinis, M.** 2010. Immunotherapy of MHC class I-deficient tumors. *Future.Oncol.* 6:1577-1589.
36. **Reinis, M., I. Stepanek, J. Simova, J. Bieblova, H. Pribylova, M. Indrova, and J. Bubenik.** 2010. Induction of protective immunity against MHC class I-deficient, HPV16-associated tumours with peptide and dendritic cell-based vaccines. *Int.J.Oncol.* 36:545-551.
37. **Scheich, F., J. Duyster, C. Peschel, and H. Bernhard.** 2007. The immunogenicity of Bcr-Abl expressing dendritic cells is dependent on the Bcr-Abl kinase activity and dominated by Bcr-Abl regulated antigens. *Blood* 110:2556-2560.
38. **Suzuki, E., V. Kapoor, H. K. Cheung, L. E. Ling, P. A. DeLong, L. R. Kaiser, and S. M. Albelda.** 2004. Soluble type II transforming growth factor-beta receptor inhibits established murine malignant mesothelioma tumor growth by augmenting host antitumor immunity. *Clin.Cancer Res.* 10:5907-5918.
39. **Tscharke, D. C., W. P. Woo, I. G. Sakala, J. Sidney, A. Sette, D. J. Moss, J. R. Bennink, G. Karupiah, and J. W. Yewdell.** 2006. Poxvirus CD8+ T-cell determinants and cross-reactivity in BALB/c mice. *J.Virol.* 80:6318-6323.
40. **Yotnda, P., H. Firat, F. Garcia-Pons, Z. Garcia, G. Gourru, J. P. Vernant, F. A. Lemonnier, V. Leblond, and P. Langlade-Demoyen.** 1998. Cytotoxic T cell response against the chimeric p210 BCR-ABL protein in patients with chronic myelogenous leukemia. *J.Clin.Invest.* 101:2290-2296.
41. **Zeng, Y., M. W. Graner, S. Thompson, M. Marron, and E. Katsanis.** 2005. Induction of BCR-ABL-specific immunity following vaccination with chaperone-rich cell lysates derived from BCR-ABL+ tumor cells. *Blood.* 105:2016-2022.
42. **Zurkova, K., K. Babiarova, P. Hainz, J. Krystofova, L. Kutinova, P. Otahal, and S. Nemeckova.** 2009. The expression of the soluble isoform of hFlt3 ligand by recombinant vaccinia virus enhances immunogenicity of the vector. *Oncol.Rep.* 21:1335-1343.
43. **Zurkova, K., P. Chlanda, Z. Samkova, K. Babiarova, L. Kutinova, J. Krystofova, P. Hainz, and S. Nemeckova.** 2011. Expression of soluble TGF-beta receptor II by recombinant Vaccinia virus enhances E7 specific immunotherapy of HPV16 tumors. *Neoplasma.* 58:181-188.

CURRICULUM VITAE**RNDr. Katarína Babiarová**

- Adresa zaměstnavatele:** Ústav hematologie a krevní transfuze,
Oddělení experimentální virologie,
U nemocnice 1, 128 20 Praha 2
- Telefon:** +420 221 977 389
- e-mail:** katarina.babiarova@uhkt.cz
- Vzdělání**
- 10/2005 - dosud 1. lékařská fakulta UK, Praha
- postgraduální studium biomedicíny
(obor molekulární biologie, genetika a virologie)
- 21/11/ 2011 - státní doktorská zkouška
- 06/2006 - rigorózní zkouška na Katedře mikrobiologie a virologie na
Přírodovědecké fakultě Univerzity Komenského v Bratislavě
(RNDr.)
- 2005-2000 - Univerzita Komenského v Bratislavě, Přírodovědecká fakulta,
Katedra mikrobiologie a virologie
- obor biologie, specializace virologie
- magisterské studium ukončené státní magisterskou zkouškou
(20.5.2005)
- Odborná praxe**
- 01/2006 - dosud Ústav hematologie a krevní transfuze (ÚHKT)
- Oddělení experimentální virologie
- říjen – prosinec 2005 Ústav klin. biochem. a lab. diagnostiky 1. LF UK a VFN Praha
-laboratoř STD (diagnostika)
- 2002-2005 Virologický ústav SAV, Bratislava
-diplomová práce (téma – Příprava a charakterizácia
monoklonových protilátek specifických pre PB1-F2 vírusu
chřipky typu A)
- preddiplomová praxe (laboratoř zkoumající virus chřipky typu
A pod vedením RNDr.G.Russa, DrSc.)
- Kurzy**
- Kvalifikační kurz pro VŠ pracovníky k získání způsobilosti dle §17zák.Odst.1č.246/1992Sb.,
na ochranu zvířat proti týrání (27.4.2007) – garant Fakulta agrobiologie, potravinových a
přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita, PRAHA
- Počítačová genomika (Computational genomics) (18.2.2006) garant Přírodovědecká fakulta
UK, PRAHA
- Mikroskopická imunodetekce v biomedicině (teoretický kurz) (24.11.2009) - garant ÚMG
AV ČR, PRAHA

VLASTNÍ PUBLIKACE**Publikace, které jsou podkladem dizertace**

1. J Immunother. 2012 Jul;35(6):478-87 *Immunization with WT1-derived peptides by tattooing inhibits the growth of TRAMP-C2 prostate tumor in mice.* Babiarova K, Kutinova L, Zurkova K, Krystofova J, Brabcova E, Hainz P, Musil J, Nemeckova S (IF 3,267)
2. Int J Oncol. 2009; 35:1247-1256 *Bcr-Abl fusion sequences do not induce immune responses in mice when administered in mouse polyomavirus based virus-like particles.* Hruskova V, Moravkova A, Babiarova K, Ludvikova V, Frici J, Vonka V, Forstova J (IF 2,447)
3. Neoplasma. 2011; 58(3):181-188 *Expression of soluble TGF- β receptor II by recombinant Vaccinia virus enhances E7 specific immunotherapy of HPV16 tumors.* Zurkova K, Chlanda P, Samkova Z, Babiarova K, Kutinova L, Krystofova J, Hainz P, Nemeckova S (IF 1,44)
4. Oncol Rep. 2009 May; 21(5):1335-43 *The expression of the soluble isoform of hFlt3 ligand by recombinant vaccinia virus enhances immunogenicity of the vector.* Zurkova K, Babiarova K, Hainz P, Krystofova J, Kutinova L, Otahal P, Nemeckova S (IF 1,588)

Publikace bez vztahu k tématu dizertace

1. Viral Immunology 2012; 25(5):411-422 *Chemokine Binding Protein vCCI Attenuates Vaccinia Virus Without Affecting the Cellular Response Elicited by Immunization with a Recombinant Vaccinia Vector Carrying the HPV16 E7 Gene.* Gabriel P, Babiarova K, Zurkova K, Krystofova J, Hainz P, Kutinova L, Nemeckova S (IF 1,78)
2. Cas Lek Cesk. 2007;146(9):708-11 *Genotyping of CYP2D6 and CYP2C19.* [Article in Czech] Slanar O, Drazd'áková M, Babiarová K, Pechandová K, Buzková H, Perlík F, Zima T.

Účast na konferencích:• **postery:**

1. Third European Congress of virology, Norinberk, Německo (1.-5.9.2007) – poster *Effect of viral 3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase on immunogenicity of MVA virus.* K.Babiarová, K.Mocová, L.Kutinová, P.Hainz, J.Kryštofová, P.Gabriel, Š.Němečková
2. 24. Kongres Československé společnosti mikrobiologické, Liberec, ČR (2.-5.10.2007) - poster *Effect of viral 3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase on immunogenicity of MVA virus.* K.Babiarová, K.Mocová, L.Kutinová, P.Hainz, J.Kryštofová, P.Gabriel, Š.Němečková
3. 2nd International Conference on Cancer Vaccines/Adjuvants/Delivery for the Next Decade, 10.-12.10. 2007, Heidelberg, Německo - *The influence of co-expression of immunomodulatory factors on antitumor effect of immunization using recombinant vaccinia virus.* S.Nemeckova, K. Zurkova, P. Otahal, P. Chlanda, K. Babiarova, K. Mocova, J. Mackova, P. Hainz and L. Kutinova
4. 6th Annual meeting of Cancer Immunotherapy, Mainz, Německo (15.-16.5.2008) – *DNA vaccine against WT1 tumor antigen.* E. Ouřadníková, J. Macková, K. Babiarová, V. Lučanský, P. Hainz, M.šmahel, L. Kutinová, S. Němečková
5. 17th International Poxvirus and Iridovirus Conference, Grainau (Bavaria), Německo (7.-12.6.2008) – poster *Deletion of viral 3-(beta)- hydroxysteroid dehydrogenase enhances the immunogenicity of MVA virus.* K.Babiarová, K.Mocová, L.Kutinová, P.Hainz, P.Gabriel, J.Kryštofová, Š.Němečková
6. 17th International Poxvirus and Iridovirus Conference, Grainau (Bavaria), Německo (7.-12.6.2008) – *Co-expression of Flt3L enhances T cell response induced by immunization with recombinant vaccinia virus and increases antitumor effect against HPV16 induced tumors.* K.Žůrková, P. Otáhal, K.Babiarová, J.Kryštofová, J. Macková, P.Hainz, L. Kutinová, S. Němečková
7. Recent advances in cancer immunotherapy with an emphasis on cancer, Atheny, Grécko (9.-11.10.2008) - *Co-expression of Flt3L enhances T cell response induced by immunization with recombinant vaccinia virus and increases its antitumor effect against HPV16 induced tumors.* K.Zurkova, P.Otahal, K.Babiarova, J.Kryštofova, J.Mackova, P.Hainz, L.Kutinova, S.Nemeckova

8. Recent advances in cancer immunotherapy with an emphasis on cancer, Atheny, Grécko (9.-11.10.2008) - *DNA vaccine against WT1 tumor antigen*. E.Ouradnikova, J.Mackova, K.Babiarova, V.Lucansky, P.Hainz, M.Smahel, L.Kutinova, S.Nemeckova
9. 7th annual meeting: CIMT: cancer immunotherapy, Mainz, Německo (3.-5.6. 2009) - *Immunotherapy of HPV induced tumors with recombinant vaccinia viruses expressing soluble TGFbeta receptor II and HPV16-E7 protein in mice*. K.Žůrková, P.Chlanda, Z.Samková, K.Babiarová, P.Hainz, J. Kryštofová, L.Kutinová, Š.Němečková
10. 15th world congress on advances in oncology and 13th international symposium on molecular medicine, Loutraki, Grécko (7.-9.10.2009) - *DNA vaccines against bcr-abl-transformed cells*. V. Lučanský, E.Sobotková, R.Tachezy, M.Dušková, K.Babiarová, K.Mocová, J.Macková, P.Gabriel, J.Suttnar, L.Kutinová, M.Šmahel, Š.Němečková, V.Vonka
11. 8th annual meeting: CIMT: cancer immunotherapy, Mainz, Německo (26.-28.5. 2010) – *Development of different types of vaccine against WT1 tumor antigen*. K.Babiarová, L.Kutinová, E.Brabcová, J.Kryštofová, P.Hainz, Š. Němečková
12. 1st international conference on advances in cell and gene therapy and immunotherapy: from basic research to clinical application and 3rd workshop on immunotherapy, Mikulov, ČR (23.-25.9. 2011) - *Development of different types of vaccine against WT1 tumor antigen*. K.Babiarová, L.Kutinová, E.Brabcová, J.Kryštofová, P.Hainz, Š. Němečková
13. 9th annual meeting: CIMT: cancer immunotherapy, Mainz, Německo (25.-27.5. 2011) – *Development of experimental vaccines against WT1 tumor antigen*. K.Babiarová, L.Kutinová, E.Brabcová, J.Kryštofová, P.Hainz, Š. Němečková
14. 11th annual meeting: CIMT: cancer immunotherapy, Mainz, Německo (14.-16.5. 2013) – *Immunization with WT1-derived peptides by tattooing inhibits the growth of TRAMP-C2 prostate tumor in mice*. Š.Němečková, K.Babiarová, K.Žůrková, J.Kryštofová, P.Hainz, J.Musil, L.Kutinová
15. 11th annual meeting: CIMT: cancer immunotherapy, Mainz, Německo (14.-16.5. 2013) – *Determination of anti-HCMV T cell response of potential recipients and donors in cellular immunotherapy of leukemic patients after transplantation of hematopoietic stem cells*. K.Babiarová, J.Kryštofová, P.Hainz, K.Žůrková, M.Šťastná, Š. Němečková

- **prezentace:**

1. od 2006 dosud 4x prezentace na společné konferenci postgraduálních studentů projektu GAČR (jednou na téma "*Experiments with the recombinant vaccinia viruses carrying the critical bcr-abl epitope*", 3x na téma "*Effect of viral 3-beta hydroxysteroid dehydrogenase on immunogenicity of MVA virus*")
2. od roku 2011 2x prezentace na konferencích PHD studentů na UHKT na téma „*Vývoj experimentální vakcíny proti proteinu WT1*“