

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

**Úloha vrozené a získané imunity v imunoterapii
melanomu a pankreatického adenokarcinomu**

Diplomová práce

Bc. Pavla Nedbalová

Školitel: RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice 2017

Nedbalová, P., 2017: Úloha vrozené a získané imunity v imunoterapii melanomu a pankreatického adenokarcinomu. [The role of innate and adaptive immunity in melanoma and pancreatic adenocarcinoma immunotherapy. Mgr. Thesis, in Czech.] - 61 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

This study examines the role of innate and adaptive immunity in the immunotherapy based on the combination of the ligands stimulating phagocytosis anchored in the tumour cells membrane and the mixture of TLR agonists. This immunotherapy is primarily focused on the innate immunity activation and induces strong inflammatory infiltration, which neutrophils and NK cells are part of. Therefore, the next aim of this study was to evaluate the anti-tumour activity of neutrophils and NK cells. For examination malignant melanoma and pancreatic adenocarcinoma mouse tumour models were used.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 18. dubna 2017

.....
Bc. Pavla Nedbalová

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Janu Ženkovi, CSc. za vedení mé diplomové práce, cenné rady, podnětné diskuze a inspirující nadšení pro práci. Velké díky patří Mgr. Veronice Caisové, která mi byla učitelem a rádcem v rámci laboratorní práce. Děkuji také Bc. Ondřeji Uhrovi za pomoc při práci s průtokovým cytometrem. A nakonec, poděkování patří také mým rodičům a partnerovi, jež mi byli po dobu studia velkou psychickou oporou.

Obsah

1. Úvod	1
1.1 Nádorová onemocnění	1
1.1.1 Příčiny vzniku nádorových onemocnění.....	2
1.1.1.1 Onkogeny a tumor supresorové geny.....	2
1.1.1.2 Kancerogeny.....	2
1.1.2 Biologické vlastnosti nádorů.....	3
1.1.3 Nádorové linie B16-F10 a Panc02.....	3
1.2 Nádorová onemocnění a imunitní systém	4
1.2.1 Vrozená imunita a nádory.....	4
1.2.1.1 PRRs, PAMPs a DAMPs.....	4
1.2.1.2 Neutrofilly.....	7
1.2.1.3 Neutrofilly a nádory.....	8
1.2.1.4 NK buňky.....	9
1.2.1.5 NK buňky a nádory.....	10
1.2.2 Získaná imunita a nádory.....	10
1.2.2.1 Nádorové antigeny.....	11
1.2.2.2 Cytotoxické T lymfocyty a nádory.....	11
1.2.3 Mechanismy úniku nádorových buněk.....	12
1.3 Imunoterapie nádorových onemocnění	12
1.3.1 Imunoterapie založená na aktivaci složek vrozené imunity.....	13
1.3.2 Imunoterapie založená na aktivaci složek získané imunity.....	14
1.3.2.1 Terapeutické nádorové vakcíny.....	14
1.3.2.2 Imunoterapie cílená na imunitní checkpointy.....	14
2. Cíle práce	16
3. Materiál a metody	17
3.1 Chemikálie	17
3.2 Laboratorní myši	18
3.3 Buněčné linie	18
3.4 Příprava nádorových buněk pro <i>in vivo</i> a <i>in vitro</i> pokusy	19
3.5 Transplantace nádorových buněk	19
3.6 Příprava manan-BAM	19

3.7 Vyhodnocení léčby	19
3.8 Výpočet redukce nádorového růstu	20
3.9 Příprava neutrofilů pro <i>in vitro</i> pokusy	20
3.9.1 Izolace neutrofilů z kostní dřeně	20
3.9.2 Imunomagnetická separace neutrofilů	20
3.9.3 Aktivace neutrofilů	21
3.10 Příprava NK buněk pro <i>in vitro</i> pokusy	21
3.10.1 Izolace NK buněk ze sleziny	21
3.10.2 Imunomagnetická separace NK buněk	21
3.10.3 Aktivace NK buněk	22
3.11 Stanovení čistoty neutrofilů a NK buněk na průtokovém cytometru	22
3.12 Statistické vyhodnocení výsledků	22
3.13 Pokusy	23
3.13.1 Vakcinace buňkami B16-F10 opsonizovanými mananem v kombinaci s TLR agonisty ..	23
3.13.2 Aplikace imunoterapie založené na kombinaci manan-BAM a směsi TLR agonistů při terapii na melanomu B16-F10 u CD4 knockout myši	23
3.13.3 Aplikace imunoterapie založené na kombinaci manan-BAM a směsi TLR agonistů při terapii na melanomu B16-F10 u CD8 knockout myši	24
3.13.4 Vliv intratumorální aplikace anti-PD-1 nebo anti-CD40 MAbs samotných nebo v kombinaci s kotveným mananem a směsí TLR agonistů na růst melanomů	25
3.13.5 In vitro analýza cytotoxického působení NK buněk na nádorové buňky B16-F10 ..	25
3.13.6 In vitro analýza cytotoxického působení neutrofilů na nádorové buňky Panc02	26
3.13.7 In vitro analýza cytotoxického působení NK buněk na nádorové buňky Panc02	27
4. Výsledky	28
4.1 Vliv vakcinace buňkami B16-F10 opsonizovanými mananem v kombinaci s TLR agonisty na růst nádorů	28
4.2 Aplikace imunoterapie založené na kombinaci manan-BAM a směsi TLR agonistů při terapii na melanomu B16-F10 u CD4 knockout myši	29
4.3 Aplikace imunoterapie založené na kombinaci manan-BAM a směsi TLR agonistů při terapii na melanomu B16-F10 u CD8 knockout myši	31
4.4 Vliv intratumorální aplikace anti-PD-1 nebo anti-CD40 MAbs samotných nebo v kombinaci s kotveným mananem a směsí TLR agonistů na růst melanomů	33
4.5 In vitro cytotoxické působení NK buněk na nádorové buňky B16-F10 značené manan-BAM	36

4.6 In vitro cytotoxické působení neutrofilů na nádorové buňky Panc02 značené manan-BAM.....	37
4.7 In vitro cytotoxické působení NK buněk na nádorové buňky Panc02 značené manan-BAM.....	38
5. Diskuze.....	39
6. Závěr.....	46
7. Seznam zkratek	47
8. Seznam literatury.....	50

1. Úvod

Intratumorální aplikace TLR (*toll-like receptor*) agonistů v kombinaci s PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) motivy stimulujícími fagocytózu (dále jen "terapie") vede díky synergickému působení obou složek k mohutné zánětlivé infiltraci nádoru, kde největší podíl zahrnují neutrofilové. Tato skutečnost vedla k bližšímu zkoumání efektorových mechanismů, které neutrofilové uplatňují vůči námi doposud používaným nádorovým buňkám myšního melanomu B16-F10 a vyhodnocení jejich cytotoxického působení na tyto nádorové buňky v *in vitro* podmínkách (Janotová a kol., 2014; Caisová a kol., 2016; Waldmannová a kol., 2016).

Pro dostatečné ověření účinnosti naší terapie, jsme se rozhodli do výzkumu zapojit další nádorovou linii, a to buňky myšního pankreatického adenokarcinomu Panc02 (kapitola 1.1.3). Cílem této magisterské práce tedy bylo ověřit také cytotoxické působení neutrofilů vůči nádorovým buňkám Panc02 značeným manan-BAM.

Buněčnou populací, u které byl zaznamenán nárůst v nádorovém mikroprostředí po aplikaci terapie, byly také NK (*natural killer*) buňky. Dalším úkolem tedy bylo ověřit v *in vitro* podmínkách cytotoxické působení NK buněk na nádorové buňky B16-F10 a Panc02 (Waldmannová a kol., 2016).

Vzhledem k úzkému propojení vrozené i získané imunity jsme se rozhodli také směřovat náš zájem na úlohu získané imunity v průběhu terapie. Významným podnětem k tomu byla odolnost již vyléčených myší k následným retransplantacím (Caisová a kol., 2016). Míra působení získané imunity byla sledována prostřednictvím *in vivo* experimentů s použitím *wild-type* i *knockout* myší. Bylo vyzkoušeno také možné podpoření reakce získané imunity zapojením MAbs (*monoclonal antibodies*) cíleným na imunitní checkpointy do naší terapie.

1.1 Nádorová onemocnění

Nádorová onemocnění jsou velmi heterogenní skupinou chorob, které spojují charakteristické vlastnosti jako nekontrolovaná buněčná proliferace, s ní spojený neomezený replikační potenciál, rezistence vůči programované buněčné smrti (apoptóze) a další. Tyto vlastnosti jsou indukovány změnami v oblastech buněčného genomu, které jsou klíčové pro

kontrolu buněčného cyklu, proliferace a diferenciaci a které vedou k nádorové transformaci původně zdravé buňky.

1.1.1 Příčiny vzniku nádorových onemocnění

1.1.1.1 Onkogeny a tumor supresorové geny

Vzniku nádorové buňky předchází sled mutací, které vyvolávají změny v tzv. onkogenech (proto-onkogenech) a tumor supresorových genech. Produkty těchto genů fungují jako regulátory buněčného cyklu, diferenciaci či apoptózy. Jedná se o transkripční faktory, růstové faktory a jejich receptory, proteiny účastníci se buněčné signalizace a regulátory apoptózy (Croce, 2008). Receptorová tyrozinkináza Epha2 (*ephrin type-A receptor 2*) je onkogen ve vysoké míře exprimovaný u maligního melanomu. Exprese tohoto onkogenu je spojená s vysokou tumorigenicitou a invazivitou nádoru (Hendrix a kol., 2003). Delece nebo mutace tumor supresorového genu p16 inhibitoru je spojována s až 95% případů pankreatického adenokarcinomu (Caldas a kol., 1994; Schutte a kol., 1997).

1.1.1.2 Kancerogeny

Proces kancerogeneze, přeměna zdravé buňky na buňku nádorovou, je indukován genotoxickým nebo epigenetickým působením kancerogenů. Rozlišujeme kancerogeny fyzikální, chemické a biologické.

Typickým fyzikálním kancerogenem je UV záření. Je prokázáno, že dlouhodobá expozice slunečnímu záření zvyšuje riziko vzniku maligního melanomu (Chang a kol., 2009). Z chemických kancerogenů můžeme uvést např. azbest (Goodman a kol., 1999) a aflatoxiny (Peers a kol., 1976). Chronický zánět, např. Crohnova choroba a ulcerózní kolitida, které mohou vyústit v karcinom tlustého střeva (Bernstein a kol., 2001), řadíme mezi biologické kancerogeny. Do skupiny biologických kancerogenů patří také tzv. onkogenní viry, např. HPV (*human papilloma virus*) způsobující cervikální karcinom (Clifford a kol., 2003), některé bakterie (Cavaleiro-Pinto a kol., 2011) a paraziti (Choi a kol., 2006).

1.1.2 Biologické vlastnosti nádorů

Podle biologických vlastností nádory dělíme na benigní (nezhoubné) a maligní (zhoubné). Nádory benigní bývají většinou menší hrozbou. Jejich tvar je pravidelný a růst expanzivní, okolní tkáň tedy vytlačují a neprorůstají jí. Tlak na tkáň ovšem může být bolestivý a vést ke krvácení. Významná z hlediska komplikací je lokalizace benigního nádoru, v rámci centrální nervové soustavy jsou i benigní nádory velkým problémem (Ryder a kol., 1986). Maligní nádory jsou problémem bez ohledu na místo jejich výskytu, jejich tvar bývá nepravidelný a růst invazivní, okolní tkáň tedy prorůstají. Navíc tyto nádory metastazují, nádorové buňky se šíří krevním a lymfatickým řečištěm do jiných částí těla a vytváří tak nová nádorová ložiska.

Dále rozlišujeme nádory podle původu jejich vzniku (epiteliální, stromální, hematopoetické, germinální ad.) a orgánové lokalizace (Siegel a kol., 2015)

1.1.3 Nádorové linie B16-F10 a Panc02

Pro studium imunoterapie nádorových onemocnění využíváme myší nádorové linie B16-F10 a Panc02, kde B16-F10 je linie myšího melanomu a Panc02 linie myšího pankreatického adenokarcinomu.

Nádorová linie B16-F10 byla vyselektována z linie B16-F0 I. J. Fiedlerem. Jeho metoda selekce je založena na myšlence, že nádorové buňky vyselektované z metastáz budou odolnější, s vyšší tendencí vytvářet sekundární nádorová ložiska (Fiedler, 1973). Právě agresivní růst a schopnost masivně metastazovat do plic (Nakamura a kol., 2002) jsou důvody využití buněčné linie B16-F10 pro ověření dostatečné účinnosti námi vyvíjené terapie.

Nádorová linie Panc02 byla indukována u myšího kmene C57BL/6 implantací bavlněného vlákna napuštěného metylcholantrenem do slinivky (Corbett a kol., 1984). Pro tento nádorový model je opět charakteristický agresivní a invazivní růst s tvorbou metastáz na plicích a méně také v jiných orgánech, např. játrech (Corbett a kol., 1984; Partecke a kol., 2011).

1.2 Nádorová onemocnění a imunitní systém

Imunitní systém zajišťuje integritu organismu svou schopností rozpoznávat a odstraňovat cizorodá agens nebo vlastní, ale pozměněné a tedy potenciálně škodlivé struktury. Rozlišujeme dvě části imunitního systému, imunitu vrozenou (nespecifickou) a získanou (specifickou), které zahrnují různé buněčné a látkové složky. Obě části imunitního systému jsou úzce propojené a v obraně organismu spolupracují.

Dnes již experimentálně i klinicky potvrzená teorie imunologického dohledu (*immunosurveillance*) říká, že imunitní systém organismu je schopen rozpoznat vznikající nádorové buňky, a tyto buňky následně eliminovat. Důsledkem reakce imunitního systému na vznikající nádorové ložisko je ovšem selekce nádorových buněk s nižší imunogenicitou a schopností obranným mechanismům imunitního systému unikat (*immunoediting*). Celý proces interakce imunitního systému a nádoru lze rozdělit do tří fází, tzv. "tří E", podle anglických výrazů, které tyto fáze označují: *elimination* (eliminace), *equilibrium* (rovnováha) a *escape* (únik) (Kim a kol., 2007).

V následujících kapitolách si přiblížíme rozpoznávací a obranné mechanismy imunitního systému a jejich podíl v reakci na vznikající nádor a také mechanismy, díky kterým nádorové buňky imunitnímu systému unikají.

1.2.1 Vrozená imunita a nádory

Vrozená imunita, díky pohotové aktivaci svých buněčných a látkových složek, zajišťuje první obrannou linii organismu. Prvotní obranou proti vnějším patogenům jsou anatomické a fyziologické bariéry (kůže, mukóza, lysozym). Významnou část buněčné složky vrozené imunity tvoří myeloidní makrofágy a neutrofilny fungující jako profesionální fagocyty. Makrofágy spolu s DCs (*dendritic cells*) fungují i jako antigen prezentující buňky. Důležitou součástí jsou také lymfoidní NK buňky. Mezi látkovou složku vrozené imunity řadíme např. komplement a antimikrobiální peptidy (Beutler, 2004).

1.2.1.1 PRRs, PAMPs a DAMPs

Buňky vrozené imunity exprimují na svém povrchu PRRs (*pattern recognition receptors*), které jim umožňují rozpoznávat tzv. PAMPs a DAMPs (*damage-associated molecular patterns*), což vede k jejich aktivaci a iniciaci imunitní odpovědi na daný podnět.

PAMPs jsou vysoce konzervované mikrobiální komponenty, naopak DAMPs jsou motivy spojené s vlastními poškozenými či nádorovými buňkami (Akira a kol., 2006; Rubartelli a Lotze, 2007).

PRRs můžeme rozdělit podle jejich funkce na receptory signální a fagocytární nebo podle jejich lokalizace na membránové, cytoplazmatické a sekretované.

Dále je pro příklad uvedeno několik PRRs s jejich stručnou charakteristikou a také PAMPs, jež jsou využívány v rámci naší nádorové terapie, rozpoznávané těmito receptory.

TLRs (Toll-like receptors)

TLRs řadíme mezi signální, membránové PRRs exprimované řadou buněk vrozené imunity myeloidní i lymfoidní řady. Doposud je známo 13 TLRs, přičemž TLR1 až TLR9 byly identifikovány současně u myši i lidí. Myši TLR10 není funkční a nakonec TLR11, 12 a 13 jsou exprimovány pouze u myši, lidem tyto TLRs chybí (Kawai a Akira, 2010).

TLRs jsou transmembránové glykoproteiny typu I. Extracelulární část tvořená LRR (*leucin rich repeats*) doménou s typickou strukturou "koňské podkovy" zprostředkovává rozpoznání PAMPs. Následují transmembránová doména a cytoplasmatická TIR (*toll/interleukin-1 receptor*) doména umožňující následný přenos signálu (Choe a kol., 2005; Jin a Lee, 2008).

LPS (*lipopolysaccharide*), komponenta buněčné stěny gram-negativních bakterií, je TLR4 agonista vyvolávající masivní imunitní reakci až septický šok. Právě riziko septického šoku bylo důvodem hledání jiného vhodného TLR agonisty pro naši terapii. Výsledkem je směs tří TLR agonistů, **R848** (*resiquimod*), **POLY (I:C)** (*polyinosinic-polycytidylic acid*) **LTA** (*lipoteichoic acid*, nahrazující *Listeria monocytogenes*), zajišťující mohutnou signalizaci a následnou zánětlivou infiltraci v nádoru (Caisová a kol., 2016). **R848**, syntetický derivát imidazoquinolinu, je u lidí TLR7 a TLR8 agonista (u myši pouze TLR7 agonista) s imunomodulačními účinky indukujícími antivirovou odpověď (Jurk a kol., 2002; Dovedi a kol., 2013). **POLY (I:C)** je syntetický analog dvouvláknové RNA, jehož vazba na TLR3 také simuluje virovou infekci (Zhou a kol., 2012). A nakonec **LTA**, komponenta buněčné stěny gram-pozitivních bakterií, rozpoznávaná TLR2 a simulující bakteriální infekci (Takeuchi a kol., 1999).

MBL (Mannan-binding lectin)

MBL je rozpustný PRR patřící do skupiny kolektinů, jež jsou součástí super-rodiny C-lektinů. K syntéze MBL dochází v játrech odkud je následně uvolňován do krve (Ezekowitz a kol., 1988; Wetering a kol., 2004).

MBL tvoří oligomerní strukturu, jejíž základní stavební jednotkou je trimer tvořený polypeptidovými řetězci. Jeden takovýto polypeptid se skládá ze čtyř domén: CR doména (*cystein rich domain*), kolagenní doména (*collagen domain*), α -helikální krček (*α -helical neck domain*) a CRD doména (*carbohydrate recognition domain*) (Ezekowitz a kol., 1988; Wetering a kol., 2004).

Prostřednictvím CRD domén MBL váže sacharidy na povrchu mikroorganismů. Vazba MBL na patogenní mikroorganismus může vést k aktivaci komplementu lektinovou cestou a mikroorganismus je tak eliminován komplementem (Dahl a kol., 2001), nebo dochází k opsonizaci iC3b jednotkou komplementu a mikroorganismus je následně fagocytován (Jack a kol., 2001).

Manan, PAMPs typický pro kvasinky a vyšší rostliny, je polysacharid tvořený manózovými jednotkami (Latgé, 2010; Petkowicz a kol., 2001). Právě terminální D-manóza mananu je rozpoznávána MBL a indukuje tak aktivaci komplementové kaskády. Manan kotvený do buněčné membrány pomocí BAM (*biocompatible anchor for cell membrane*) využíváme v naší terapii pro stimulaci fagocytózy (Janotová a kol., 2014; Caisová a kol., 2016).

MR (Mannose receptor)

MR řadíme mezi fagocytární, membránové PRRs. Tento receptor je exprimován makrofágy, DCs a některými endoteliálními buňkami (Martinez-Pomarez, 2012).

MR je transmembránový glykoprotein typu I se třemi typy extracelulárních domén: CR doménou, FNII doménou (*fibronectin type II domain*) a osmi po sobě jdoucími CTLD (*C-type lectin-like domains*). Právě CTLD umožňují rozpoznávání patogenních agens vazbou manózových, fukózových nebo N-acetylglukosaminových zbytků (Taylor a kol., 1990; Martinez-Pomarez, 2012).

MR je dalším PRR, který může rozpoznávat námi využívaný manan a vést tak k fagocytóze nádorových buněk.

CR3 (Complement receptor 3)

CR3 (také Mac-1; *macrophage 1 antigen*) je membránový, fagocytární PRR, který funguje také jako adhezní molekula vážící ICAM-1 (*intracellular adhesion molecule 1*) na endoteliích. Receptor je exprimovaný makrofágy, neutrofilů a NK buňkami (Ross a Větvička, 1993).

CR3 patří do skupiny β_2 -integrinů. Jedná se o heterodimer tvořený podjednotkou α (CD11b) a podjednotkou β_2 (CD18), kde A doména α podjednotky váže iC3b a LLD (*lectin-like domain*) doména β_2 podjednotky rozpoznává β -glukany (např. laminarin). Vazba β -glukanu na CR3 indukuje primovaný stav receptoru, který umožňuje fagocytózu cílové buňky opsonizované iC3b (Ross a Větvička, 1993; Větvička a kol., 1996).

1.2.1.2 Neutrofilů

Neutrofilů jsou leukocyty myeloidního původu, které řadíme (společně s eosinofily a bazofily) mezi granulocyty a polymorfonukleáry. Jak názvy napovídají, tyto buňky se vyznačují přítomností granul v cytoplasmě, která se uplatňují při realizaci jejich efektorových funkcí, a také charakteristicky segmentovaným jádrem. Procentuální zastoupení neutrofilů v krevním oběhu člověka se pohybuje od 50% do 70% všech cirkulujících leukocytů. V krevním oběhu neutrofilů přežívají přibližně 5 až 6 dnů, pokud nedojde k jejich aktivaci, kdy přežívají řádově hodiny (Kolaczkowska a Kubes, 2013).

Neutrofilů se řadí mezi profesionální fagocyty. Fagocytóza je proces pohlcení cizorodého materiálu, který vede k vytvoření fagosomu uvnitř neutrofilu, do kterého je následně uvolněn obsah tzv. azurofilních granul a ROS (*reactive oxygen species*) vznikající činností NADPH oxidázy v membráně fagosomu (DeLeo a kol., 1999). Vzniká tak fagolysosom, ve kterém je pohlcený materiál degradován. Azurofilní granula obsahují široké spektrum látek, z nichž můžeme uvést např. MPO (*myeloperoxidase*), enzym katalyzující vznik kyseliny chlorné z přítomného peroxidu vodíku a chloru, elastázu a antimikrobiální peptidy (Borregaard a Cowland, 1997).

Zvláštním případem fagocytózy je tzv. frustrovaná fagocytóza, kdy neutrofil není schopný cílovou strukturu vzhledem k její nadměrné velikosti pohltnout, a dochází tak k uvolnění obsahu neutrofilních granul a ROS exocytózou do okolního prostředí (Herant a kol., 2006; Kolaczkowska a Kubes, 2013). Je třeba si uvědomit, že tak dochází k masivnímu poškození okolní tkáně a frustrovaná fagocytóza je např. spojována s hemoragickou vaskulitidou (Hirahashi a kol., 2006).

Velmi zajímavým efektorovým mechanismem neutrofilů, je tvorba tzv. NETs (*neutrophil extracellular traps*). NETs vznikají procesem nazývaným netóza, což je v podstatě forma programované buněčné smrti, jejímž výsledkem jsou vláknité sítě jaderného chromatinu nesoucí globulární domény, jež obsahují látky jinak přítomné v neutrofilních granulech (MPO, elastázu, katepsin G, laktoferin ad.) (Brinkmann a kol., 2004; Kolaczowska a Kubes, 2013). NETs byly doposud pozorovány u infekcí různého původu (Brinkmann a kol., 2004; Urban a kol., 2006; Guimarães-Costa a kol., 2009). Jejich přítomnost byla také prokázána v nádorovém mikroprostředí (Berger-Achituv a kol., 2013; Park a kol., 2016).

1.2.1.3 Neutrofilie a nádory

Neutrofilie, které jsou součástí nádorového mikroprostředí, jsou označovány zkratkou TAN (*tumour associated neutrophils*). Tyto neutrofilie mají dvojí charakter, fenotyp N1 je protinádorový a prozánětlivý, naopak fenotyp N2 se vyznačuje pronádorovými a protizánětlivými vlastnostmi. O tom, který fenotyp bude v nádoru převládat, rozhoduje typ v nádoru produkovaných cytokinů a chemokinů, z nichž zásadní je pravděpodobně TGF- β (*transforming growth factor beta*) (Fridlender a kol., 2009; Fridlender a Albelda, 2012). TGF- β inhibuje degranulaci, a tedy cytotoxickou aktivitu neutrofilů (Shen a kol., 2007) a jeho blokace vede k akumulaci N1 neutrofilů v nádoru (Fridlender a kol., 2009).

N1 neutrofilie mají tedy potenciál přímo zabít nádorové buňky. Jedním z možných mechanismů lýzy nádorových buněk je produkce ROS (Lichtenstein, 1987; Dallegri a kol., 1991). Tecchio a kol. (2004) pozorovala apoptózu leukemických buněk indukovanou produkcí rozpustného TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) neutrofilie aktivovanými IFN α (*interferon alpha*). Byla sledována také účast neutrofilů v lýze nádorových buněk zprostředkované ADCC (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) (Hubert a kol., 2011). N1 neutrofilie se podílí na likvidaci nádoru i nepřímo, stimulací DCs (van Gisbergen a kol., 2005) nebo CD8⁺ T-lymfocytů (Scapini a kol., 2000; Fridlender a kol., 2009).

N2 neutrofilie mají naopak pronádorové účinky. Tyto neutrofilie stimulují nádorový růst a angiogenezi produkcí prokinetinu Bv8 (Shoajei a kol., 2008) a MMP-9 (*matrix metalloproteinase 9*; také kolagenáza IV nebo želatináza B), která dále indukuje produkci VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (Belotti a kol., 2003; Nozawa a kol., 2006; Fridlender a Albelda, 2012). Jako pronádorová se také ukázala tvorba NETs, které podporují

invazivitu a metastazování (Berger-Achituv a kol., 2013; Park a kol., 2016). Typ neutrofilů v nádorovém mikroprostředí se zdá být rozhodující i v rámci jejich interakce s dalšími leukocyty. Fridlender a kol. (2009) zaznamenal, že deplece N2 neutrofilů vede k mohutné aktivaci CD8⁺ T-lymfocytů v nádoru., což naznačuje, že N2 neutrofilů, na rozdíl od N1 neutrofilů, pravděpodobně potlačují aktivitu CD8⁺ T-lymfocytů.

1.2.1.4 NK buňky

NK buňky jsou popisovány jako velké granulární lymfocyty, uplatňující se vůči virem-infikovaným a nádorovým buňkám. V malé míře se vyskytují v řadě lymfoidních i jiných tkání, kde fungují jako "hlídky". Jejich procentuální zastoupení v krevním oběhu člověka se pohybuje od 2% do 18% všech cirkulujících lymfocytů. V krevním oběhu NK buňky přežívají přibližně 2 týdny (Vivier a kol., 2008).

NK buňky exprimují na svém povrchu řadu receptorů, které dělíme na inhibiční a aktivační. Inhibiční receptory jsou MHC I (*major histocompatibility complex*) specifické, a jejich stimulace tak zabraňuje ataku NK buněk vůči vlastním, zdravým buňkám. Příkladem inhibičních receptorů jsou KIRs (*killer cell immunoglobulin-like receptors*) exprimované lidskými NK buňkami (Anfossi a kol., 2006; Yu a kol., 2007). Mezi aktivační receptory patří např. NKG2D (*natural killer group 2D*), který rozpoznává molekuly strukturně podobné MHC I molekulám, exprimované infikovanými nebo nádorovými buňkami (Smyth a kol., 2005; Draghi a kol., 2007). Dalšími aktivačními receptory jsou TLRs (Hart a kol., 2005), CR3 (Ross a Větvička, 1993) a CD16 Fc receptor (Mandelboim a kol., 1999). O aktivaci nebo inhibici buňky rozhoduje poměr mezi množstvím stimulovaných inhibičních a aktivačních receptorů a dále spektrum přítomných prozánětlivých cytokinů (Vivier a kol., 2008).

Efektorovými mechanismy NK buněk jsou cytotoxicita a produkce zánětlivých cytokinů, především IFN γ (*interferon gamma*) (Mandelboim a kol., 1999; Hart a kol., 2005; Vivier a kol., 2008). Cytotoxicita NK buněk je realizována exocytózou granul a uvolněním perforinů (proteiny vytvářející póry v buněčné membráně) a granzymů (serinové proteázy s různou substrátovou specifitou) jejichž kooperace vede k apoptóze cílové buňky (Kägi a kol., 1994; Smyth a kol., 2005). NK buňky dále exprimují na svém povrchu FasL (*fas ligand*) a TRAIL, jejichž vazba s receptorem na cílové buňce také indukuje apoptózu (Smyth a kol., 2005; Glässner a kol., 2012).

1.2.1.5 NK buňky a nádory

Díky své schopnosti rozpoznávat nádorové buňky se NK buňky významně podílí na procesu imunologického dohledu (Kim a kol., 2007).

Rozpoznání nádorových buněk je zprostředkováno především NKG2D receptorem, jehož ligandy exprimované na povrchu nádorových buněk jsou např. MICA (*MHC class I polypeptide-related sequence A*) a MICB (*MHC class I polypeptide-related sequence B*) molekuly (Salih a kol., 2006). Aktivace NK buněk stimulací NKG2D receptoru pak vede k exocytóze granul (uvolnění perforinů a granzymů) a následně k indukci apoptózy nádorových buněk (Smyth a kol., 2005). NK buňky dále produkují IFN γ , který potlačuje proliferaci nádorových buněk (Gollob a kol., 2005), angiogenezi v nádorovém mikroprostředí (Ribatti a kol., 2006) a zvyšuje imunogenitu nádorových buněk, čímž usnadňuje jejich následné rozpoznání a eliminaci (Svane a kol., 1997). Dále se podílí na aktivaci dalších leukocytů, jako makrofágů a T lymfocytů přítomných v nádoru (Kowanko a Ferrante, 1987; Vivier a ko., 2008). U samotných NK buněk IFN γ stimuluje expresi FasL a TRIAL, které mohou také vyvolat apoptózu nádorových buněk (Mori a kol., 1997; Takeda a kol., 2001; Smyth a kol., 2005).

1.2.2 Získaná imunita a nádory

Reakce složek získané imunity je namířena proti konkrétnímu antigenu, vývoj této imunitní odpovědi je tudíž časově náročnější a reakce nastupuje později než reakce vrozené imunity. Výhodou získané imunity je ovšem specifita reakce a vytváření imunologické paměti, umožňující pohotovější nástup při opětovném setkání s daným antigenem.

Získanou imunitu rozdělujeme na humorální a buněčnou, kde humorální složku zastupují **B lymfocyty** produkující protilátky proti danému antigenu a buněčnou složku **cytotoxické T lymfocyty** (CTL; CD8⁺ lymfocyty) přímo zabíjející buňky exprimující na svém povrchu daný antigen ve spojení s MHC I. **T_H lymfocyty** (*T helper lymphocytes*; CD4⁺) jsou důležitou regulační součástí imunitního systému, podílející se na aktivaci B lymfocytů, CTL, ale i makrofágů (Zhu a Paul, 2008).

1.2.2.1 Nádorové antigeny

Nádorové buňky exprimují na svém povrchu antigeny, které rozdělujeme do dvou skupin: TSA (*tumour specific antigens*), exprimované pouze nádorovými buňkami a TAA (*tumour associated antigens*), exprimované nádorovými buňkami a také během embryonálního vývoje a některými zdravými buňkami v dospělosti (Neville a kol., 1975).

Objev nádorových antigenů v druhé polovině 20. století sliboval velký pokrok v nádorové diagnostice a terapii a řada antigenů je pro tyto účely dnes využívána. Hladiny sérového AFP (*alpha fetoprotein*) slouží jako diagnostický a prognostický faktor hepatocelulárního karcinomu u jedinců s dlouhodobým postižením jater (Daniele a kol., 2004). Hodnoty PSA (*prostate specific antigen*) slouží jako marker karcinomu prostaty (Godtman a kol., 2015).

1.2.2.2 Cytotoxické T lymfocyty a nádory

Tlak na okolní tkáň působený nádorovými buňkami a angiogeneze indukují lokální produkci zánětlivých cytokinů a infiltraci buňkami vrozené imunity, které následně atakují vznikající nádor. Makrofágy a DCs fagocytují nekrotické nádorové buňky a ve spádových lymfatických uzlinách prezentují nádorové antigeny ve spojení s MHC II naivním CD4⁺ T lymfocytům, které zrají a indukují vývoj nádorově specifických CTL, které po klonální expanzi infiltrují nádor (Marzo a kol., 2000; Kim a kol., 2007).

Efektorové mechanismy CTL odpovídají efektorovým mechanismům NK buněk, ovšem na rozdíl od NK buněk CTL rozpoznávají pomocí TCR (*T cell receptor*) antigeny restringované MHC I molekulami. Po rozpoznání cílové struktury dochází k exocytóze granul a uvolnění perforinů a granzymů vedoucí k apoptóze cílové buňky, ta může být indukována i produkcí FasL (Russel a Lay, 2002). CTL dále produkují prozánětlivý IFN γ , který stimuluje imunitní odpověď proti nádoru také zvyšováním imunogenity nádorových buněk (Dighe a kol., 1994; Shankaran a kol., 2001). Přítomnost velkého množství CTL v nádorovém mikroprostředí je spojována s pozitivní prognózou u řady malignit, jako jsou např. kolorektální karcinom (Naito a kol., 1998), karcinom vaječnicků (Sato a kol., 2005) a maligní melanom (Haanen a kol., 2006).

1.2.3 Mechanismy úniku nádorových buněk

Schopnost imunitního systému rozpoznávat nádor a reagovat na něj naráží na řadu překážek, jimiž se nádor brání imunitnímu útoku.

Nátlak ze strany imunity vede ke vzniku takové populace nádorových buněk, u nichž je snížena imunogenita a imunitní systém dále není schopen je rozpoznat. Nádorové buňky snižují expresi MHC I antigenů, čímž unikají CTL. Expresí pozměněných MHC Ib molekul se potom brání útoku NK buněk, které tyto buňky rozpoznávají jako zdravé a neutočí na ně (Seliger 2008; Haynes-Gilmore 2014).

K lokální i systémové imunosupresi přispívají nádorové buňky produkcí látek označovaných zkratkou TDSFs (*tumour derived soluble factors*). Do skupiny těchto látek patří např. VEGF, rozpustný FasL a MICA/B, IL-10 (*interleukin-10*), TGF- β ad. VEGF kromě stimulace angiogeneze také vyvolává infiltraci nádoru MDSC (*myeloid derived suppressor cells*) (Horikawa a kol., 2017), ty samy mají imunosupresivní charakter. Song a kol. (2001) pozoroval u pacientů s adenokarcinomem tlustého střeva zvýšený výskyt apoptózy lymfocytů infiltrujících tumor i lymfocytů z periferní krve korelující s produkcí rozpustného FasL nádorovými buňkami. Produkce rozpustných MICA/B molekul, ligandů NKG2D receptoru NK buněk, vede k inaktivaci cytotoxické aktivity NK buněk vůči nádoru (Dobrovina a kol., 2003; Salih a kol., 2006).

Produkcí TDSFs si nádor dále vytváří ve své struktuře populace imunosupresivních leukocytů. Kromě zmiňovaných MDSC, se jedná především o TAMs (*tumour associated macrophages*) a TANs, respektive jejich pronádorové fenotypy M2 a N2 (Sica a kol., 2008; Fridlender a Albelda, 2012; Lan a kol., 2013). Další významnou populací jsou regulační T lymfocyty (Treg; CD4⁺ CD25⁺) (Sasada a kol., 2003). Všechny tyto buňky se vyznačují produkcí IL-10, TGF- β a dalších protizánětlivých cytokinů, čímž umocňují imunosupresivní charakter nádoru.

1.3 Imunoterapie nádorových onemocnění

Existuje celá řada léčebných přístupů v rámci terapie nádorů. Základem bývá chirurgický zákrok dále kombinovaný s radioterapií, chemoterapií nebo imunoterapií. Všechny zmíněné přístupy si dávají za cíl vysokou účinnost a zaměření na nádor bez většího poškození zdravých tkání a vedlejších účinků.

Právě imunoterapie zažívá v současnosti mohutný rozvoj, jelikož slibuje cílené a účinné zničení nádoru s využitím imunitního systému samotného pacienta, což by mělo být k celému organismu šetrnější než zákroky z oblastí radioterapie či chemoterapie. Jak již bylo zmíněno, imunitní systém organismu sám, přirozeně reaguje na rostoucí nádor. Nádorové buňky ovšem disponují řadou mechanismů, které vedou k potlačení imunitní reakce a dokonce dochází ke vzniku populací leukocytů s pronádorovými vlastnostmi. Úkolem imunoterapie je tedy vyvolat dostatečně silnou reakci imunitního systému na nádor podpořením jeho aktivace a potlačením možných pronádorových účinků (Couzin-Frankel, 2013).

V následujících kapitolách budou představeny některé možnosti imunoterapie zaměřené na složky vrozené či získané imunity.

1.3.1 Imunoterapie založená na aktivaci složek vrozené imunity

Rozhodující pro aktivaci složek vrozené imunity jsou PRRs stimulované PAMPs nebo DAMPs (kapitola 1.2.1.1). Stimulace vrozené imunity přes PRRs je tedy jedním z možných terapeutických přístupů, který má počátky již na přelomu 19. a 20. století, kdy new yorský chirurg William Coley jako léčbu sarkomu svým pacientům podával mix usmrčených bakterií, *Streptococcus pyogenes* a *Serratia marcescens*, známý jako Coleyho toxin (Coley, 1893). Americký biolog Raymond Pearl v první polovině 20. století pozoroval během provádění pitev nižší výskyt rakoviny u pacientů s aktivními tuberkulózními lézemi a navrhnul využití mykobakteria v nádorové terapii (Pearl, 1928). Old a kol. (1959) pozoroval vyšší resistenci vůči transplantovaným nádorům u myší, kterým byl intravenózně podáván BCG (*bacillus calmette guerin*). Následovala řada dalších výzkumů zaměřených na využití BCG v nádorové terapii, jejichž výsledkem je více než 40 let trvající aplikace BCG pro léčbu rakoviny močového měchýře (Sylvester a kol., 2002; Shelley a kol., 2004). Dalšími PAMPs využívanými v nádorové terapii jsou převážně TLR agonisty, jako např. R848 v roli TLR7 a 8 agonisty, POLY (I:C) v roli TLR3 agonisty a CpG v roli TLR9 agonisty (Kanzler a kol., 2007; Brody a kol., 2010; Taura a kol., 2010; Meyer a kol., 2013).

Intratumorální aplikace TLR agonistů indukuje signalizaci vedoucí k mohutné zánětlivé infiltraci. Aby mohli makrofágy, neutrofilové a NK buňky infiltrující nádor nádorové buňky jednoznačně rozpoznat a uplatnit své efektorové mechanismy, jsou nádorové buňky označeny jiným PAMPs motivem (např. mananem), který je do jejich membrány ukotven pomocí BAM. Kombinace TLR agonistů ve spojení s ligandy stimulujícími fagocytózu se

doposud ukazuje jako velmi účinná (Janotová a kol., 2014; Caisová a kol., 2016; Waldamnnová a kol., 2016).

1.3.2 Imunoterapie založená na aktivaci složek získané imunity

1.3.2.1 Terapeutické nádorové vakcíny

Terapeutické nádorové vakcíny slouží, na rozdíl od vakcín profylaktických, k léčbě již existujícího nádoru. Předpokladem imunizace je posílení a nasměrování především CD8⁺ T-lymfocytů k nádorovému ataku. V této kapitole budou blíže představeny autologní a alogenní nádorové vakcíny.

Autologní nádorové vakcíny jsou založeny na vakcinaci vlastními nádorovými buňkami pacienta (Guo a kol., 2013). Za jejich výhodu lze považovat poskytnutí celého spektra antigenů daného nádoru imunitnímu systému, nevýhodou je potřeba dostatečného množství materiálu pro odběr a zpracování, čímž je terapie limitována jen na určité typy nádorů. Pacientovi je poté podána směs usmrcených nádorových buněk často ve spojení s adjuvanciem (např. BCG) (Galligioni a kol., 1996; Berger a kol., 2007). Tyto vakcíny byly testovány např. při léčbě maligního melanomu (Méndez a kol., 2007), kolorektálního karcinomu (de Weger a kol., 2012) a karcinomu prostaty (Berger a kol., 2007).

Alogenní nádorové vakcíny jsou založeny na vakcinaci několika zavedenými lidskými nádorovými liniemi. Výhodou proti vakcínám autologním je poskytnutí širšího spektra antigenů, standardizace zpracování a celkově jednodušší manipulace s buňkami a jejich dostupnost (Guo a kol., 2013). Velmi nadějných výsledků dosahovala alogenní vakcína určená k léčbě maligního melanomu Convaxin, složená ze tří ozářených melanomových linií a BCG jako adjuvancia (Morton a kol., 1992). Po úspěšném průběhu fáze II dvou nezávislých klinických hodnocení došlo ovšem k selhání ve fázi III, ve smyslu problematického vyhodnocení samotné účinnosti vakcíny, a její vývoj byl ukončen (Hsueh a kol., 2002; Morton a kol., 2002; Sondak a kol., 2006).

1.3.2.2 Imunoterapie cílená na imunitní checkpointy

MAbs jsou v imunoterapii nádorových onemocnění využívány již řadu let. V současnosti jsou ve středu zájmů MAbs cílené na imunitní checkpointy (kontrolní body), molekuly exprimované složkami imunitního systému, které za fyziologických okolností

stimulují či inhibují následnou imunitní reakci. Mezi inhibitory imunitních checkpointů patří např. anti-CTLA-4 a anti-PD-1, MAb fungující jako stimulant je např. anti-CD40 (Swart a kol., 2016).

CTLA-4 (CD152; *cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4*) je důležitým regulátorem T buněčné aktivace. Po vazbě tohoto receptoru s molekulami CD80 (B7.1) a CD86 (B7.2) exprimovanými antigen prezentujícími buňkami, CTLA-4 inhibuje aktivitu T lymfocytu. Inhibice CTLA-4 pomocí anti-CTLA-4 vede tedy k mohutné aktivaci T lymfocytů a ataku nádorového ložiska (Kvistborg a kol., 2014; Swart a kol., 2016). Zároveň je podání anti-CTLA-4 spojováno s deplecí Treg lymfocytů z nádoru, které jsou po vazbě anti-CTLA-4 rozpoznávány vazbou na Fc γ receptor řady leukocytů přítomných v nádoru (Peggs a kol., 2009; Simpson a kol., 2013; Swart a kol., 2016). Podávání plně humanizované MAbs anti-CTLA-4 ipilimumab zaznamenalo úspěchy při léčbě maligního melanomu (Schadendorf a kol., 2015).

PD-1 (CD279; *programmed cell death 1 receptor*) je dalším důležitým negativním regulátorem T buněčné aktivace. Vazba receptoru s jeho ligandy, PD-L1 (CD274) a PD-L2 (CD273), vede ke snížení aktivity T lymfocytů, ke zkrácení doby interakce T lymfocytů s antigen prezentující buňkou nebo cílovou buňkou a indukuje apoptózu. Inhibice PD-1 pomocí anti-PD-1 tedy opět vede k aktivaci T lymfocytů (Barber a kol., 2005). Exprese PD-1 byla prokázána také u Treg lymfocytů, kde ovšem zastává opačnou funkci. Vazba ligandu na PD-1 receptor Treg lymfocytů stimuluje jejich proliferaci a aktivitu (Francisco a kol., 2009), použití inhibiční anti-PD-1 tedy povede k potlačení aktivity Treg lymfocytů v nádoru. Ligandy PD-1 receptoru mohou být exprimovány samotnými nádorovými buňkami a vazbou na receptor CTL inhibovat jejich atak, vazba anti-PD-1 této inhibici brání (Noh a kol., 2015). V průběhu klinického hodnocení jsou v současnosti anti-PD-1 MAbs pembrolizumab (Robert a kol., 2014) a nivolumab (Topalian a kol., 2014).

CD40 molekula je exprimována DCs (a dalšími antigen prezentujícími buňkami), která po vazbě ligandu CD154 na povrchu T_H lymfocytů indukuje maturaci DCs a stimuluje jejich aktivitu. Anti-CD40 funguje jako agonista CD40 receptoru a stimulací DCs zároveň podporuje aktivaci složek získané imunity a následnou reakci. Kombinace anti-CD40 a anti-CTLA-4 byla vyzkoušena ve fázi I klinického hodnocení léčby maligního melanomu (Bajor a kol., 2015).

2. Cíle práce

- Studium významu získané imunity (T-lymfocytů) v redukci nádorového růstu.
- Studium možnosti použití anti-PD1 (*immune checkpoint inhibitor*) a anti-CD40 (*immune checkpoint stimulator*) v imunoterapii nádorů.
- Studium *in vitro* cytotoxického působení neutrofilů na nádorové buňky linie Panc02.
- Studium *in vitro* cytotoxického působení NK buněk na nádorové buňky linie B16-F10 a Panc02.

3. Materiál a metody

3.1 Chemikálie

Antibiotic-Antimycotic Solution (*Penicilin, Streptomycin, Amfotericin B*; Sigma-Aldrich)

Anti-Mouse CD45 APC; clone 30-F11 (eBioscience)

Anti-Mouse Ly-6G (Gr-1) Alexa Fluor 700; clone RB6-8C5 (eBioscience)

Anti-Mouse NK1.1 PE; clone PK136 (eBioscience)

BAM (*biocompatible anchor for cell membranes*; Mw 4000; NOF Europe)

DMEM (*Dulbecco's modified eagle medium*; VWR)

DMSO (*dimetyl-sulfoxid*; Sigma-Aldrich)

EDTA (*kyselina ethylendiamintetraoctová*; Sigma-Aldrich)

FCS (*fetal calf serum*; VWR)

GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*; Sigma-Aldrich)

In Vivo MAb anti-mouse PD-1 (CD279), clone RMP1-14 (Bio X Cell)

In Vivo MAb anti-mouse CD40, clone FGK4,5/ FGK45 (Bio X Cell)

Laminarin (Sigma-Aldrich)

L-Glutamin (Sigma-Aldrich)

Listeria monocytogenes (*heat killed*; InvivoGen)

LTA (*lipoteichoic acid, Bacillus subtilis*; Sigma-Aldrich)

MACS Neutrophil Isolation Kit, mouse (MACS Miltenyi Biotec Inc.)

MACS NK cell Isolation Kit II, mouse (MACS Miltenyi Biotec Inc.)

Manan (Sigma-Aldrich)

Merkaptoetanol (Sigma-Aldrich)

PBS (*phosphate-buffered saline*; VWR)

POLY (I:C) (*polyinosinic-polycytidylic acid, sodium salt*; Sigma-Aldrich)

RPMI 1640 (*Roswell park memorial institute medium*; VWR)

R848 (*resiquimod*; Tocris Bioscience)

TNF- α (*tumor necrosis factor alfa*; Sigma-Aldrich)

Trypanová modř (0,5% vodný roztok; Sigma-Aldrich)

Trypsin (Sigma-Aldrich)

3.2 Laboratorní myši

Pro experimenty byly použity *wild-type* SPF (*specific pathogen free*) samice kmene C57BL/6N (Charles River Laboratories) a *knockout* CD4^{-/-} a CD8^{-/-} SPF samice kmene C57BL/6N (Laboratorní chov PaÚ, Biologické centrum AV ČR v.v.i.), staré 8 týdnů, o váze 18-20 g.

C57BL/6N *wild-type* myši byly chovány ve sterilních podmínkách v IVC (*individually ventilated cages*) boxech, s podestýlkou z dřevěné drtě, s volným přístupem k vodě a krmným peletám, a to při konstantní teplotě 22°C a relativní vzdušné vlhkosti 65% s nastavenou 12/12 fotoperiodou (*prostory zvířince Katedry medicínské biologie*).

C57BL/6N *knockout* myši byly chovány v plastických klecích uzavřených kovovou mřížkou s podestýlkou z dřevěné drtě, s volným přístupem k vodě a krmným peletám, a to při konstantní teplotě 22°C a relativní vzdušné vlhkosti 65% s nastavenou 12/12 fotoperiodou (*prostory zvířince Parazitologického ústavu*).

3.3 Buněčné linie

Buňky myšího melanomu B16-F10 (ATCC) byly kultivovány v RPMI 1640 obohaceném o 10% FCS, penicilin (100 j/ml), streptomycin (100 µg/ml), amfotericin B (0,25 µg/ml), L-glutamin (2,2 mM) a merkaptoethanol (50 µM).

Buňky myšího pankreatického adenokarcinomu Panc02 (věnoval prof. Lars Ivo Partecke, Greifswald, Německo) byly kultivovány v DMEM obohaceném o 10% FCS, penicilin (100 j/ml), streptomycin (100 µg/ml), amfotericin B (0,25 µg/ml), L-glutamin (2,2 mM) a merkaptoethanol (50 µM).

Obě buněčné linie byly uchovávány v termostatu při teplotě 37°C, v atmosféře nasycené vodními parami s 5% CO₂.

Pozn.: Pro zjednodušení bude v některých následujících kapitolách použito slovo "médiu" namísto uvedení konkrétního typu média včetně přidávaných látek, což vždy odpovídalo použité buněčné linii.

3.4 Příprava nádorových buněk pro *in vivo* a *in vitro* pokusy

Poté, co buňky vytvořily jednovrstvou konfluentní kulturu, bylo odstraněno médium a buňky byly 3× promyty PBS pro následnou trypsinizaci. Buňky byly ponechány v trypsinizační směsi (0,25% trypsin, 0,02% EDTA v HBSS) po dobu 5 min v termostatu při 37°C. Trypsinizace byla ukončena přidavkem 20 ml média a buněčná suspenze byla převedena do zkumavky. Buňky byly spočteny v Bürkerově komůrce s použitím trypanové modři (pro rozlišení živých a mrtvých buněk) a jejich množství bylo upraveno na požadovanou koncentraci. Následně byly buňky centrifugovány (10 min, 160g, 4°C) a převedeny do média odpovídajícího potřebám experimentu.

3.5 Transplantace nádorových buněk

Myši byly nejprve oholeny na pravém boku pro usnadnění samotné transplantace i následného rozlišení nádorů. Každé myši bylo do pravého boku subkutánně transplantováno 4×10^5 buněk B16-F10 v 0,1 ml RPMI 1640 bez FCS. Transplantace byla provedena u myši starých 8 týdnů o hmotnosti 18-20 g.

3.6 Příprava manan-BAM

Prvním krokem přípravy manan-BAM byla redukční aminace mananu. Roztok mananu byl v prostředí octanu amonného, pH 7,5 a teplotě 50°C redukován kyanoborohydridem sodným po dobu pěti dnů. Výsledný roztok byl přes noc dialyzován proti PBS při 4°C s použitím dialyzační membrány MWCO 3500 (Serva, Heidelberg).

Vazba BAM přes NHS (*N-hydroxysuccinimide*) skupinu s aminoskupinou mananu proběhla při pH 7,3 a pokojové teplotě v průběhu jedné hodiny (Kato a kol., 2004). Roztok byl, za stejných podmínek jako po aminaci, dialyzován. Výsledný roztok 0,2 mM manan-BAM v PBS byl uchováván při teplotě -20°C do doby použití.

3.7 Vyhodnocení léčby

Léčba byla vyhodnocována každý druhý den měřením velikosti nádorů s použitím kaliperu. Objem nádorů byl vypočítán pomocí vzorce $V = \pi/6 AB^2$ (A = nejdelší naměřený rozměr v mm, B = nejkratší naměřený rozměr v mm) (Li a kol., 2009).

3.8 Výpočet redukce nádorového růstu

Redukce nádorového růstu, ve srovnání s kontrolou, byla vypočtena podle následujícího vzorce:

$$\frac{(\text{průměrný V nádorů v kontrolní skupině} - \text{průměrný V nádorů v léčené skupině}) \times 100}{\text{průměrný V nádorů v kontrolní skupině}}$$

Průměr [%] vypočtený z hodnot naměřených ve dnech 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 a 14 od počátku terapie (den 0) představuje průměrnou redukci nádorového růstu dané skupiny.

3.9 Příprava neutrofilů pro *in vitro* pokusy

3.9.1 Izolace neutrofilů z kostní dřeně

Neutrofilly byly izolovány z kostní dřeně SPF myších samic C57BL/6N podle Stassen a kol., 2006. Myši byly usmrceny cervikální dislokací. S použitím sterilních nástrojů byla myším stažena kůže z dolních končetin, ty byly odebrány a stehenní a holenní kosti byly pečlivě očištěny od svaloviny a uloženy do média bez FCS. Kostem byly odštěpeny kloubní hlavice a s pomocí stříkačky (5 ml) naplněné médiem bez FCS a jehly (26G) byla z kostí vytlačena kostní dřen do Petriho misky, kde byla pomocí mikropipety rozsuspendována a dále převedena přes BD filtr (70 μm) do zkumavky.

3.9.2 Imunomagnetická separace neutrofilů

Pro imunomagnetickou separaci neutrofilů byla použita sada protilátek Neutrophil Isolation Kit, mouse (MACS Myltenyi Biotec Inc.) a separace proběhla podle pokynů uvedených v protokolu, jež je součástí kitu.

Použitá metoda separace je založena na principu negativní selekce tzn., že protilátkami jsou označeny a v kolonce následně zachyceny všechny buňky z původní buněčné suspenze kromě neutrofilů, které jako jediné kolonkou projdou do připravené zkumavky.

Původní buněčná suspenze je převedena do pufru (PBS + 2% FCS + 2 mM EDTA), dále inkubována se směsí primárních biotinylovaných MAbs (proti antigenům, které nejsou

exprimovány neutrofilů) a poté se sekundárními anti-biotin MAbs konjugovanými s magnetickými perličkami. Po navázání protilátek je suspenze převedena na kolonku (LS column; MACS Myltenyi Biotec Inc.) s pre-separačním filtrem (30 μm ; MACS Myltenyi Biotec Inc.) umístěnou na magnetický separátor (MidiMACS separator; MACS Myltenyi Biotec Inc.). Výsledkem je suspenze neutrofilů v pufru.

Získané neutrofilů byly spočteny, převedeny do média odpovídajícího potřebám pokusu a jejich počet byl upraven na požadovanou koncentraci.

3.9.3 Aktivace neutrofilů

Naivní neutrofilů byly aktivovány směsí cytokinů GM-CSF (12 ng/ml média), TNF- α (2,5 ng/ml média) (Dewas a kol., 2003) a 2 μM nízkomolekulárním laminarinem (β -glukan, Mw 6007) (Větvička a kol., 1996) 20 min, při 37°C a 5% CO₂.

3.10 Příprava NK buněk pro *in vitro* pokusy

3.10.1 Izolace NK buněk ze sleziny

NK buňky byly izolovány ze slezin SPF myších samic C57BL/6N podle Meinhardt a kol., 2012. Myši byly usmrceny cervikální dislokací. S použitím sterilních nástrojů byla myším vyjmuta slezina a uložena do média bez FCS. Odebrané sleziny byly poté pomocí pístu ze stříkačky převedeny přes BD filtr (70 μm) do zkumavky. BD filtr byl pečlivě propláchnut 20 ml média bez FCS.

3.10.2 Imunomagnetická separace NK buněk

Pro imunomagnetickou separaci NK buněk byla použita sada protilátek NK Cell Isolation Kit II, mouse (MACS Myltenyi Biotec Inc.) a separace proběhla podle pokynů uvedených v protokolu, jež je součástí kitu.

Použitá metoda separace je založena na principu negativní selekce stejně jako metoda imunomagnetické separace neutrofilů, s použitím stejných pomůcek/zařízení (kapitola 3.9.2). Výsledkem je suspenze NK buněk v pufru.

Získané NK buňky byly spočteny, převedeny do média odpovídajícího potřebám pokusu a jejich počet byl upraven na požadovanou koncentraci.

3.10.3 Aktivace NK buněk

NK buňky byly aktivovány 2 μ M nízkomolekulárním laminarinem (β -glukan, Mw 6007) (Větvíčka a kol., 1996) 20 min, při 37°C a 5% CO₂.

3.11 Stanovení čistoty neutrofilů a NK buněk na průtokovém cytometru

Čistota leukocytů po separaci (kapitoly 3.9.2 a 3.10.2), byla stanovena na průtokovém cytometru BD FACSCanto II (BD Biosciences) a vyhodnocena v programu BD FACSDiva (verze 6.1.3; BD Bioscience).

Pro stanovení čistoty neutrofilů byly použity fluorescenčně značené MAbs: Anti-Mouse CD45 APC, clone 30-F11, 0,2 mg/ml (před přidáním k suspenzi ředěna 200 \times) a Anti-Mouse Ly-6G (Gr-1) Alexa Fluor 700, clone RB6-8C5, 0,2 mg/ml (před přidáním k suspenzi ředěna 100 \times). Průměrná čistota neutrofilů použitých v pokusech byla 95%.

Pro stanovení čistoty NK buněk byly použity fluorescenčně značené MAbs: Anti-Mouse CD45 APC, clone 30-F11, 0,2 mg/ml (před přidáním k suspenzi ředěna 200 \times) a Anti-Mouse NK1.1 PE, clone PK136, 0,2 mg/ml (před přidáním k suspenzi ředěna 100 \times). Průměrná čistota NK buněk použitých v pokusech byla 75%.

Pozn.: Práce na průtokovém cytometru proběhla s pomocí Bc. Ondřeje Uhra.

3.12 Statistické vyhodnocení výsledků

Pro statistické vyhodnocení dat byla použita jednocestná ANOVA s následným Tukeyho *post hoc* testem, pro analýzu přežití potom Kaplan-Mayerův test (STATISTICA 12, StatSoft, Inc.).

3.13 Pokusy

3.13.1 Vakcinace buňkami B16-F10 opsonizovanými mananem v kombinaci s TLR agonisty

Pro pokus bylo použito 24 myších samic kmene C57BL/6N. Myši byly 12. den po transplantaci nádorových buněk randomizovány do 4 skupin (A-D), každou skupinu tvořilo 6 myší, z nichž každá byla umístěna do vlastního boxu. Zároveň byl tento den označen jako "den 0", kdy proběhlo první měření objemů nádorů a podání terapeutických látek. Měření bylo dále prováděno každý druhý den. Terapie byla podávána ve 4 pulzech zahrnujících 12 dní: 0, 1, 2; 8, 9, 10; 16, 17, 18 a 24, 25, 26. Terapeutické látky byly podávány subkutánně (s.c.) do levého boku.

Přehled terapie (skupina, objem, podaná látka):

A - 50 μ l suspenze 8×10^6 mrazem zabitých B16-F10 v 1 ml PBS.

B - 50 μ l suspenze 8×10^6 mrazem zabitých B16-F10 + 0,2 mM manan-BAM + 0,5 mg R848 + 0,5 mg POLY (I:C) v 1 ml PBS.

C - 50 μ l suspenze 8×10^6 mrazem zabitých B16-F10 + 0,2 mM manan-BAM + 0,5 mg R848 + 0,5 mg POLY (I:C) + 1×10^{10} *L. monocytogenes* v 1 ml PBS.

D - 50 μ l PBS.

Na nádorové buňky použité ve skupinách B a C byl nejprve navázán manan-BAM (inkubace 30 min, pokojová teplota) a poté byly usmrceny. Vakcína tedy obsahovala fragmenty nádorových buněk s navázaným mananem.

Po posledním měření objemů nádorů v "den 30" byly myši usmrceny cervikální dislokací.

3.13.2 Aplikace imunoterapie založené na kombinaci manan-BAM a směsi TLR agonistů při terapii melanomu B16-F10 u CD4 knockout myší

Pro pokus byly použity 4 myší samice kmene C57BL/6N CD4^{-/-}. Myši byly 12. den po transplantaci nádorových buněk randomizovány do 2 skupin (A a B), každou skupinu tvořily 2 myši, z nichž každá byla umístěna do vlastního boxu. Zároveň byl tento den označen jako "den 0", kdy proběhlo první měření objemů nádorů a podání terapeutických

látek. Měření bylo dále prováděno každý druhý den. Terapie byla podávána ve 4 pulzech zahrnujících 12 dní: 0, 1, 2; 8, 9, 10; 16, 17, 18 a 24, 25, 26. Terapeutické látky byly podávány intratumorálně (i.t.).

Přehled terapie (skupina, objem, podaná látka):

A - 50 μ l roztoku 0,2 mM manan-BAM + 0,5 mg R848 + 0,5 mg POLY (I:C) + 0,5 mg LTA v 1 ml PBS.

B - 50 μ l roztoku PBS.

Po posledním měření objemů nádorů v "den 30" byla sledována doba přežití myši. V "den 100" bylo sledování ukončeno, zbylé myši byly usmrceny cervikální dislokací.

Data použitá pro skupiny C a D byla importována z jiného pokusu, který byl stejným způsobem proveden na *wild-type* C57BL/6N myších.

3.13.3 Aplikace imunoterapie založené na kombinaci manan-BAM a směsi TLR agonistů při terapii melanomu B16-F10 u CD8 knockout myši

Pro pokus byly použity 4 myši samice kmene C57BL/6N CD8^{-/-}. Myši byly 12. den po transplantaci nádorových buněk randomizovány do 2 skupin (A a B), každou skupinu tvořily 2 myši, z nichž každá byla umístěna do vlastního boxu. Zároveň byl tento den označen jako "den 0", kdy proběhlo první měření objemů nádorů a podání terapeutických látek. Měření bylo dále prováděno každý druhý den. Terapie byla podávána ve 4 pulzech zahrnujících 12 dní: 0, 1, 2; 8, 9, 10; 16, 17, 18 a 24, 25, 26. Terapeutické látky byly podávány intratumorálně (i.t.).

Přehled terapie (skupina, objem, podaná látka):

A - 50 μ l roztoku 0,2 mM manan-BAM + 0,5 mg R848 + 0,5 mg POLY (I:C) + 0,5 mg LTA v 1 ml PBS.

B - 50 μ l roztoku PBS.

Po posledním měření objemů nádorů v "den 30" byla sledována doba přežití myši. V "den 100" bylo sledování ukončeno, zbylé myši byly usmrceny cervikální dislokací.

Data použitá pro skupiny C a D byla importována z jiného pokusu, který byl stejným způsobem proveden na *wild-type* C57BL/6N myších.

3.13.4 Vliv intratumorální aplikace anti-PD-1 nebo anti-CD40 MAbs samotných nebo v kombinaci s kotveným mananem a směsí TLR agonistů na růst melanomů

Pro pokus bylo použito 36 myších samic kmene C57BL/6N. Myši byly 12. den po transplantaci nádorových buněk (melanom B16-F10) randomizovány do 6 skupin (A-F), každou skupinu tvořilo 6 myší, z nichž každá byla umístěna do vlastního boxu. Zároveň byl tento den označen jako "den 0", kdy proběhlo první měření objemů nádorů a podání terapeutických látek. Měření bylo dále prováděno každý druhý den. Terapie byla podávána ve 4 pulzech zahrnujících 12 dní: 0, 1, 2; 8, 9, 10; 16, 17, 18 a 24, 25, 26. Terapeutické látky byly podávány intratumorálně (i.t.).

Přehled terapie (skupina, objem, podaná látka):

- A** - 50 μ l roztoku 0,2 mM manan-BAM + 0,5 mg R848 + 0,5 mg POLY (I:C) + 0,5 mg LTA v 1 ml PBS.
- B** - 50 μ l roztoku 0,2 mM manan-BAM + 0,5 mg R848 + 0,5 mg POLY (I:C) + 0,5 mg LTA + 0,4 mg anti-PD-1 v 1 ml PBS.
- C** - 50 μ l roztoku 0,2 mM manan-BAM + 0,5 mg R848 + 0,5 mg POLY (I:C) + 0,5 mg LTA + 0,4 mg anti-CD40 v 1 ml PBS.
- D** - 50 μ l roztoku 0,4 mg anti-PD-1 v 1 ml PBS.
- E** - 50 μ l roztoku 0,4 mg anti-CD40 v 1 ml PBS.
- F** - 50 μ l roztoku PBS.

Po posledním měření objemů nádorů v "den 30" byla sledována doba přežití myší. V "den 100" bylo sledování ukončeno, zbylé myši byly usmrceny cervikální dislokací.

3.13.5 *In vitro* analýza cytotoxického působení NK buněk na nádorové buňky B16-F10

Experiment zahrnoval 4 skupiny buněčných suspenzí o různém složení (viz níže). Každou skupinu tvořily 4 jamky.

Schéma experimentu:

- A** - 100 000 B16-F10
- B** - 100 000 B16-F10 + 500 000 NK buněk
- C** - 100 000 B16-F10 + 0,02 mM manan-BAM

D - 100 000 B16-F10 + 0,02 mM manan-BAM + 500 000 NK buněk

Všechny buňky použité v tomto experimentu byly uchovávány v médiu RPMI 1640 s 10% nedeaktivovaným FCS, penicilinem (100 j/ml), streptomycinem (100 µg/ml), amfotericinem B (0,25 µg/ml), L-glutaminem (2,2 mM) a merkaptoethanolem (50 µM). Nedeaktivované FCS bylo použito z důvodu zachování složek komplementu, nutných pro reakci na kotvený manan a následnou opsonizaci nádorových buněk B16-F10.

Nádorové buňky byly připraveny podle postupu uvedeného v kapitole 3.4. Buňky ve skupinách C a D byly v množství 100 000 buněk/jamku inkubovány s manan-BAM o výsledné koncentraci 0,02 mM/jamku v 96-jamkovém panelu (jamky s kulatým dnem, průhledný) 30 min v 37°C a 5% CO₂. Nádorové buňky ve skupinách A a B byly inkubovány s přidavkem PBS, namísto manan-BAM, za stejných podmínek. Po 30 minutách inkubace byly jamky promyty za účelem odstranění nenavázaného ligandu.

NK buňky byly připraveny podle postupu uvedeného v kapitole 3.10. Po vazbě manan-BAM na nádorové buňky a následném promytí, byly do jamek skupin B a D přidány NK buňky v množství 500 000 buněk/jamku.

Takto připravené buněčné suspenze byly inkubovány 120 min v 37°C a 5% CO₂.

Nakonec byly buněčné suspenze pečlivě rozvolněny s pomocí mikropipety a v poměru 1:1 promíchány s trypanovou modří (rozlišení živých a mrtvých buněk). Experiment byl vyhodnocen s pomocí Bürkerovy komůrky, kde byl zjišťován konečný počet živých nádorových buněk (nádorové buňky a NK buňky byly rozlišeny na základě jejich velikosti).

3.13.6 *In vitro* analýza cytotoxického působení neutrofilů na nádorové buňky Panc02

Experiment zahrnoval 4 skupiny buněčných suspenzí o různém složení (*viz* níže). Každou skupinu tvořily 4 jamky.

Schéma experimentu:

A - 100 000 Panc02

B - 100 000 Panc02 + 500 000 neutrofilů

C - 100 000 Panc02 + 0,02 mM manan-BAM

D - 100 000 Panc02 + 0,02 mM manan-BAM + 500 000 neutrofilů

Všechny buňky použité v tomto experimentu byly uchovávány v médiu DMEM s 10% nedeaktivovaným FCS, penicilinem (100 U/ml), streptomycinem (100 µg/ml), amfotericinem B (0,25 µg/ml), L-glutaminem (2,2 mM) a merkaptoethanolem (50 µM). Nedeaktivované FCS bylo použito z důvodu zachování složek komplementu, nutných pro reakci na kotvený manan a následnou opsonizaci nádorových buněk Panc02.

Další postup experimentu a jeho vyhodnocení jsou totožné s postupem uvedeným v kapitole 3.13.5, přičemž nádorové buňky byly připraveny podle postupu uvedeného v kapitole 3.4 a neutrofilů byly připraveny podle postupu uvedeného v kapitole 3.9.

3.13.7 *In vitro* analýza cytotoxického působení NK buněk na nádorové buňky Panc02

Experiment zahrnoval 4 skupiny buněčných suspenzí o různém složení (*viz níže*). Každou skupinu tvořily 4 jamky.

Schéma experimentu:

A - 100 000 Panc02

B - 100 000 Panc02 + 500 000 NK buněk

C - 100 000 Panc02 + 0,02 mM manan-BAM

D - 100 000 Panc02 + 0,02 mM manan-BAM + 500 000 NK buněk

Všechny buňky použité v tomto experimentu byly uchovávány v médiu DMEM s 10% nedeaktivovaným FCS, penicilinem (100 U/ml), streptomycinem (100 µg/ml), amfotericinem B (0,25 µg/ml), L-glutaminem (2,2 mM) a merkaptoethanolem (50 µM).. Nedeaktivované FCS bylo použito z důvodu zachování složek komplementu, nutných pro reakci na kotvený manan a následnou opsonizaci nádorových buněk Panc02.

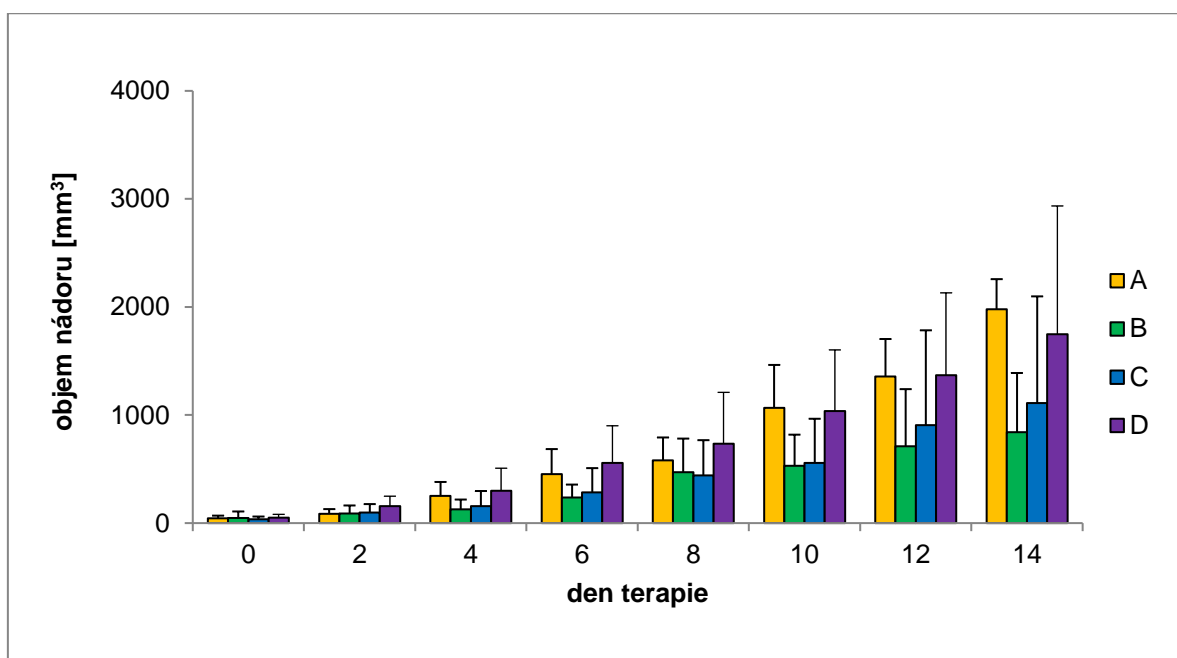
Další postup experimentu a jeho vyhodnocení jsou totožné s postupem uvedeným v kapitole 3.13.5, přičemž nádorové buňky byly připraveny podle postupu uvedeného v kapitole 3.4 a NK buňky byly připraveny podle postupu uvedeného v kapitole 3.10.

4. Výsledky

4.1 Vliv vakcinace buňkami B16-F10 opsonizovanými mananem v kombinaci s TLR agonisty na růst nádorů

Cílem pokusu bylo prostřednictvím terapeutické nádorové vakcíny, založené na kombinaci mrazem usmrcených, opsonizovaných nádorových buněk B16-F10 a směsi TLR agonistů, indukovat aktivaci získané imunity a zjistit tak její vliv na redukci nádorového růstu.

Vakcinace usmrcenými B16-F10 (skupina A) nevedla k redukci nádorového růstu a 14. den experimentu byl dokonce průměrný objem nádorů ve skupině A o 13% vyšší než v kontrole (skupina D). Vakcinace usmrcenými B16-F10 opsonizovanými mananem v kombinaci se směsí R848 a POLY (I:C) (skupina B) vyvolala průměrnou redukci nádorového růstu 44%, doplnění uvedené směsi o *L. monocytogenes* (skupina C) vedlo k průměrné redukci nádorového růstu o 40%, avšak ani u jedné ze zmíněných skupin nebyla redukce nádorové růstu vzhledem ke kontrole statisticky významná. Získaná imunita tedy na redukci nádorového růstu v průběhu terapie pravděpodobně zásadní vliv nemá (**Obr.1**).



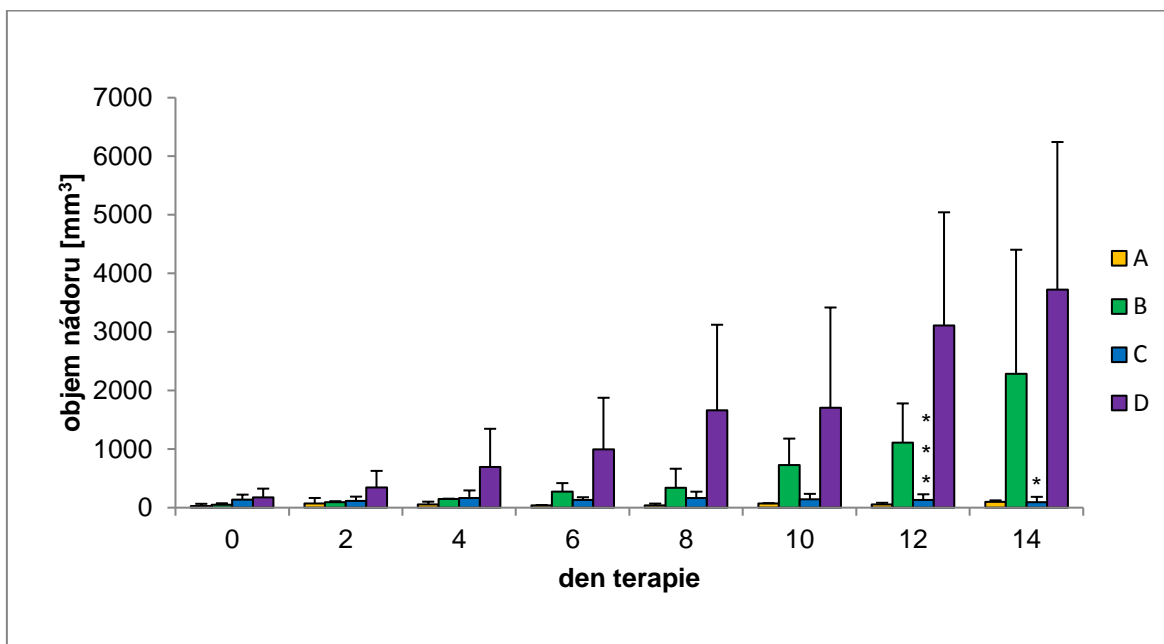
Obr.1: Vliv aplikace terapeutické nádorové vakcíny na redukci nádorového růstu.

Skupina **A** - 4×10^5 mrazem zabitých B16-F10, skupina **B** - 4×10^5 mrazem zabitých B16-F10 + manan-BAM + R848 + POLY (I:C), skupina **C** - 4×10^5 mrazem zabitých B16-F10 + manan-BAM + R848 + POLY (I:C) + *L. monocytogenes*, skupina **D** - PBS (kontrola).

4.2 Aplikace imunoterapie založené na kombinaci manan-BAM a směsi TLR agonistů při terapii melanomu B16-F10 u CD4 knockout myši

Cílem pokusu bylo zjistit význam T_H -lymfocytů v redukci nádorového růstu a délce přežití myši po aplikaci imunoterapie založené na kombinaci manan-BAM a směsi TLR agonistů s využitím $CD4^{-/-}$ myši.

Průměrná redukce nádorového růstu u léčených $CD4^{-/-}$ myši (skupina A) činila 73% a průměrná redukce nádorového růstu u léčených C57BL/6N myši (skupina C) činila 78%. Lze tedy usuzovat, že absence T_H -lymfocytů v průběhu imunoterapie melanomu B16-F10 neměla na redukci nádorového růstu zásadní efekt (**Obr.2**).



Obr.2: Vývoj imunoterapie melanomu B16-F10 u $CD4^{-/-}$ myši.

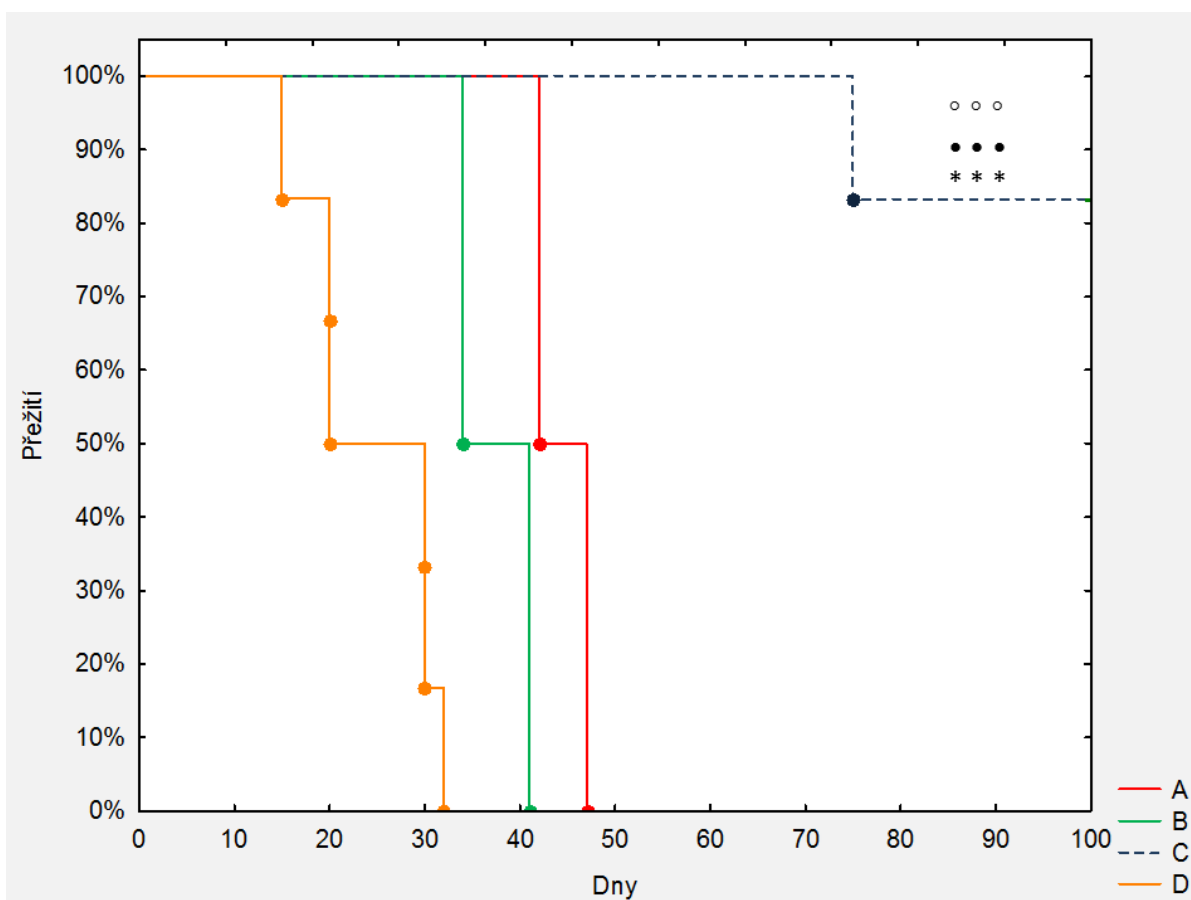
Skupina **A** - $CD4^{-/-}$; manan-BAM + R848 + POLY (I:C) + LTA, skupina **B** - $CD4^{-/-}$; PBS, skupina **C** - C57BL/6N; manan-BAM + R848 + POLY (I:C) + LTA, skupina **D** - C57BL/6N; PBS.

Hladiny statistické významnosti:

vzhledem ke skupině D - $p \leq 0,05$ *, $p \leq 0,01$ **, $p \leq 0,005$ ***

Po ukončení terapie byla sledována doba přežití myši do "dne 100" od počátku terapie. U léčených $CD4^{-/-}$ myši (skupina A) nebylo sledováno statisticky významně delší přežití ve srovnání s kontrolou (skupina B). Naopak u léčených C57BL/6N myši (skupina C) statisticky významně delší přežití ve srovnání s kontrolou (skupina D; i ostatními skupinami)

sledováno bylo. Absence T_H -lymfocytů se tedy projevila v následném přežívání myší po ukončení terapie (**Obr.3**).



Obr.3: Doba přežití léčených $CD4^{-/-}$ myší.

Skupina **A** - $CD4^{-/-}$; manan-BAM + R848 + POLY (I:C) + LTA, skupina **B** - $CD4^{-/-}$; PBS, skupina **C** - C57BL/6N; manan-BAM + R848 + POLY (I:C) + LTA, skupina **D** - C57BL/6N; PBS.

Hladiny statistické významnosti:

vzhledem ke skupině A - $p \leq 0,05$ *, $p \leq 0,01$ **, $p \leq 0,005$ ***

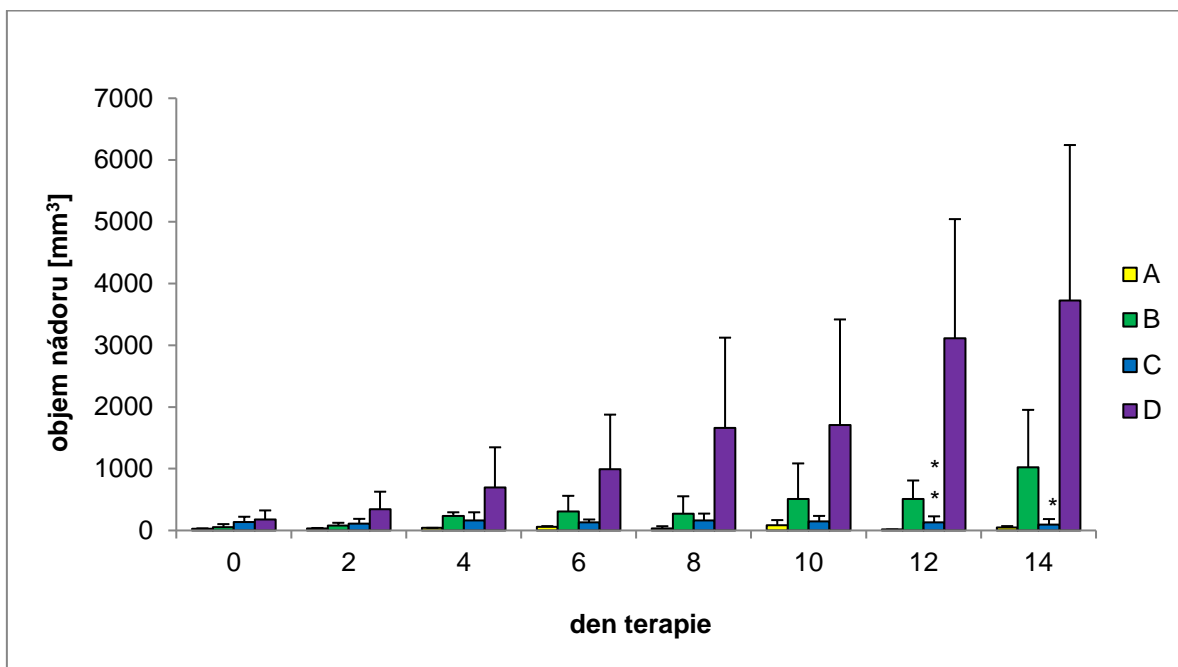
vzhledem ke skupině B- $p \leq 0,05$ •, $p \leq 0,01$ ••, $p \leq 0,005$ •••

vzhledem ke skupině D- $p \leq 0,05$ ◦, $p \leq 0,01$ ◦◦, $p \leq 0,005$ ◦◦◦

4.3 Aplikace imunoterapie založené na kombinaci manan-BAM a směsi TLR agonistů při terapii melanomu B16-F10 u CD8 knockout myší

Cílem pokusu bylo zjistit význam CTL v redukci nádorového růstu a délce přežití myší po aplikaci imunoterapie založené na kombinaci manan-BAM a směsi TLR agonistů s využitím CD8^{-/-} myší.

Průměrná redukce nádorového růstu u léčených CD8^{-/-} myší (skupina A) činila 79% a průměrná redukce nádorového růstu u léčených C57BL/6N myší (skupina C) činila 78%. Lze tedy usuzovat, že absence T_C-lymfocytů v průběhu imunoterapie melanomu B16-F10 neměla na redukci nádorového růstu zásadní efekt (**Obr.4**).



Obr.4: Vývoj imunoterapie melanomu B16-F10 u CD8^{-/-} myší.

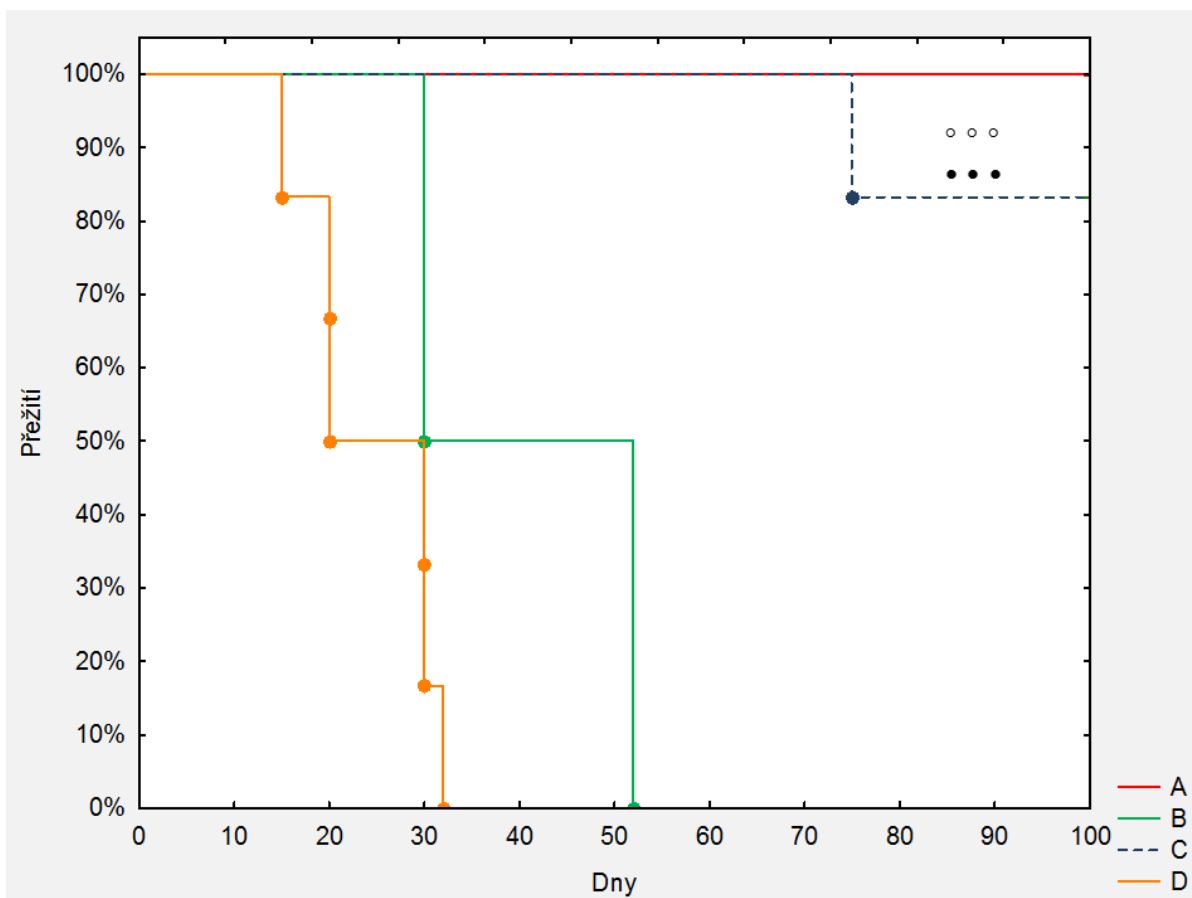
Skupina A - CD8^{-/-}; manan-BAM + R848 + POLY (I:C) + LTA, skupina B - CD8^{-/-}; PBS, skupina C - C57BL/6N; manan-BAM + R848 + POLY (I:C) + LTA, skupina D - C57BL/6N; PBS.

Hladiny statistické významnosti:

vzhledem ke skupině D - $p \leq 0,05$ *, $p \leq 0,01$ **, $p \leq 0,005$ ***

Po ukončení terapie byla sledována doba přežití myší do "dne 100" od počátku terapie. U léčených CD8^{-/-} myší (skupina A) nedošlo během doby sledování přežití k úhynu, což naznačuje, že absence T_C-lymfocytů nemá na přežívání myší po ukončení terapie zásadní efekt, nebylo ovšem dosaženo statistické významnosti. U léčených C57BL/6N myší

(skupina C) bylo sledováno statisticky významně delší přežití ve srovnání s kontrolou (i skupinou B) (**Obr.5**).



Obr.5: Doba přežití léčených CD8^{-/-} myši.

Skupina **A** - CD8^{-/-}; manan-BAM + R848 + POLY (I:C) + LTA, skupina **B** - CD8^{-/-}; PBS, skupina **C** - C57BL/6N; manan-BAM + R848 + POLY (I:C) + LTA, skupina **D** - C57BL/6N; PBS.

Hladiny statistické významnosti:

vzhledem ke skupině B- p ≤ 0,05 •, p ≤ 0,01 ••, p ≤ 0,005 •••

vzhledem ke skupině D- p ≤ 0,05 ◦, p ≤ 0,01 ◦◦, p ≤ 0,005 ◦◦◦

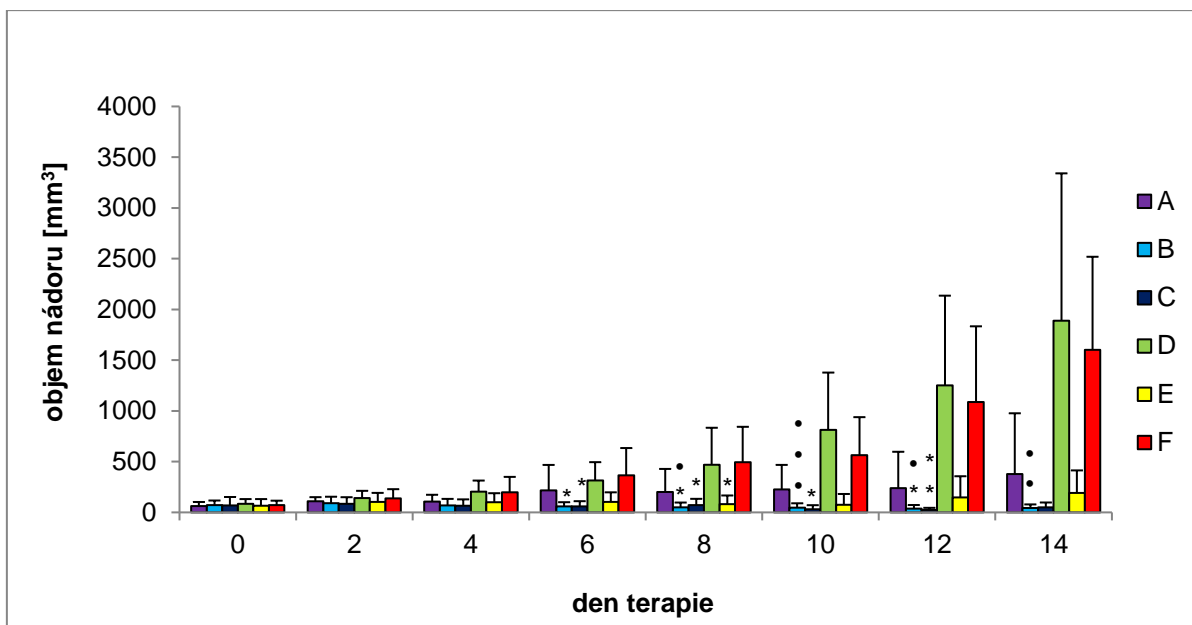
4.4 Vliv intratumorální aplikace anti-PD-1 nebo anti-CD40 MAbs samotných nebo v kombinaci s kotveným mananem a směsí TLR agonistů na růst melanomů

Cílem experimentu bylo zjistit vliv anti-PD-1 a anti-CD40 MAbs na redukcí nádorového růstu a dobu přežití myši po ukončení terapie a dále případný aditivní efekt těchto protilátek v kombinaci s kotveným mananem a směsí TLR agonistů.

Anti-PD-1 samotná (skupina D) nevyvolala redukcí nádorového růstu a 14. den experimentu byl průměrný objem nádorů ve skupině D o 12% vyšší než v kontrolní skupině (skupina F). **Kombinace anti-PD-1 s kotveným mananem a směsí TLR agonistů** (skupina B) vyvolala průměrnou redukcí nádorového růstu 85%, kde statistické významnosti bylo dosaženo 6., 8. a 12. den experimentu.

Anti-CD40 samotná (skupina E) vyvolala průměrnou redukcí nádorového růstu 69%, kde statistické významnosti bylo dosaženo 8. den experimentu. **Kombinace anti-CD40 s kotveným mananem a směsí TLR agonistů** (skupina C) vyvolala průměrnou redukcí nádorového růstu 85%, kde statistické významnosti bylo dosaženo 6., 8., 10., a 12. den experimentu. Anti-CD40 samotná vedla k významné redukcí nádorového růstu, která byla dále posílena kombinací protilátky s kotveným mananem a směsí TLR agonistů.

Výše zmíněné ilustruje následující graf (**Obr.6**).



Obr.6: Vliv intratumorální aplikace anti-PD-1 a anti-CD40 na redukci nádorového růstu.

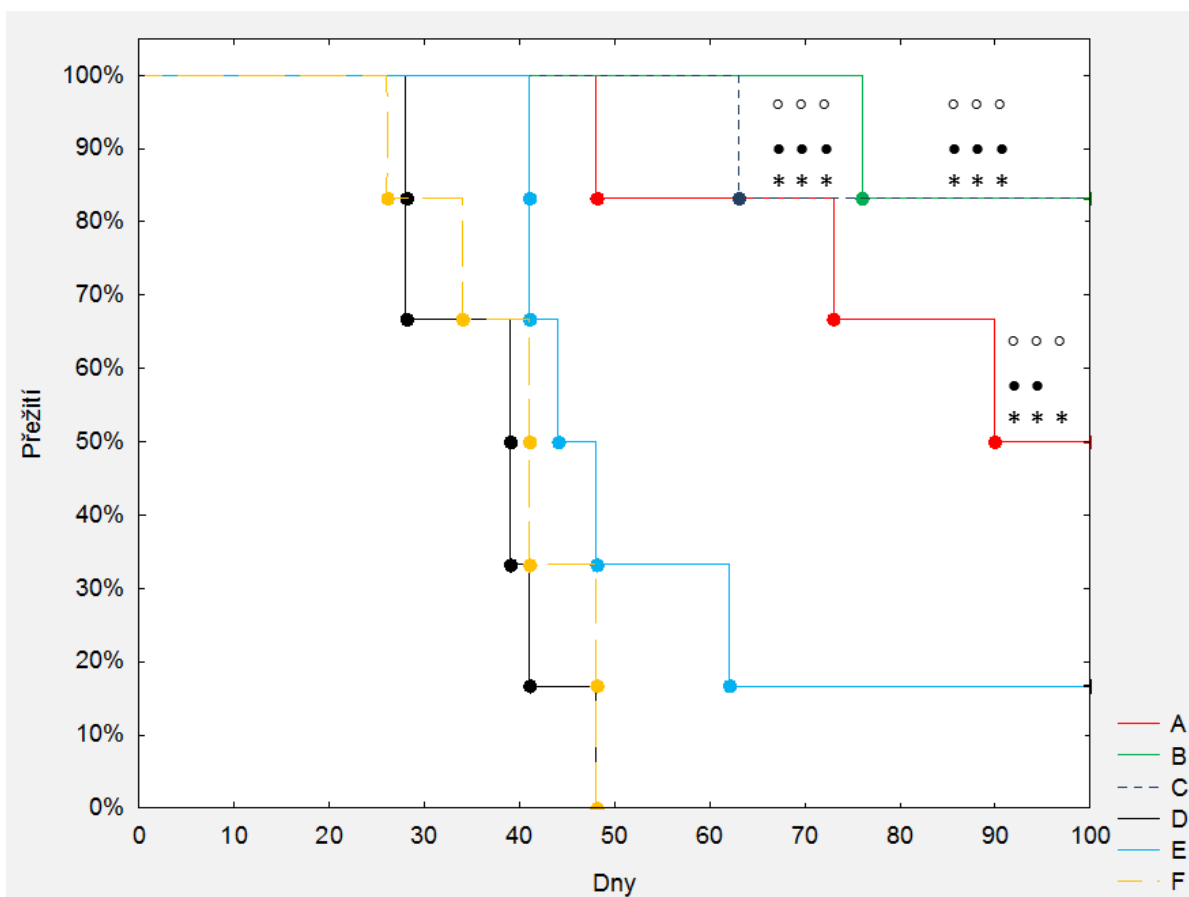
Skupina **A** - manan-BAM + R848 + POLY (I:C) + LTA, skupina **B** - manan-BAM + R848 + POLY (I:C) + LTA + anti-PD-1, skupina **C** - manan-BAM + R848 + POLY (I:C) + LTA + anti-CD40, skupina **D** - anti-PD-1, skupina **E** - anti-CD40, skupina **F** - PBS (kontrola).

Hladiny statistické významnosti:

vzhledem ke skupině F - $p \leq 0,05$ *, $p \leq 0,01$ **, $p \leq 0,005$ ***

vzhledem ke skupině D - $p \leq 0,05$ •, $p \leq 0,01$ ••, $p \leq 0,005$ •••

Po ukončení terapie byla sledována doba přežití myši do "dne 100" od počátku terapie. Kombinace anti-PD-1 (skupina B) i anti-CD40 (skupina C) s kotveným mananem a směsí TLR agonistů i tato terapie bez protilátek (skupina A) vedly ke statisticky významně delšímu přežití ve srovnání s kontrolou (skupina F) a ve srovnání s protilátkami samotnými (skupiny D a E). Terapie anti-CD40 samotnou vedla k vyléčení jedné z myši (**Obr.7**).



Obr.7: Vliv intratumorální aplikace anti-PD-1 a anti-CD40 na dobu přežití.

Skupina **A** - manan-BAM + R848 + POLY (I:C) + LTA, skupina **B** - manan-BAM + R848 + POLY (I:C) + LTA + anti-PD-1, skupina **C** - manan-BAM + R848 + POLY (I:C) + LTA + anti-CD40, skupina **D** - anti-PD-1, skupina **E** - anti-CD40, skupina **F** - PBS (kontrola).

Hladiny statistické významnosti:

vzhledem ke skupině A - $p \leq 0,05$ *, $p \leq 0,01$ **, $p \leq 0,005$ ***

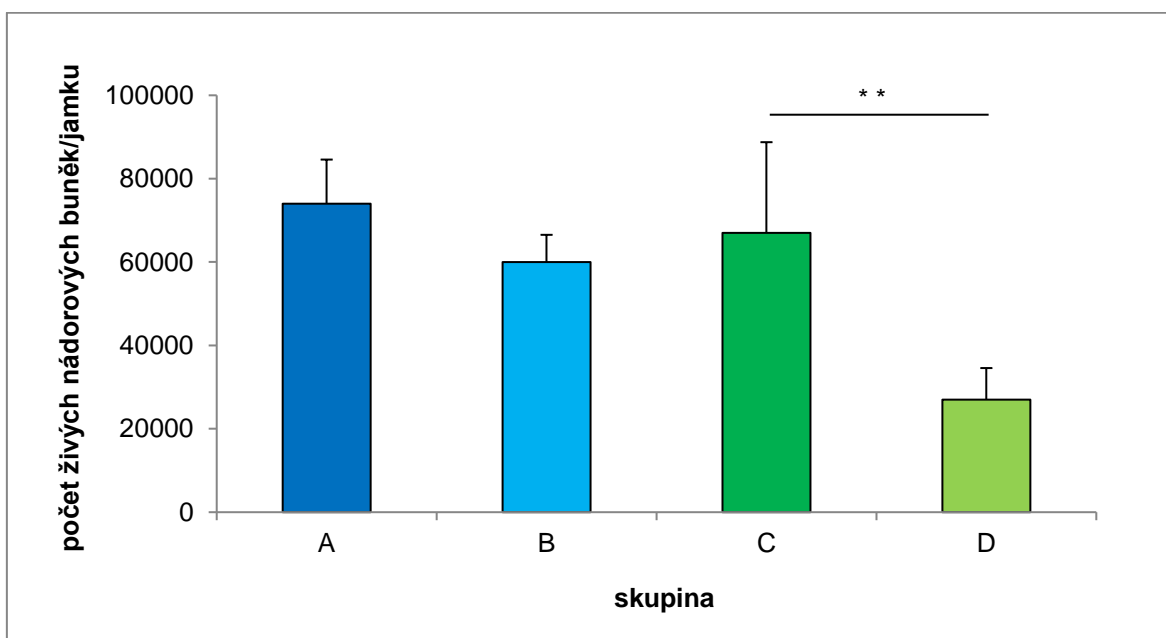
vzhledem ke skupině B- $p \leq 0,05$ •, $p \leq 0,01$ ••, $p \leq 0,005$ •••

vzhledem ke skupině D- $p \leq 0,05$ °, $p \leq 0,01$ °°, $p \leq 0,005$ °°°

4.5 *In vitro* cytotoxické působení NK buněk na nádorové buňky B16-F10 značené manan-BAM

Cílem experimentu bylo ověřit v *in vitro* podmínkách cytotoxické působení myších NK buněk na nádorové buňky B16-F10 s kotveným mananem.

NK buňky svou cytotoxickou aktivitou vedly k 60% statisticky významné redukci počtu živých nádorových buněk s kotveným mananem (srovnání skupin C a D). V případě, kdy nebyly nádorové buňky označeny manan-BAM, byla redukce jejich počtu 20% (srovnání skupin A a B). NK buňky v *in vitro* podmínkách tedy vykazují cytotoxickou aktivitu vůči nádorovým buňkám B16-F10, pokud jsou tyto buňky označeny kotveným mananem (**Obr.8**).



Obr.8: Cytotoxické působení NK buněk na nádorové buňky B16-F10 značené manan-BAM. Skupina **A** - B16-F10, skupina **B** - B16-F10 + NK buňky, skupina **C** - B16-F10 + manan-BAM, skupina **D** - B16-F10 + manan-BAM + NK buňky.

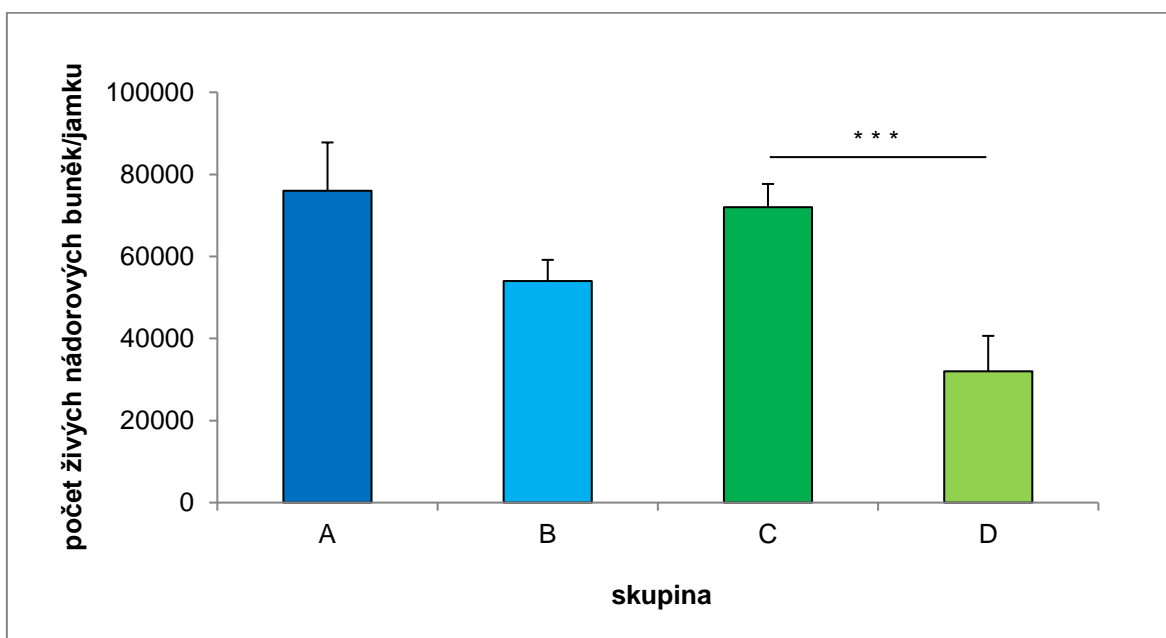
Hladiny statistické významnosti:

vzhledem ke skupině C - $p \leq 0,05$ *, $p \leq 0,01$ **, $p \leq 0,005$ ***

4.6 *In vitro* cytotoxické působení neutrofilů na nádorové buňky Panc02 značené manan-BAM

Cílem experimentu bylo ověřit v *in vitro* podmínkách cytotoxické působení myších neutrofilů na nádorové buňky Panc02 s kotveným mananem.

Neutrofilů svou cytotoxickou aktivitou vedly k 56% statisticky významné redukci počtu živých nádorových buněk s kotveným mananem (srovnání skupin C a D). V případě, kdy nebyly nádorové buňky označeny manan-BAM, byla redukce jejich počtu 29% (srovnání skupin A a B). Neutrofilů v *in vitro* podmínkách tedy vykazují cytotoxickou aktivitu vůči nádorovým buňkám Panc02, zvláště, pokud jsou tyto buňky označeny kotveným mananem (**Obr.9**).



Obr.9: Cytotoxické působení neutrofilů na nádorové buňky Panc02 značené manan-BAM.

Skupina **A** - Panc02, skupina **B** - Panc02 + neutrofilů, skupina **C** - Panc02 + manan-BAM, skupina **D** - Panc02 + manan-BAM + neutrofilů

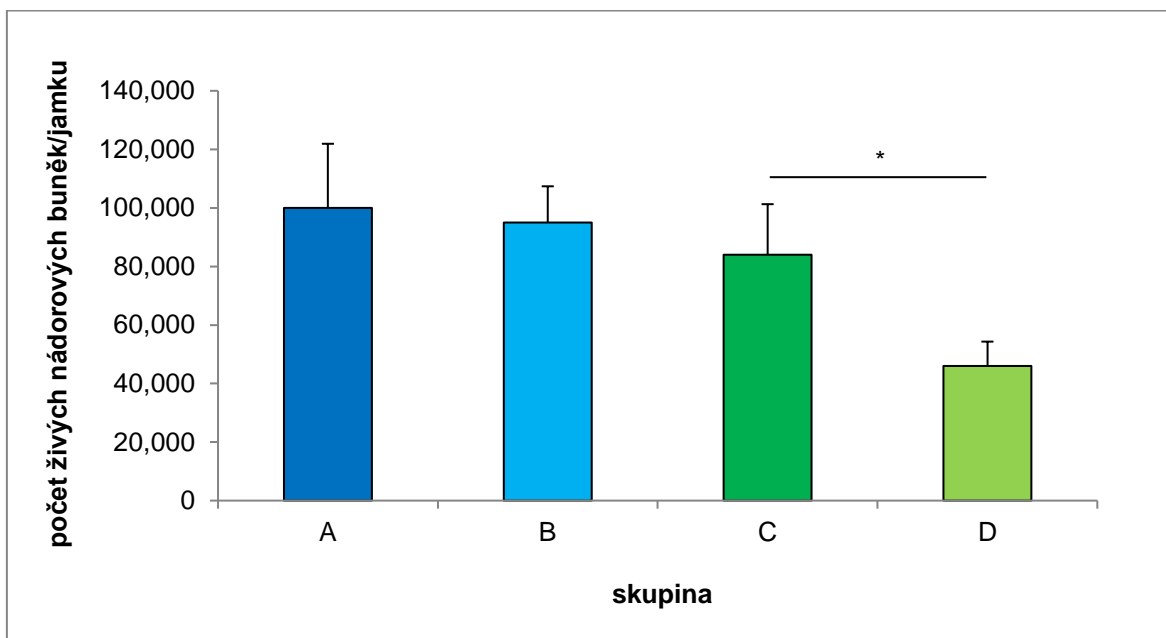
Hladiny statistické významnosti:

vzhledem ke skupině C - $p \leq 0,05$ *, $p \leq 0,01$ **, $p \leq 0,005$ ***

4.7 *In vitro* cytotoxické působení NK buněk na nádorové buňky Panc02 značené manan-BAM

Cílem experimentu bylo ověřit v *in vitro* podmínkách cytotoxické působení myších NK buněk na nádorové buňky Panc02 s kotveným mananem.

NK buňky svou cytotoxickou aktivitou vedly k 55% statisticky významné redukci počtu živých nádorových buněk s kotveným mananem (srovnání skupin C a D). V případě, kdy nebyly nádorové buňky označeny manan-BAM, byla redukce jejich počtu 5% (srovnání skupin A a B). NK buňky v *in vitro* podmínkách tedy vykazují cytotoxickou aktivitu vůči nádorovým buňkám Panc02, pokud jsou tyto buňky označeny kotveným mananem (**Obr.10**).



Obr.10: Cytotoxické působení NK buněk na nádorové buňky Panc02 značené manan-BAM.

Skupina **A** - Panc02, skupina **B** - Panc02 + NK buňky, skupina **C** - Panc02 + manan-BAM, skupina **D** - Panc02 + manan-BAM + NK buňky

Hladiny statistické významnosti:

vzhledem ke skupině C - $p \leq 0,05$ *, $p \leq 0,01$ **, $p \leq 0,005$ ***

5. Diskuze

Od počátku 20. století se objevují pokusy o využití bakterií v nádorové terapii (Coley 1893; Pearl 1928). Dnes se tyto tendence přeměrovali z bakterií jako takových spíše na jejich PAMPs motivy, z nichž jsou v popředí především TLR agonisti, používání samostatně, nebo v kombinaci s nádorovou vakcínou (Eton a kol., 1998), MAb (Friedberg a kol., 2009) či chemoterapeutikem (Manegold a kol., 2012). I přesto, že se jedná o látky indukující aktivaci vrozené imunity, bývá hlavním cílem jejich využití nepřímá stimulace získané imunity, především CD8⁺ T-lymfocytů.

Naše snahy o terapii nádorů jsou naopak cílené na aktivaci vrozené imunity. Intratumorální aplikací směsi TLR agonistů (např. R848, POLY (I:C), LTA) je indukována zánětlivá infiltrace nádoru a ukotvením manan-BAM do membrány nádorových buněk je aktivován komplement a zajištěna opsonizace nádorových buněk molekulami iC3b, ty jsou následně prostřednictvím CR3 rozpoznávány buňkami vrozené imunity a zabíjeny. Terapie tedy vychází z jednoduché interakce mezi PAMPs a PRRs exprimovanými fagocyty a NK buňkami a doposud se ukazuje jako velmi účinná (Janotová a kol., 2014; Caisová a kol., 2016; Waldmannová a kol., 2016).

I přesto, že je naše terapie cílená primárně na aktivaci vrozené imunity, je třeba brát v úvahu také úlohu získané imunity, vzhledem k úzkému propojení a spolupráci obou složek imunitního systému. V rámci získané imunity jsou s nádory spojovány především CD8⁺ T-lymfocyty, resp. CTL, jejichž přítomnost v nádoru je u řady malignit spojována s pozitivní prognózou (Naito a kol., 1998; Sato a kol., 2005; Haanen a kol., 2006). Důležitým podnětem pro studium úlohy získané imunity v rámci námi aplikované imunoterapie, bylo zjištění, že vyléčené myši jsou odolné vůči retransplantacím nádorů (Caisová a kol., 2016), tudíž v průběhu léčby dochází k vývoji imunologické paměti, za kterou jsou zodpovědné převážně buňky právě získané imunity.

Imunizace indukovaná alogenní terapeutickou nádorovou vakcínou

Nejprve bylo prostřednictvím imunizace sledováno, nakolik účinné jsou v redukci nádorového růstu CTL jako takové, bez úmyslné stimulace vrozené imunity, ve smyslu vyvolání zánětlivé infiltrace v nádoru a označení nádorových buněk kotveným PAMP motivem. K tomuto účelu byla myším podávána terapeutická alogenní nádorová vakcína,

jejímž základem byly fragmenty nádorových buněk B16-F10, aplikované samostatně nebo v kombinaci s adjuvanciem (kotvený manan a TLR agonisti) (kapitola 4.1).

Tento terapeutický přístup, založený na nádorovém ataku populace specifických CTL, nevedl u modelu melanomu B16-F10 k významnější redukci nádorového růstu. Mírné zpomalení nádorového růstu bylo sledováno ve skupinách, kterým byla podávána vakcína obsahující směs mananem označených fragmentů nádorových buněk a TLR agonistů (R848, POLY (I:C), popř. *L. monocytogenes*). TLR agonisti a kotvený manan v místě aplikace vakcíny pravděpodobně stimulovali fagocytózu fragmentů nádorových buněk antigen prezentujícími buňkami a tudíž také nepřímo stimulovali aktivaci CD8⁺ T-lymfocytů. Z použitých TLR agonistů je třeba vyzdvihnout úlohu POLY (I:C), která významně podporuje zrání DCs a prezentaci Ag získané imunitě (Rouas a kol., 2004).

Na základě dosažených výsledků lze usuzovat, že při standardní intratumorální aplikaci terapie založené na kombinaci kotveného mananu a směsi TLR agonistů, zamýšlená stimulace vrozené imunity vede také k nepřímé stimulaci získané imunity. Ta však na redukci nádorového růstu indukované terapií nemá ve srovnání s vrozenou imunitou pravděpodobně zásadní vliv.

Imunoterapie aplikovaná na CD4^{-/-} a CD8^{-/-} C57BL/6N myši

Pro bližší ověření úlohy T lymfocytů v redukci nádorového růstu a také následném přežívání myši po ukončení terapie založené na kotveném mananu a směsi TLR agonistů: R848, POLY (I:C) a LTA (dále jen terapie) byly použity CD4^{-/-} a CD8^{-/-} C57BL/6N myši opět s modelem melanomu B16-F10 (kapitoly 4.2 a 4.3).

Výsledky získané v průběhu experimentů byly srovnávány se standardními výsledky, importovanými z jiného experimentu, kterých je dosahováno při aplikaci výše zmíněné terapie na *wild-type* C57BL/6N myši. Zároveň jsou tyto výsledky vnímány spíše jako podnět pro další experimenty, jelikož byl pro tyto účely využit velmi malý vzorek myší, z něhož nelze vyvozovat definitivní závěry.

U CD4^{-/-} i CD8^{-/-} myši byla v průběhu experimentu zaznamenána redukce nádorového růstu srovnatelná s hodnotami získanými u *wild-type* C57BL/6N myši. Což naznačuje, že T_H-lymfocyty i CTL nemají zásadní vliv na redukci nádorového růstu indukovanou naší terapií. Tento výsledek v podstatě odpovídá datům o leukocytární nádorové infiltraci měřené v různých časových intervalech od podání terapie založené na kovalentně vázaném mananu a směsi TLR agonistů: R848, POLY (I:C) a *L. monocytogenes* (Caisová a kol., 2016), která svým působením odpovídá terapii aplikované v průběhu

experimentů s *knockout* myšmi, kdy ve srovnání s buňkami vrozené imunity, především neutrofilními granulocyty, tvoří CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocyty jen malou část celkové leukocytární populace v nádoru, a tudíž nemají ani prostor se jako efektory zabíjející nádorové buňky nějak zásadně projevit.

Absence CD4⁺ T-lymfocytů se ovšem projevila v následném přežívání myši po ukončení terapie. Léčené CD4^{-/-} myši uhynuly krátce po myších kontrolních, zatímco u léčených *wild-type* C57BL/6N myši bylo dosaženo statisticky významně delšího přežití ve srovnání s kontrolou. Tento výsledek může souviset s regulační úlohou T_H lymfocytů, které mají vliv nejen na aktivitu CTL a B-lymfocytů, ale také na aktivitu fagocytů, jež mají, na základě dosavadních výsledků, na úspěšnost naší terapie zásadní vliv (Zhu a Paul, 2008; Janotová a kol., 2014; Caisová a kol., 2016; Waldmannová a kol., 2016).

Absence CD8⁺ T-lymfocytů na následné přežívání myši po ukončení terapie zásadní vliv neměla a bylo dosaženo výsledku srovnatelného s léčenými *wild-type* C57BL/6N myšmi. Léčené CD8^{-/-} myši byly úspěšně vyléčeny a teprve po ukončení sledování doby přežití byly usmrceny. Výsledek tedy naznačuje, že CD8⁺ T-lymfocyty nemají zásadní vliv na redukci nádorové růstu ani na následné přežívání myši.

Data získaná při sledování přežití CD4^{-/-} a CD8^{-/-} myši mohou opět souviset se zastoupením CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocytů v analyzovaném leukocytárním infiltrátu (Caisová a kol., 2016). Zde je třeba zmínit, že CD4⁺ T-lymfocytů bylo naměřeno v různých intervalech od podání terapie průměrně 10x více než CD8⁺ T-lymfocytů, což může souviset se skutečností, že absence CD4⁺ lymfocytů, na rozdíl od absence CD8⁺ T-lymfocytů, měla negativní dopad na přežití myši po ukončení terapie.

V experimentech s CD4^{-/-} a CD8^{-/-} myšmi bylo dosaženo velmi zajímavých výsledků, které podporují náš dosavadní názor, že rozhodující úlohu v redukci nádorového růstu po aplikaci terapie mají spíše složky vrozené než získané imunity. Naopak v následném přežívání myši získaná imunita svůj význam má. Tyto výsledky jsou podnětem pro další zopakování experimentů na dostatečně velkém vzorku myši, pro kvalitní statistické vyhodnocení dat a získání publikovatelných výsledků.

Důvodem pro zopakování experimentů jsou také výsledky terapie aplikované na melanom B16-F10 transplantovaný SCID myším (Uher, *in prep*), kde v rámci redukce nádorového růstu i následného přežívání myši nebyly sledovány zásadní rozdíly mezi léčenou a kontrolní skupinou a které naopak naznačují, že získaná imunita jako taková svoji úlohu v redukci nádorového růstu i následném přežívání má.

Zapojení anti-PD-1 a anti-CD40 MAbs do současné imunoterapie

Přestože s použitím terapeutické směsi manan-BAM, R848, POLY (I:C) a LTA (dále je terapie) byly doposud zaznamenány velmi pozitivní výsledky, stále nebylo dosaženo 100% vyléčení a přežití myší. Proto je současná terapie kombinována s dalšími látkami s potenciálním aditivním efektem, jako jsou např. anti-PD-1 a anti-CD40 MAbs (kapitola 1.3.2.2). V rámci provedeného experimentu byl sledován nejen potenciální aditivní efekt těchto protilátek kombinovaných s naší terapií v léčbě melanomu B16-F10, ale také účinnost protilátek samotných (kapitola 4.4).

PD-1 receptor exprimovaný T_H -lymfocyty a CTL je důležitým inhibičním regulátorem T buněčné imunitní odpovědi. Anti-PD-1 funguje jako antagonist PD-1 receptoru a stimuluje tedy aktivitu T lymfocytů (Barber a kol., 2005), což je u lymfocytů infiltrujících nádor žádoucí. PD-1 receptor je také exprimovaný T reg lymfocyty, kde naopak funguje jako stimulační receptor a vazba anti-PD-1 v tomto případě tedy potlačuje aktivitu pronádorových T reg lymfocytů. Zároveň se anti-PD-1 váže na PD-L1 ligand PD-1 receptoru exprimovaný nádorovými buňkami (Noh a kol., 2015), brání tak jejich interakci s tímto receptorem a tím následně inhibici efektorových T lymfocytů a stimulaci T reg lymfocytů přítomných v nádoru.

Přestože populace efektorových T lymfocytů v melanomu B16-F10 není velká (Caisová a kol., 2016), jejich stimulace anti-PD-1 může mít v kombinaci s naší současnou terapií aditivní efekt. V rámci provedeného experimentu vedla kombinace anti-PD-1 s naší terapií k signifikantní redukci nádorového růstu i delšímu přežití myší. Naopak anti-PD-1 samotná žádný terapeutický účinek nevyvolala. Podobných výsledků bylo dosaženo i v rámci experimentu provedeného v rámci naší skupiny na modelu pankreatického adenokarcinomu Panc02 transplantovaného C57BL/6N myším (Paďouková a Uher, *in prep*).

CD40 kostimulační molekula exprimovaná antigen prezentujícími buňkami (DCs, makrofágy) je nezbytná pro aktivaci těchto buněk, přenos informace na získanou imunitu a následně vznik antigeně specifických CTL. Fyziologickým ligandem CD40 receptoru je CD154 na povrchu T_H -lymfocytů. Anti-CD40 funguje jako agonista CD40 receptoru a tudíž indukuje aktivaci DCs (Osada a kol., 2002) a makrofágů, u kterých byl po vazbě anti-CD40 sledován i přímý protinádorový efekt (Buhtoiarov a kol., 2005). Cytokiny produkované antigen prezentujícími buňkami aktivovanými anti-CD40 dále indukují aktivaci a protinádorový efekt NK buněk (Turner a kol., 2001). Vazba rozpustného CD40 ligandu, produkovaného krevními destičkami, na CD40 receptor exprimovaný neutrofilů vede k

jejich aktivaci a oxidativnímu vzplanutí (Jin a kol., 2013), podobný efekt by mohla vyvolat i anti-CD40 protilátka.

V rámci provedeného experimentu vedla kombinace anti-CD40 s naší terapií k signifikantní redukci nádorového růstu i delšímu přežití myši. Vzhledem k širokému spektru působení anti-CD40 v rámci imunitního systému není překvapivé, že i protilátka samotná vedla k signifikantní redukci nádorového růstu a také úplnému vyléčení jedné z léčených myši. Podobných výsledků bylo opět dosaženo i v experimentu provedeném v rámci naší skupiny na modelu pankreatického adenokarcinomu Panc02 transplantovaného C57BL/6N myším (Paďouková a Uher, *in prep*).

Na základě dosavadních výsledků se tedy především anti-CD40 jeví jako vhodný doplněk v současnosti zavedené terapeutické směsi, který by mohl vést k dalšímu zvýšení celkového léčebného účinku.

Jak již bylo mnohokrát zmíněno, intratumorální aplikace směsi TLR agonistů a PAMPs motivů stimulujících fagocytózu, popř. exocytózu granul vede k mohutné zánětlivé infiltraci a zabíjení nádorových buněk. Analýzou pomocí průtokové cytometrie a histologie bylo zjištěno, že nejmohutnější populací leukocytů v nádoru po podání terapie jsou neutrofilní granulocyty, a proto se naše pozornost zaměřila na bližší studium efektorových mechanismů neutrofilů a vyhodnocení jejich cytotoxického působení na nádorové buňky myšního melanomu B16-F10 v *in vitro* podmínkách. (Janotová a kol., 2014; Caisová a kol., 2016; Waldmannová a kol., 2016).

Dále byl zaznamenán významný nárůst v rámci populace NK buněk (Waldmannová a kol., 2016) a jedním z úkolů této magisterské práce bylo ověřit míru cytotoxického působení NK buněk na nádorové buňky myšního melanomu B16-F10 v *in vitro* podmínkách.

Cytotoxické působení myších NK buněk na buňky myšního melanomu B16-F10

Cytotoxicita NK buněk, jež byly získány pomocí imunomagnetické separace z myší sleziny (Meinhardt a kol., 2012), byla sledována a porovnávána mezi nádorovými buňkami s kotveným mananem a bez mananu. Funkcí mananu je zde aktivace komplementu prostřednictvím MBL a následná opsonizace nádorových buněk molekulami iC3b, jež jsou rozpoznávány CR3, jedním z aktivačních receptorů exprimovaných NK buňkami, indukujících exocytózu cytotoxických granul a produkci IFN γ (Větvicka a kol., 1996). Zapojení komplementu při použití kotveného mananu bylo zjištěno Janotovu a kol. (2016).

Důležitým krokem při použití kotveného mananu a tedy cílení na CR3 je aktivace tohoto receptoru vazbou β -glukanu na β_2 -podjednotku receptoru (Větvička a kol., 1996), proto byly NK buňky nejprve inkubovány s nízkomolekulárním laminarinem. Tento způsob aktivace CR3 ověřili ve svých pracích Vácová (2015) a Kovářová (2015).

Signifikantní redukce počtu živých nádorových buněk bylo dosaženo pouze ve skupině, kde byly nádorové buňky označeny mananem, což poukazuje na velký význam kotvení PAMPs motivů do membrány nádorových buněk v rámci terapie. Výsledky studia cytotoxického působení NK buněk na melanomové buňky s kotveným mananem byly publikovány (Waldmannová a kol., 2016).

Pro dostatečné ověření účinnosti naší terapie byl zařazen nový nádorový model, a to myší pankreatický adenokarcinom Panc02 (kapitola 1.1.3). Dalším úkolem této magisterské práce bylo tedy ověřit míru cytotoxického působení neutrofilů a NK buněk na nádorové buňky Panc02 v *in vitro* podmínkách.

Cytotoxické působení myších neutrofilů a NK buněk na buňky myšího pankreatického adenokarcinomu Panc02

I v tomto případě byla srovnávána cytotoxicita efektorových buněk vůči nádorovým buňkám s kotveným mananem a bez mananu. NK buňky byly získány imunomagnetickou separací z myší sleziny a inkubovány s nízkomolekulárním laminarinem (*viz* výše). Neutrofilů byly získány imunomagnetickou separací z kostní dřeně myší (Stassen a kol., 2006). Takto získané naivní neutrofilů bylo třeba nejprve aktivovat směsí cytokinů GM-CSF a TNF α . Tento způsob aktivace naivních neutrofilů ověřili ve svých pracích Vácová (2015) a Kovářová (2015), jež vycházely z poznatků Dewase a kol. (2003). Směs GM-CSF a TNF α byla vzhledem k použití mananu doplněna také o nízkomolekulární laminarin (*viz* výše).

Předpokládaným efektorovým mechanismem neutrofilů je vzhledem k velikosti nádorových buněk tzv. frustrovaná fagocytóza, jež byla doposud pozorována u neutrofilů zabíjejících nádorové buňky myšího melanomu B16-F10 značené mananem (Herant a kol., 2006; Waldmannová a kol., 2016).

V rámci těchto experimentů bylo dosaženo stejných výsledků jako v případě nádorových buněk myšího melanomu B16-F10, tj. signifikantní redukce počtu živých nádorových buněk bylo dosaženo ve skupinách, kde byly nádorové buňky označeny mananem. Toto zjištění má význam i v rámci hledání vysvětlení nižší účinnosti imunoterapie pankreatického adenokarcinomu Panc02 ve srovnání s imunoterpií melanomu B16-F10, což

je v současnosti řešený problém. Na základě výsledků *in vitro* experimentů tedy není problémem odolnost nádorových buněk Panc02 vůči ataku vrozené imunity. Pokusy s deplecí Treg lymfocytů ukazují jako pravděpodobnou příčinu vysoký účinek supresorových buněk přítomných v nádoru Panc02 (Ženka, *ústní sdělení*).

Výsledky experimentů sledujících míru cytotoxického působení neutrofilů a NK buněk na námi využívané nádorové modely v *in vitro* podmínkách potvrzují, že vazba PAMPs motivů na nádorové buňky výrazně posiluje schopnost efektorových buněk vrozené imunity tyto nádorové buňky rozpoznávat a zabíjet.

6. Závěr

- **Získaná imunita** (se zaměřením na T-lymfocyty) pravděpodobně nemá, na základě předběžných výsledků, zásadní vliv na redukci nádorového růstu v průběh terapie založené na směsi R848, POLY (I:C), LTA a manan-BAM, podílí se ovšem na delším přežití léčených myší.
- Pro **ověření úlohy získané imunity** je třeba provést odpovídající experimenty s dostatečně velkým vzorkem myší.
- **Anti-PD1** a **anti-CD40** MAbs v kombinaci s terapií založenou na směsi R848, POLY (I:C), LTA a manan-BAM vedly k signifikantní redukci nádorového růstu a k přežití léčených myší, **anti-CD40** má v menší míře tento efekt i samotná a jeví se jako vhodný kandidát pro doplnění současné terapeutické směsi.
- **Neutrofilly** a **NK buňky** v *in vitro* podmínkách vykazují významný cytotoxický efekt vůči nádorovým buňkám B16-F10 a Panc02 s kotveným mananem.

7. Seznam zkratek

ADCC - *antibody dependent cell-mediated cytotoxicity*, cytotoxicita závislá na protilátkách

AFP - *alpha-fetoprotein*, alfa-fetoprotein

Ag - *antigen/s*, antigen/y

BAM - *biocompatible anchor for cell membrane*

BCG - *bacillus calmette-guérin*

CD - *cluster of differentiation*, difeneciační skupina (doplněno o dané číslo)

CpG - *cytosine-phosphate-guanine*, cytosin-fosfát-guanin

CR - *cystein rich (domain)*, doména bohatá na cystein

CR3 - *complement receptor 3*, komplementový receptor 3

CRD - *carbohydrate recognition domain*, sacharid rozpoznávající doména

CTL - *cytotoxic T lymphocytes*, cytotoxické T lymfocyty

CTLA-4 - *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*, cytotoxický T-lymfocytární antigen- 4

CTLD - *C-type lectin-like domain*

DAMPs - *damage-associated molecular patterns*

DCs - *dendritic cells*, dendritické buňky

DMEM - *dulbecco's modified eagle medium*

DMSO - *dimethylsulfoxide*, dimetylsulfoxid

EDTA - *ethylenediaminetetraacetic acid*, kyselina ethylendiamintetraoctová

Epha2 - *ephrin type-A receptor 2*

FCS - *fetal calf serum*, fetální telecí sérum

FNII - *fibronectine type II (domain)*

GM-CSF - *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

HBSS - *Hanks' balanced salt solution*

HPV - *human papillomavirus*, lidský papilomavirus

ICAM-1 - *intercellular adhesion molecule 1*, intracelulární adhezní molekula 1

IFN α/γ - *interferon alpha/gamma*, interferon alfa/gama

IL-10 - *interleukin 10*, interleukin 10

IVC - *individually ventilated cages*

KIRs - *killer-cell immunoglobulin-like receptors*

LLD - *lectin-like domain*

LPS - *lipopolysaccharide*, lipopolysacharid

LRR - *leucine-rich repeat*

LTA - *lipoteichoic acid*, lipoteichová kyselina

MAB(s) - *monoclonal antibody/ies*, monoklonální protlátka/y

Mac-1 - *macrophage-1 antigen*

MBL - *mannan binding lectin*, manan vázající lektin

MDSC - *myeloid-derived suppressor cells*, myeloidní supresorové buňky

MHC - *major histocompatibility complex*, hlavní histokompatibilní komplex

MICA/B - *MHC class I polypeptide-related sequence A/B*

MMP-9 - *matrix metalloproteinase 9*, matrixová metaloproteináza 9

MPO - *myeloperoxidase*, myeloperoxidáza

MR - *mannose receptor*, manóзовý receptor

NADPH - *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*, nikotinamid adenin dinukleotid
fosfát

NETs - *neutrophil extracellular traps*, neutrofilní extracelulární sítě

NHS - *N-hydroxysuccinimide*, N-hydroxysikcinimid

NK - *natural killer*. přirození zabíječi

NKG2D - *natural killer group 2D (receptor)*

PAMPs - *pathogen-associated molecular patterns*

PBS - *phosphate-buffered saline*, fosfáty pufovaný fyziologický roztok

PD-1 - *programmed cell death 1 (receptor)*

PD-L - *programmed cell death 1 (receptor) ligand*

POLY (I:C) - *polyinosinic-polycytidylic acid*, polyinosinová-polycytidylová kyselina

PRR(s) - *pattern recognition receptor(s)*

PSA - *prostate specific antigen*, prostatický specifický antigen

R848 - *resiquimod*, resiquimod

RNA - *ribonucleic acid*, ribonukleová kyselina

ROS - *reactive oxygen species*, reaktivní formy kyslíku

RPMI - *Roswell park memorial institute (medium)*

SPF - *specific pathogen free*

TAA - *tumour associated antigens*, s nádorem asociované antigeny

TAM - *tumour associated macrophages*, s nádorem asociované makrofágy

TAN - *tumour associated neutrophils*, s nádorem asociované neutrofilny

TGFβ - *transforming growth factor beta*, transformující růstový faktor beta

T_H - *T helper lymphocytes*, pomocné T lymfocyty

TIR - *toll/interleukin-1 receptor (domain)*

TLR(s) - *toll-like receptor/s*, toll-like receptor/y

TNF α - *tumor necrosis factor alpha*

TRAIL - *TNF-related apoptosis-inducing ligand*

Treg - *T regulatory lymphocytes*, T regulační lymfocyty

TSA - *tumour specific antigens*, nádorově specifické antigeny

UV - *ultraviolet (radiation)*, ultrafialové (záření)

VEGF - *vascular endothelial growth factor*, vaskulární edoteliální růstový faktor

8. Seznam literatury

Akira S., Uematsu S., Takeuchi O., 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124: 783-801

Anfossi N., André P., Guia S., Falk Ch. S., Roetynck S., Stewart C. A., Bresó V., Frassati C., Reviron D., Middleton D., Romagné F., Ugolini S., Vivier E., 2006. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity*, 25: 331-342

Bajor D. L., Mick R., Riese M. J., Richman L. P., Xu X., Torigian D. A., Stelekati E., Sweeney M., Sullivan B., Schuchter L. M., Amaravadi R., Wherry E. J., Vonderheide R. H., 2015. Abstract CT137: combination of agonistic CD40 monoclonal antibody CP-870,893 and anti-CTLA-4 antibody tremelimumab in patients with metastatic melanoma. *Cancer Research*, 75

Barber D. L., Wherry E. J., Masopust D., Zhu B., Allison J. P., Sharpe A. H., Freeman G. J., Ahmed R., 2005. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*, 439: 682-687

Belotti D., Paganoni P., Manenti L., Garofalo A., Marchini S., Taraboletti G., Giavazzi R., 2003. Matrix metalloproteinases (MMP9 and MMP2) induce the release of vascular endothelial growth factor (VEGF) by ovarian carcinoma cells: implications for ascites formation. *Cancer Research*, 63: 5224-5229

Berger M., Kreutz F. T., Horst J. L., Baldi A. C., Koff W. J., 2007. Phase I study with an autologous tumor cell vaccine for locally advanced or metastatic prostate cancer. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 10: 144-152

Berger-Achituv S., Brinkmann V., Abed U. A., Kühn L. I., Ben-Ezra J., Elhasid R., Zychlinsky A., 2013. A proposed role for neutrophil extracellular traps in cancer immunoediting. *Frontiers in Immunology*, 4: 1-5

Bernstein Ch. N., Blanchard J. F., Kliewer E., Wajda A., 2001. Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease. *Cancer*, 91: 854-862

Beutler B., 2004. Innate immunity: an overview. *Molecular Immunology*, 40: 845-859

Borregaard N., Cowland J. B., 1997. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*, 89: 3503-3521

Brinkmann V., Reichard U., Goosmann Ch., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D. S., Weinrauch Y., Zychlinsky A., 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303: 1532-1535

Brody J. D., Ai W. Z., Czerwinski D. K., Torchia J. A., Levy M., Advani R. H., Kim Y. H., Hoppe R. T., Knox S. J., Shin L. K., Wapnir I., Tibshirani R. J., Levy R., 2010. In situ vaccination with a TLR9 agonist induces systemic lymphoma regression: a phase I/II study. *The Journal of Clinical Oncology*, 28: 4324-4332

- Buhtoiarov I. N., Lum H., Berke G., Paulnock D. M., Sondel P. M., Rakhmilevich A. L., 2005. CD40 Ligation activates murine macrophages via an IFN- γ -dependent mechanism resulting in tumor cell destruction in vitro. *The Journal of Immunology*, 174: 6013-6022
- Caisová V., Vieru A., Kumžáková Z., Glaserová S., Husníková H., Vácová N., Krejčová G., Paďouková L., Jochmanová I., Wolf K. I., Chmelař J., Kopecký J., Ženka J., 2016. Innate immunity based cancer immunotherapy: B16-F10 murine melanoma model. *BMC Cancer*, 16: 1-11.
- Caldas C., Hahn S. A., da Costa L. T., Redston M. S., Schutte M., Seymour A. B., Weinstein C. L., Hruban R. H., Yeo Ch. J., Kern S. E., 1994. Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (*MTS1*) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nature Genetics*, 8: 27-32
- Cavaleiro-Pinto M., Peleteiro B., Lunet N., Barros H., 2011. Helicobacter pylori infection and gastric cardia cancer: systematic review and meta-analysis. *Cancer Causes Control*, 22: 375-387
- Clifford G. M., Smith J. S., Plummer M., Muñoz N., Franceschi S., 2003. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *British Journal of Cancer*, 88: 63-73
- Coley W. B., 1893. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases. *The American Journal of Medical Science*, 10: 487-511
- Corbett T. H., Roberts J., Leopold W. R., Peckham J. C., Wilkoff L. J., Griswold D. P., Schabel F. M., 1984. Induction and chemotherapeutic response of two transplantable ductal adenocarcinomas of the pancreas in C57BL/6 mice. *Cancer Research*, 44: 717-726
- Couzine-Frankel J., 2013. Cancer immunotherapy. *Science* 342: 1432-1433
- Croce C. M., 2008. Oncogenes and cancer. *The New England Journal of Medicine*, 358: 502-511
- Dahl M. R., Thiel S., Matsushita M., Fujita T., Willis A. C., Christensen T., Vorup-Jensen T., Jensenius J. C., 2001. MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway. *Immunity*, 15: 127-135
- Dallegrì F., Ottonello L., Ballestrero A., Dapino P., Ferrando F., Patrone F., Sacchetti C., 1991. Tumor cell lysis by activated human neutrophils: Analysis of neutrophil-delivered oxidative attack and role of leukocyte function-associated antigen 1. *Inflammation*, 15: 15-30
- Daniele B., Bencivenga A., Megna A. S., Tinessa V., 2004. α -fetoprotein and ultrasonography screening for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 127: 108-112
- DeLeo F. R., Allen L. H., Apicella M., Nauseef W. M., 1999. NADPH oxidase activation and assembly during phagocytosis. *The Journal of Immunology*, 163: 6732-6740

- Dewas C., Dang P. M., Gougerot-Pocidallo M. A., El-Benna J., 2003. TNF- α induces phosphorylation of p47phox in human neutrophils: partial phosphorylation of p47phox is a common event of priming of human neutrophils by TNF- α and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Journal of Immunology*, 171: 4392-4398
- de Weger V. A., Turksma A. W., Voorham Q. J. M., Euler Z., Bril H., van den Eertwegh A. J., Bloemena E., Pinedo H. M., Vermorken J. B., van Tinteren H., Meijer G. A., Hooijberg E., 2012. Clinical effects of adjuvant active specific immunotherapy differ between patients with microsatellite-stable and microsatellite-unstable colon cancer. *Clinical Cancer Research*, 18: 882-889
- Dighe A. S., Richards E., Old L. J., Schreiber R. D., 1994. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN- γ receptors. *Immunity*, 1: 447-458
- Dobrovina E. S., Dobrovin M. M., Vider E., Sisson R. B., O'Reilly R. J., Dupont B., Vyas Y. M., 2003. Evasion from NK cell immunity by MHC class I chain-related molecules expressing colon adenocarcinoma. *The Journal of Immunology*, 171: 6891-6899
- Dovedi S. J., Melis M. H. M., Wilkinson R. W., Adlard A. L., Stratford I. J., Honeychurch J., Illidge T. M., 2013. Systemic delivery of a TLR7 agonist in combination with radiation primes durable antitumor immune responses in mouse models of lymphoma. *Blood*, 121: 251-259
- Draghi M., Pashine A., Sanjanwala B., Gendzekhadze K., Cantoni C., Cosman D., Moretta A., Valiante N. M., Parham P., 2007. Nkp46 and NKG2D recognition of infected dendritic cells is necessary for NK cell activation in the human response to influenza infection. *The Journal of Immunology*, 175: 2688-2698
- Eton O., Kharkevitch D. D., Gianan M. A., Ross M. I., Itoh K., Pride M. W., Donawho C., Buzaid A. C., Mansfield P. F., Lee J. E., Legha S. S., Plager C., Papadopoulos N. E., Bedikian A. Y., Benjamin R. S., Balch C. M., 1998. Active immunotherapy with ultraviolet B-irradiated autologous whole melanoma cells plus DETOX in patients with metastatic melanoma. *Clinical Cancer Research*, 4: 619-627
- Ezekowitz R. A. B., Day L. E., Herman G. A., 1988. A human mannose-binding protein is an acute-phase reactant that shares sequence homology with other vertebrate lectins. *The Journal of Experimental Medicine*, 167: 1034-1046
- Fidler I. J., 1973. Selection of successive tumour lines for metastasis. *Nature New Biology*, 242: 148-149
- Francisco L. M., Salinas V. H., Brown K. E., Vanguri V. K., Freeman G. J., Kuchroo V. K., Sharpe A. H., 2009. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 206: 3015-3029
- Fridlender Z. G., Albeda S. M., 2012. Tumor-associated neutrophils: friend or foe? *Carcinogenesis*, 33: 949-955

- Fridlender Z. G., Sun J., Kim S., Kapoor V., Cheng G., Ling L., Worthen G. S., Albelda S. M., 2009. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF- β : "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell*, 16: 183-194
- Friedberg J. W., Kelly J. L., Neuberg D., Peterson D. R., Kutok J. L., Salloum R., Brenn T., Fisher D. C., Ronan E., Dalton V., Rich L., Marquis D., Sims P., Rothberg P. G., Liesveld J., Fisher R. I., Coffman R., Mosmann T., Freedman A. S., 2009. Phase II study of a TLR-9 agonist (1018 ISS) with rituximab in patients with relapsed or refractory follicular lymphoma. *British Journal of Hematology*, 146: 282-291
- Galligioni E., Quaia M., Merlo A., Carbone A., Spada A., Favaro D., Santarosa M., Sacco C., Talamini R., 1996. Adjuvant immunotherapy treatment of renal carcinoma patients with autologous tumor cells and bacillus calmette-guerin: five-year results of a prospective randomized study. *Cancer*, 77: 2560-2566
- Glässner A., Eisenhardt M., Krämer B., Körner Ch., Coenen M., Sauerbruch T., Spengler U., Nattermann J., 2012. NK cells from HCV-infected patients effectively induce apoptosis of activated primary human hepatic stellate cells in a TRAIL-, FasL- and NKG2D-dependent manner. *Laboratory Investigation*, 92: 967-977
- Godtman R. A., Holmberg E., Lilja H., Stranne J., Hugosson J., 2015. Opportunistic testing versus organized prostate-specific antigen screening: outcome after 18 years in the Göteborg randomized population-based prostate cancer screening trial. *European Urology*, 68: 354-360
- Gollob J. A., Sciambi C. J., Huang Z., Dressman H. K., 2005. Gene expression changes and signaling events associated with the direct antimelanoma effect of IFN- γ . *Cancer Research*, 65: 8869-8877
- Goodman M., Morgan R. W., Ray R., Malloy C. D., Zhao K., 1999. Cancer in asbestos-exposed occupational cohorts: a meta-analysis. *Cancer Causes and Control*, 10: 453-465
- Guimarães-Costa A. B., Nascimento M. T. C., Fromenta G. S., Soares R. P. P., Morgadoc F. N., Conceição-Silva F., Saraiva E. M., 2009. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106: 6748-6753
- Guo Ch., Manjili M. H., Subjeck J. R., Sarkar D., Fisher P. B., Wang X., 2013. Therapeutic Cancer Vaccines: Past, Present, and Future. *Advances in Cancer Research*, 119: 421-475
- Haanen J. B. A. G., Baars A., Gomez R., Weder P., Smits M., de Gruijl T. D., von Blumberg B. M. E., Bloemena E., Scheper R. J., van Ham S. M., Pinedo H. M., van den Eertwegh A. J. M., 2006. Melanoma-specific tumor-infiltrating lymphocytes but not circulating melanoma-specific T cells may predict survival in resected advanced-stage melanoma patients. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 55: 451-458
- Haynes-Gilmore N., Banach M., Edholm E. S., Lord E., Robert J., Ferlazzo G., Moretta A., Bottino C., 2014. A critical role of non-classical MHC in tumor immune evasion in the amphibian *Xenopus* model. *Carcinogenesis*, 35: 1807 – 1813

- Hart O. M., Athie-Morales V., O'Connor G. M., Gardiner C. M., 2005. TLR7/8-mediated activation of human NK cells results in accessory cell-dependent IFN- γ production. *The Journal of Immunology*, 175: 1636-1642
- Hendrix M. J. C., Seftor E. A., Hess A. R., Seftor R. E. B., 2003. Molecular plasticity of human melanoma cells. *Oncogene*, 22: 3070-3075
- Herant M., Heinrich V., Dembo M., 2006. Mechanics of neutrophil phagocytosis: experiments and quantitative models. *Journal of Cell Science*, 119: 1903-1913
- Hirahashi J., Mekala D., van Ziffle J., Xiao L., Saffaripour S., Wagner D. D., Shapiro S. D., Lowell C., Mayadas T. N., 2006. Mac-1 signaling via Src-family and Syk kinases results in elastase-dependent thrombohemorrhagic vasculopathy. *Immunity*, 25: 271-283
- Horikawa N., Abiko K., Matsumura N., Hamanishi J., Baba T., Yamaguchi K., Yoshioka Y., Koshiyama M., Konishi I., 2017. Expression of vascular endothelial growth factor in ovarian cancer inhibits tumor immunity through the accumulation of myeloid-derived suppressor cells. *Clinical Cancer Research*, 23: 587-599
- Hubert P., Heitzmann A., Viel S., Nicolas A., Sastre-Garau X., Oppezio P., Pritsch O., Osinaga E., Amigorena S., 2011. Antibody-dependent cell cytotoxicity synapses form in mice during tumor-specific antibody Immunotherapy. *Cancer Research*, 71: 5134-5143
- Hsueh E. C., Essner R., Foshag L. J., Ollila D. W., Gammon G., O'Day S. J., Boasberg P. D., Stern S. L., Ye X., Morton D. L., 2002. Prolonged survival after complete resection of disseminated melanoma and active immunotherapy with a therapeutic cancer vaccine. *Journal of Clinical Oncology*, 20: 4549-4554
- Chang Y., Barrett J. H., Bishop D. T., Armstrong B. K., Bataille V., Bergman W., Berwick M., Bracci P. M., Elwood J. M., Ernstoff M. S., Gallagher R. P., Green A. C., Gruis N. A., Holly E. A., Ingvar Ch., Kanetsky P. A., Karagas M. R., Lee T. K., le Marchand L., Mackie R. M., Olsson H., Østerlind A., Rebbeck T. R., Sasieni P., Siskind V., Swerdlow A. J., Titus-Ernstoff L., Zens M. S., Newton-Bishop J. A., 2009. Sun exposure and melanoma risk at different latitudes: a pooled analysis of 5700 cases and 7216 controls. *International Journal of Epidemiology*, 38: 814-830
- Choe J., Kelker M. S., Wilson I. A., 2005. Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain. *Science*, 309: 581-585
- Choi D., Lim J. H., Lee K. T., Lee J. K., Choi S. H., Heo J. S., Jang K., Lee N. Y., Kim S., Hong S., 2006. Cholangiocarcinoma and *Clonorchis sinensis* infection: a case-control study in Korea. 44: 1066-1073
- Jack D. L., Read R. C., Tenner A. J., Frosch M., Turner M. W., Klein N. J., 2001. Mannose-binding lectin regulates the inflammatory response of human professional phagocytes to *Neisseria meningitidis* serogroup B. *The Journal of Infectious Diseases*, 184: 1152-1162
- Janotová T., Jalovecká M., Auerová M., Švecová I., Bruzlová P., Maierová V., Kumžáková Z., Čunátová Š., Vlčková Z., Caisová V., Rozsypalová P., Lukáčová K., Vácová N., Wachtlová M., Salát J., Lieskovská J., Kopecký J., Ženka J., 2014. The use of anchored

agonists of phagocytic receptors for cancer immunotherapy: B16-F10 murine melanoma model. *PLOS ONE*, 9: 1-14

Jin M. S., Lee J., 2008. Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes. *Immunity*, 29: 182-191

Jin R., Yu S., Song Z., Zhu X., Wang C., Yan J., Wu F., Nanda A., Granger D. N., Li G., 2013. Soluble CD40 ligand stimulates CD40-dependent activation of the $\beta 2$ integrin Mac-1 and protein kinase C ζ (PKC ζ) in neutrophils: implications for neutrophil-platelet interactions and neutrophil oxidative burst. *PLOS ONE*, 8

Jurk M., Heil F., Vollmer J., Schetter Ch., Krieg A. M., Wagner H., Lipford G., Bauer S., 2002. Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nature Immunology*, 3: 499

Kägi D., Ledermann B., Bürki K., Seiler P., Odermatt B., Olsen K. J., Podack E. R., Zinkernagel R. M., Hengartner H., 1994. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature*, 369: 31-37

Kato K., Itoh C., Yasukouchi T., Nagamune T., 2004. Rapid protein anchoring into the membranes of mammalian cells using oleyl chain and poly(ethyleneglycol) derivatives. *Biotechnology Progress*, 20: 897-904

Kanzler H., Barrat F. J., Hessel E. M., Coffman R. L., 2007. Therapeutic targeting of innate immunity with toll-like receptor agonists and antagonists. *Nature Medicine*, 13: 552-559

Kawai T., Akira S., 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on toll-like receptors. *Nature Immunology*, 11: 373-384

Kim R., Emi M., Tanabe K., 2007. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*, 121: 1-14

Kolaczowska E., Kubes P., 2013. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Review Immunology*, 13: 159-175

Kovářová M., 2015. Použití neutrofilů v nádorové imunoterapii. Diplomová práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice

Kowanko I. C., Ferrante A., 1987. Stimulation of neutrophil respiratory burst and lysosomal enzyme release by human interferon- γ . *Immunology*, 62: 149-151

Kvistborg P., Philips D., Kelderman S., Hageman L., Ottensmeier Ch., Joseph-Pietras D., Welters M. J. P., van der Burg S., Kapiteijn E., Michielin O., Romano E., Linnemann C., Speiser D., Blank Ch., Haanen J. B., Schumacher T. N., 2014. Anti-CTLA-4 therapy broadens the melanoma-reactive CD8⁺ T cell response. *Science Translational Medicine*, 6: 1-9

Lan Ch., Huang X., Lin S., Huang H., Cai Q., Wan T., Lu J., Liu J., 2013. Expression of M2-polarized macrophages is associated with poor prognosis for advanced epithelial ovarian cancer. *Technology in Cancer Research and Treatment*, 12: 259-267

- Latgé J., 2010. Tasting the fungal cell wall. *Cellular Microbiology*, 12: 863-872
- Li J., Piao Y. F., Jiang Z., Chen L., Sun H. B., 2009. Silencing of signal transducer and activator of transcription 3 expression by RNA interference suppresses growth of human hepatocellular carcinoma in tumor-bearing nude mice. *World Journal of Gastroenterology*, 15: 2602–2608
- Lichtenstein A., 1987. Stimulation of the respiratory burst of murine peritoneal inflammatory neutrophils by conjugation with tumor cells. *Cancer Research*, 47: 2211-2217
- Mandelboim O. Malik P. Davis D. M., Jo Ch. H., Boyson J. E., Strominger J. L., 1999. Human CD16 as a lysis receptor mediating direct natural killer cell cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96: 5640-5644
- Manegold C., van Zandwijk N., Szczesna A., Zatloukal P., Au J. S. K., Blasinska-Morawiec M., Serwatowski P., Krzakowski M., Jassem J., Tan E. H., Benner R. J., Ingrosso A., Meech S. J., Readett E., Thatcher N., 2012. A phase III randomized study of gemcitabine and cisplatin with or without PF-3512676 (TLR9 agonist) as first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology*, 23: 72-77
- Martinez-Pomares L., 2012. The mannose receptor. *Journal of Leukocyte Biology*, 92: 1-10
- Marzo A. L., Kinnear B. F., Lake R. A., Frelinger J. J., Collins E. J., Robinson B. W. S., Scott B., 2000. Tumor-specific CD4⁺ T cells have a major "post-licensing" role in CTL mediated anti-tumor immunity. *The Journal of Immunology*, 165: 6047-6055
- Meinhardt K., Kroeger I., Abendroth A., Müller S., Mackensen A., Ullrich E., 2012. Influence of NK cell magnetic bead isolation methods on phenotype and function of murine NK cells. *Journal of Immunological Methods*, 378: 1-10
- Méndez R., Ruiz-Cabello F., Rodríguez T., del Campo A., Paschen A., Schadendorf D., Garrido F., 2007. Identification of different tumor escape mechanisms in several metastases from a melanoma patient undergoing immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 56: 88-94
- Meyer T., Surber Ch., French L. E., Stockfleth E., 2013. Resiquimod, a topical drug for viral skin lesions and skin cancer. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 22: 149-159
- Mori S., Jewett A., Murakami-Mori K., Cavalcanti M., Bonavida B., 1997. The participation of the Fas-mediated cytotoxic pathway by natural killer cells is tumor-cell-dependent. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 44: 282-290
- Morton D. L., Foshag L. J., Hoon D. S., Nizze J. A., Famatiga E., Wanek L. A., Chang C., Davtayan D. G., Gupta R. K., Elashoff R., 1992. Prolongation of survival in metastatic melanoma after active specific immunotherapy with a new polyvalent melanoma vaccine. *Annals of Surgery*, 216: 463-482
- Naito Y., Saito K., Shiiba K., Ohuchi A., Saigenji K., Nagura H., Ohtani H., 1998. CD8⁺ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Research*, 58: 3491-3494

- Nakamura K., Yoshikawa N., Yamaguchi Y., Kagota S., Shinozuka K., Kunitomo M., 2002. Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. *Life Science*, 70: 791-798
- Neville A. M., Mackay A. M., Westwood J., Turberville C., Laurence J. R., 1975. Human tumour-associated and tumour-specific antigens: some concepts in relation to clinical oncology. *Journal of Clinical Pathology*, 6: 102-112
- Noh H., Hu J., Wang X., Xia X., Satelli A., Li S., 2015. Immune checkpoint regulator PD-L1 expression on tumor cells by contacting CD11b positive bone marrow derived stromal cells. *Cell Communication and Signaling*, 13: 1-12
- Nozawa H., Chiu Ch., Hanahan D., 2006. Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103: 12493-12498
- Old L. J., Clarke D. A., Benacerraf B., 1959. Effect of bacillus calmette-guérin infection on transplanted tumours in the mouse. *Nature*, 184: 291-292
- Osada T., Nagawa H., Takahashi T., Tsuno N. H., Kitayama J., Shibata Y., 2002. Dendritic cells cultured in anti-CD40 antibody-immobilized plates elicit a highly efficient peptide-specific T-cell response. *Journal of Immunotherapy*, 25: 176-184
- Park J., Wysocki R. W., Amoozgar Z., Maiorino L., Fein M. R., Jorns J., Schott N. F., Kinugasa-Katayama Y., Lee Y., Won N. H., Nakasone E. S., Hearn S. A., Küttner V., Qiu J., Almeida A. S., Perurena N., Kessenbrock K., Goldberg M. S., Egeblad M., 2016. Cancer cells induce metastasis-supporting neutrophil extracellular DNA traps. *Science Translational Medicine*, 8: 1-12
- Partecke L. I., Sandler M., Kaeding A., Weiss F. U., Mayerle J., Dummer A., Nguyen T. D., Albers N., Speerforck S., Lerch M. M., Heidecke C. D., von Bernstorff W., Stier A., 2011. A syngeneic orthotopic murine model of pancreatic adenocarcinoma in the C57/BL6 mouse using the Panc02 and 6606PDA cell lines. *European Surgical Research*, 47: 98-107
- Pearl R., 1928. On the pathological relations between cancer and tuberculosis. *Experimental Biology and Medicine*, 26: 73-75
- Peers F. G., Gilman G. A., Linsel C. A., 1976. Dietary aflatoxins and human liver cancer: a study in Swaziland. *International Journal of Cancer*, 17: 167-176
- Peggs K. S., Quezada S. A., Chambers C. A., Korman A. J., Allison J. P., 2009. Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies. *The Journal of Experimental Medicine*, 206: 1717-1725
- Petkowicz C. L. de O., Reicher F., Chanzy H., Taravel F. R., Vuong R., 2001. Linear mannan in the endosperm of *Schizolobium amazonicum*. *Carbohydrate Polymers*, 44: 107-112
- Ribatti D., Nico B., Pezzolo A., Vacca A., Meazza R., Cinti R., Carlini B., Parodi F., Pistoia V., Corrias M. V., 2006. Angiogenesis in a human neuroblastoma xenograft model:

mechanisms and inhibition by tumour-derived interferon- γ . *British Journal of Cancer*, 94: 1845-1852

Robert C., Ribas A., Wolchok J. D., Hodi F. S., Hamid O., Kefford R., Weber J. S., Joshua A. M., Hwu W., Gangadhar T. C., Patnaik A., Dronca R., Zarour H., Joseph R. W., Boasberg P., Chmielowski B., Mateus Ch., Postow M. A., Gergich K., Ellassaiss-Schaap J., Li X. N., Iannone R., Ebbinghaus S. W., Kang S. P., Daud A., 2014. Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial. *The Lancet*, 384: 1109-1117

Ross G. D., Větvička V., 1993. CR3 (CD11b, CD18): a phagocyte and NK cell membrane receptor with multiple ligand specificities and functions. *Clinical and Experimental Immunology*, 92: 181-184

Rouas R., Lewalle P., Ouriaghli F. E., Nowak B., Duvillier H., Martiat P., 2004. Poly (I:C) used for human dendritic cell maturation preserves their ability to secondarily secrete bioactive IL-12. *International Immunology*, 16: 767-773

Rubartelli A., Lotze M. T., 2007. Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends in Immunology*, 28: 429-436

Russell J. H., Ley T. J., 2002. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annual Reviews of Immunology*, 20: 323-370

Ryder J. W., Kleinschmidt-DeMasters B. K., Keller T. S., 1986. Sudden deterioration and death in patients with benign tumors of the third ventricle area. *Journal of Neurosurgery*, 64: 216-223

Salih H. R., Goehlsdorf D., Steinle A., 2006. Release of MICB Molecules by Tumor Cells: Mechanism and Soluble MICB in Sera of Cancer Patients. *Human Immunology*, 67: 188-195

Sasada T., Kimura M., Yoshida Y., Kanai M., Takabayashi A., 2003. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies. *Cancer*, 98: 1089-1099

Sato E., Olson S. H., Ahn J., Bundy B., Nishikawa H., Qian F., Jungbluth A. A., Frosina D., Gnjjatic S., Ambrosone Ch., Kepner J., Odunsi T., Ritter G., Lele S., Chen Y., Ohtani H., Old L. J., Odunsi K., 2005. Intraepithelial CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8⁺/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102: 18538-18543

Scapini P., Lapinet-Vera J. A., Gasperini S., Calzetti F., Bazzoni F., Cassatella M. A., 2000. The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunological Reviews*, 177: 195-203

Seliger B., 2008. Molecular mechanisms of MHC class I abnormalities and APM components in human tumors. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 57: 1719-1726

Schadendorf D., Hodi F. S., Robert C., Weber J. S., Margolin K., Hamid O., Patt D., Chen T., Berman D. M., Wolchok J. D., 2015. Pooled analysis of long-term survival data from

phase II and phase III trials of Ipilimumab in unresectable or metastatic melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, 33: 1889-1894

Shankaran V., Ikeda H., Bruce A. T., White J. M., Swanson P. E., Old L. J., Schreiber R. D., 2001. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*, 410: 1107-1111

Shelley M. D., Wilt T. J., Court J., Coles B., Kynaston H., Manson M. D., 2004. Intravesical bacillus calmette-guérin is superior to mitomycin C in reducing tumour recurrence in high-risk superficial bladder cancer: a meta-analysis of randomized trials. *British Journal of Urology International*, 93: 485-490

Shen L., Smith J. M., Shen Z., Eriksson M., Sentman C., Wira C. R., 2007. Inhibition of human neutrophil degranulation by transforming growth factor- β_1 . *Clinical and Experimental Immunology*, 149: 155-161

Shojaei F., Singh M., Thompson J. D., Ferrara N., 2008. Role of Bv8 in neutrophil-dependent angiogenesis in a transgenic model of cancer progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105: 2640-2645

Schutte M., Hruban R. H., Geradts J., Maynard R., Hilgers W., Rabindran S. K., Moskaluk Ch. A., Hahn S. A., Schwarte-Waldhoff I., Schmiegel W., Baylin S. B., Kern S. E., Herman J. G., 1997. Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer Research*, 57: 3126-3130

Sica A., Larghi P., Mancino A., Rubino L., Porta Ch., Totaro M., G., Rimoldi M., Biswas S. K., Allavena P., Mantovani A., 2008. Macrophage polarization in tumour progression. *Seminars in Cancer Biology*, 18: 349-355

Siegel R. L., Miller K. D., Jemal A., 2015. *Cancer statistic, 2015*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 65: 5-29

Simpson T. R., Li F., Montalvo-Ortiz W., Sepulveda M. A., Bergerhoff K., Arce F., Roddie C., Henry J. Y., Yagita H., Wolchok J. D., Peggs K. S., Ravetch J. V., Allison J. P., Quezada S. A., 2013. Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *The Journal of Experimental Medicine*, 210: 1695-1710

Smyth M. J., Cretney E., Kelly J. M., Westwood J. A., Street S. E. A., Yagita H., Takeda K., van Dommelen S. L. H., Degli-Esposti M. A., Hayakawa Y., 2005. Activation of NK cell cytotoxicity. *Molecular Immunology*, 42: 501-510

Smyth M. J., Swann J., Cretney E., Zerafa N., Yokoyama W. M., Hayakawa Y., 2005. NKG2D function protects the host from tumor initiation. *The Journal of Experimental Medicine*, 202: 583-588

Sondak V. K., Sabel M. S., Mule J. J., 2006. Allogeneic and autologous melanoma vaccines: where have we been and where are we going? *Clinical Cancer Research*, 12: 2337-2341

- Song E., Chen J., Ouyang N., Su F., Wang M., Heemann U., 2001. Soluble Fas ligand released by colon adenocarcinoma cells induces host lymphocyte apoptosis: an active mode of immune evasion in colon cancer. *British Journal of Cancer*, 85: 1047-1054
- Stassen M., Valeva A., Walev I., Schmitt E., 2006. Activation of mast cells by streptolysin O and lipopolysaccharide. *Methods in Molecular Biology*, 315: 393-403
- Svane I. M., Engel A. M., Nielson M., Werdelin O., 1997. Interferon- γ -induced MHC Class I expression and defects in Jak/Stat signalling in methylcholanthrene-induced sarcomas. *Scandinavian Journal of Immunology*, 46: 379-387
- Swart M., Verbrugge I., Beltman J. B., 2016. Combination approaches with immune-checkpoint blockade in cancer therapy. *Frontiers in Oncology*, 6: 1-16
- Sylvester R. J., van der Meijden A. P. M., Lamm D. L., 2002. Intravesical bacillus calmette-guerin reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *Clinical Urology*, 168: 1964-1970
- Takeda K., Hayakawa Y., Smyth M. J., Kayagaki N., Yamaguchi N., Kakuta S., Iwakura Y., Yagita H., Okumura K., 2001. Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nature Medicine*, 7: 94-100
- Takeuchi O., Hoshino K., Kawai T., Sanjo H., Takada H., Ogawa T., Takeda K., Akira S., 1999. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*, 11: 443-451
- Taura M., Fukuda R., Suico M. A., Eguma A., Koga T., Shuto T., Sato T., Morino-Koga S., Kai H., 2010. TLR3 induction by anticancer drugs potentiates poly I:C-induced tumor cell apoptosis. *Cancer Science*, 101: 1610-1617
- Taylor M. E., Conarty J. T., Lennartz M. R., Stahl P. D., Drickamer K., 1990. Primary structure of the mannose receptor contains multiple motifs resembling carbohydrate-recognition domains. *The Journal of Biological Chemistry*, 265: 12156-12162
- Tecchio C., Huber V., Scapini P., Calzetti F., Margotto D., Todeschini G., Pilla L., Martinelli G., Pizzolo G., Rivoltini L., Cassatella M. A., 2004. IFN α -stimulated neutrophils and monocytes release a soluble form of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo-2 ligand) displaying apoptotic activity on leukemic cells. *Blood*, 103: 3837-3844
- Topalian S. L., Sznol M., McDermott D. F., Kluger H. M., Carvajal R. D., Sharfman W. H., Brahmer J. R., Lawrence D. P., Atkins M. B., Powderly J. D., Leming P. D., Lipson E. J., Puzanov I., Smith D. C., Taube J. M., Wigginton J. M., Kollia G. D., Gupta A., Pardoll D. M., Sosman J. A., Hodi F. S., 2014. Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. *Journal of Clinical Oncology*, 32: 1020-1030

Turner J. G., Rakhmievich A. L., Burdelya L., Neal Z., Imboden M., Sondel P. M., Yu H., 2001. Anti-CD40 antibody induces antitumor and antimetastatic effects: the role of NK cells. *The Journal of Immunology*, 166: 89-94

Urban C. F., Reichard U., Brinkmann V., Zychlinsky A., 2006. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cellular Microbiology*, 8: 668-676

Vácová N., 2015. Použití agonistů fagocytárních receptorů pro terapii nádorových onemocnění a studium možnosti zesílení jejich účinků současnou simulací TLR receptorů. Diplomová práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice

van Gisbergen K. P. J. M., Sanchez-Hernandez M., Geijtenbeek T. B. H., van Kooyk Y., 2005. Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. *The Journal of Experimental Medicine*, 201: 1281-1292

Větvička V., Thornton B. P., Ross G. D., 1996. Soluble beta-glucan polysaccharide binding to the lectin site of neutrophil or natural killer cell complement receptor type 3 (CD11b/CD18) generates a primed state of the receptor capable of mediating cytotoxicity of iC3b-opsonized target cells. *Journal of Clinical Investigation*. 98: 50-61

Vivier E., Tomasello E., Baratin M., Walzer T., Ugolini S., 2008. Functions of natural killer cells. *Nature Immunology*, 9: 503-510

Waldmannová E., Caisová V., Fáberová J., Sváčková P., Kovářová M., Sváčková D., Kumžáková Z., Jačková A., Vácová N., Nedbalová P., Horká M., Kopecký J., Ženka J., 2016. The use of zymosan A and bacteria anchored to tumor cells for effective cancer immunotherapy: B16-F10 murine melanoma model. *International Immunopharmacology*, 39: 295-306

Wetering J. K., Golde L. M. G., Batenburg J. J., 2004. Collectins: players of the innate immune system. *European Journal of Immunology*, 271: 1229-1249

Yu J., Heller G., Chewning J., Kim S., Yokoyama W. M., Hsu K. C., 2007. Hierarchy of the human natural killer cell response is determined by class and quantity of inhibitory receptors for self-HLA-B and HLA-C ligands. *The Journal of Immunology*, 179: 5977-5989

Zhou Y., Guo M., Wang X., Li J., Wang Y., Ye L., Dai M., Zhou L., Persidsky Y., Ho W., 2012. TLR3 activation efficiency by high or low molecular mass poly I:C. *Innate Immunity*, 19: 184-192

Zhu J., Paul W. E., 2008. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*, 112: 1557-1569