

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně citovat.

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Václav Janovec

Vývoj vakcín proti prasečímu cirkoviru typu 2
Development of vaccines against porcine circovirus type 2

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: RNDr. Alena Drda Morávková, MBA, Ph.D.
Praha, 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10. 08. 2015

Podpis

Rád bych poděkoval své školitelce **RNDr. Aleně Drda Morávkové, MBA, Ph.D.** za pomoc a vedení této diplomové práce. Dále bych rád poděkoval vedoucí laboratoře **doc. RNDr. Jitce Forstové, CSc.** za možnost umožnění vypracovat tuto práci v její laboratoři. Poděkování patří také **Mgr. Martinovi Fraiberkovi**, který mi poskytnul mnoho cenných rad a dohlížel na mě při přípravě této diplomové práce. Dále bych rád poděkoval **RNDr. Michalovi Šmahelovi, Ph.D.** za poskytnutí cenných rad týkajících se DNA vakcinace a také za provedení imunizací. Za provedení imunizací bych také rád poděkoval **Mgr. Jiřině Suchanové**. Rád bych také poděkoval **Mgr. Zuzaně Zákostelské, Ph.D.** za ochotu provést měření koncentrace cytokinu TNF- α . Dále bych rád poděkoval všem členům laboratoře molekulární virologie za cenné rady a za trpělivost, kterou se mnou při vypracování této diplomové práce měli. V neposlední řadě musím také poděkovat své rodině za podporu po celou dobu mého studia.

Abstrakt

Prasečí cirkovirus typ 2 je jednořetězcový DNA virus patřící do rodu *Circovirus*, který je součástí rodiny *Circoviridae*. Tento virus je asociovaný s mnoha onemocněními u prasat a způsobuje značné ekonomické ztráty v chovech prasat. V této práci byly testovány dva vakcinační přístupy s cílem vytvoření efektivní vakcíny proti PCV2. První přístupem bylo testování DNA vakcín. Pro tento účel byly zkonstruovány expresní plasmidy kódující dvě formy PCV2 Cap proteinu. Byly také připraveny expresní plasmidy kódující myší TNF- α a IFN- α 1 za účelem zesílení imunitní odpovědi pomocí koimunizace těchto plasmidů společně s plasmidem kódujícím antigen. Druhý přístup vychází z předchozího zjištění, že chimerické pentamery VP1 kapsidového proteinu myšího polyomaviru fúzovaného s PCV2 Cap protein jsou schopné indukovat protektivní protilátkovou odpověď cílenou proti PCV2. Tyto chimerické pentamery byly proto dále modifikovány, neboť byla upravena AK sekvence imunodominantního epitopu PCV2 Cap proteinu za účelem zvýšení protektivní protilátkové odpovědi cílené proti PCV2. Schopnost DNA vakcín a chimérických pentametr indukovat protilátkovou odpověď proti PCV2 byla testována na myších. Z výsledků je patrné, že chimerické pentamery indukují mnohem silnější protektivní protilátkovou odpověď cílenou proti PCV2 ve srovnání s DNA vakcínami. Nicméně protektivní protilátková odpověď cílená proti PCV2 pravděpodobně nebyla zvýšena modifikací chimérických pentametr. Role PCV2 Cap imunodominantního epitopu je v případě chimérických pentametr proto dále nejasná.

Klíčová slova: PCV2, prase, vakcíny, chimerické pentamery, protilátková odpověď, imunodominantní epitop

Abstract

Porcine circovirus type 2 is a single stranded DNA virus that belongs to the genus *Circovirus* in the family *Circoviridae*. This virus is associated with many kinds of diseases in pigs and causes significant economic losses in swine-breeding. In this study, two approaches of vaccination were tested in order to develop an effective vaccine against PCV2. The first approach was to test DNA vaccines. For this purpose, eukaryotic expression plasmids encoding two form of PCV2 Cap protein were constructed. The expression plasmids encoding murine TNF- α and IFN- α 1 were also prepared for co-immunization with antigen encoding plasmid to enhance the immune response. The second approach is based on the previous finding that chimeric pentamers of VP1 mouse polyomavirus capsid protein fused with PCV2 can induce protective immunity against PCV2. These chimeric pentamers were further modified by AA substitutions in PCV2 Cap immunodominant epitope in order to enhance protective antibody response directed against PCV2. The chimeric pentamers and DNA vaccines were tested for ability to induce antibody immune response against PCV2 in mice. The results showed that chimeric pentamers are more potent inducers of protective antibody immune response against PCV2 compared to DNA vaccines. However, the protective antibody response against PCV2 induced by modified chimeric pentamers was probably not enhanced. The role of PCV2 Cap immunodominant epitope in the case of chimeric pentamers is therefore unclear.

Key words: PCV2, pig, vaccines, chimeric pentamers, antibody response, immunodominant epitope

Obsah

1 Úvod	11
2 Literární přehled	13
2.1 Prasečí cirkoviry	14
2.2 Prasečí cirkovirus typ 2	14
2.2.1 Základní přehled o PCV2.....	14
2.2.2 Mechanismy šíření viru v prostředí a buněčné typy podporující replikaci PCV2...	16
2.2.3 Typy onemocnění vyvolaných PCV2 a faktory podílející se na rozvoji těchto onemocnění	17
2.2.4 Organizace virového genomu a funkce virových proteinů	19
2.2.5 Životní cyklus PCV2.....	22
2.2.6 PCV2 a imunitní systém hostitele.....	24
2.2.6.1 Interakce PCV2 s vrozenou imunitou	25
2.2.6.2 Interakce PCV2 s adaptivní imunitou	26
2.2.7 Dostupné vakcíny a nové možnosti vakcinace proti PCV2	29
2.2.7.1 Využití DNA vakcín proti PCV2	30
2.2.7.2 Využití rekombinantních vakcín proti PCV2.....	31
3 Cíle práce.....	32
4 Materiál a metody.....	35
4.1. Použité bakteriální kmeny, buněčné linie a virová inokula.....	36
4.2 Použité plasmidy.....	36
4.3 Použité DNA primery	37
4.4. Markery molekulových vah.....	38
4.5. Protilátky	39
4.5.1. Použité primární protilátky	39
4.5.2. Použité sekundární protilátky	40
4.6. Kultivační média.....	40
4.6.1 Bakteriální kultivační média	40
4.6.2 Kultivační média pro savčí buňky	40
4.7. Použitá selekční antibiotika	41
4.8 Sterilizace	41
4.9 Práce s tkáňovými kulturami	41

4.9.1 Pasážování hmyzích buněk Sf9.....	41
4.9.2 Pasážování savčích buněk 3T6 a WOP.....	41
4.9.3 Pasážování savčích buněk PK-15	42
4.9.4 Transfekce savčích buněk pomocí nukleofekce.....	42
4.9.5 Transfekce savčích buněk pomocí kationických polymerů (Turbofect).....	43
4.9.6 Transfekce hmyzích buněk Sf9.....	43
4.9.7 Plaková titrace bakulovirového inokula.....	43
4.9.8 Infekce hmyzích buněk Sf9 bakulovirem	44
4.9.9 Fixace a permeabilizace buněk	44
4.9.10 Detekce proteinů pomocí nepřímé imunofluorescence.....	44
4.10 Práce s bakteriemi.....	45
4.10.1 Kultivace bakteriálních kultur.....	45
4.10.2 Příprava elektrokompetentních buněk pro transformaci	45
4.10.3 Transformace bakterií teplotním šokem	45
4.10.4 Transformace bakterií pomocí elektroporace	46
4.10.5 Tvorba bakteriálních konzerv	46
4.11 Práce s DNA	46
4.11.1 Agarózová elektroforéza	46
4.11.1 Izolace plasmidové DNA a čištění PCR směsí pomocí komerčních kitů	46
4.11.2 Minipreparace plasmidové DNA pomocí alkalické lýze	47
4.11.3 Izolace bakmidové DNA.....	47
4.11.4 Stanovení koncentrace DNA a sekvenace DNA.....	48
4.11.5 Deproteinace DNA pomocí fenolu a chloroformu s isoamylalkoholem	48
4.11.6 Srážení DNA ethanolem	48
4.11.7 Štěpení DNA pomocí restrikčních endonukleáz	49
4.11.8 Defosforylace DNA konců	49
4.11.9 Ligace.....	49
4.11.10 Amplifikace DNA pomocí polymerázové řetězové reakce	50
4.11.11 PCR z bakteriálních kolonií („colony PCR“)	51
4.11.12 Cílená mutageneze plasmidové DNA.....	51
4.12 Práce s proteiny	52
4.12.1 Izolace chimerických pentametr	52
4.12.2 Izolace proteinů obsahujících His-tag.....	53

4.12.3 Stanovení koncentrace proteinů pomocí metody Bradfordové.....	53
4.12.4 Tvorba buněčného lyzátu	53
4.12.5 SDS polyakrylamidová proteinová elektroforéza (SDS-PAAGE)	54
4.12.6 Barvení gelů po SDS-PAAGE	54
4.12.7 Western blot	54
4.12.8 Dot blot	55
4.12.9 Imunodetekce proteinů na nitrocelulóзовé membráně	55
4.12.10 Bakulovirový expresní systém	55
4.13. Imunizace a vyhodnocení protilátkové odpovědi	56
4.13.1 Použité myši	56
4.13.2 Imunizace myši DNA vakcínami	56
4.13.2 Imunizace myši chimérickými pentamerami	57
4.13.3 Detekce protilátek cílených proti PCV2 Cap proteinu pomocí metody ELISA	57
4.13.4 Neutralizační testy	58
5 Výsledky.....	59
5.1 Příprava expresních plasmidů nesoucích různé varianty PCV2 Cap proteinu a plasmidů nesoucích imunostimulační cytokiny pro účely DNA vakcinace.....	60
5.1.1 Konstrukce expresních plasmidů	61
5.1.1.1 Příprava plasmidu pBSC pro inzerci vybraných DNA sekvencí	61
5.1.1.2 Příprava plasmidu pBSC-CAP	62
5.1.1.3 Příprava plasmidu pBSC-IL2ssΔN41Cap.....	63
5.1.1.4 Příprava plasmidu pBSC-IL2ssΔN41Cap-HIS	66
5.1.1.4 Příprava plasmidu pBSC-TNF-α.....	68
5.1.1.4 Příprava plasmidu pBSC- IFNA1	70
5.1.2 Ověření exprese vložených genů <i>in vitro</i>	71
5.1.2.1 Ověření exprese PCV2 Cap proteinu z plasmidu pBSC-CAP	71
5.1.2.2 Ověření exprese sekretované verze PCV2 Cap proteinu z plasmidu pBSC-IL2ssΔN41Cap	72
5.1.2.3 Ověření exprese sekretované verze PCV2 Cap proteinu obsahující C-koncový His-tag.....	73
5.1.2.4 Ověření exprese TNF-α z plasmidu pBSC-TNF-α	74
5.1.2.4 Ověření exprese IFN-α1 z plasmidu pBSC-IFNA1	75
5.2 Příprava a izolace chimerických pentamer VP1 kapsidového proteinu myšího polyomaviru fúzaného s PCV2 Cap proteinem obsahujícím aminokyselinové substituce v imunodominantním epitopu.....	76

5.2.1 Příprava rekombinantního bakuloviru	77
5.2.1.1 Úprava plasmidu pFastBac1-VP1-CAP-HIS pomocí cílené DNA mutagenese...	77
5.2.1.2 Transformace bakteriálních buněk <i>E.coli</i> DH10Bac a izolace rekombinantního bakmidu.....	78
5.2.1.2 Příprava rekombinantního bakuloviru	78
5.2.1.3 Ověření exprese rekombinantního proteinu a zjištění optimální doby exprese	79
5.2.1.4 Izolace chimérických pentamer	80
5.2.1.4 Příprava chimérických pentamer na imunizaci.....	82
5.3 Imunizace myší a vyhodnocení protilátkové odpovědi vyvolané pomocí DNA vakcín a chimérických pentamer	82
5.3.1 Imunizace myší	83
5.3.1.1 Imunizace myší připravenými DNA vakcínami	83
5.3.1.2 Imunizace myší chimérickými pentamerami	83
5.3.1.3 Získání sér z imunizovaných myší.....	84
5.3.2 Analýza protilátkové odpovědi ze získaných sér	84
5.3.2.1 Analýza protilátkové odpovědi po DNA vakcinaci	84
5.3.2.2 Analýza protilátkové odpovědi po vakcinaci chimérickými pentamerami.....	86
5.3.2.3 Detekce schopnosti protilátek neutralizovat PCV2 infekci <i>in vitro</i>	87
6 Diskuze.....	90
6.1 Příprava expresních plasmidů nesoucích různé varianty PCV2 Cap proteinu a plasmidů nesoucích imunostimulační cytokiny pro účely DNA vakcinace.....	91
6.2 Příprava a izolace chimerických pentamer VP1 kapsidového proteinu myšího polyomaviru fúzovaného s PCV2 Cap proteinem obsahujícím aminokyselinové substituce v imunodominantním epitopu.....	93
6.3 Vyhodnocení protilátkové odpovědi vyvolané pomocí DNA vakcín a chimérických pentamer	95
7 Souhrn	100
8 Seznam použité literatury	102

Seznam zkratek

AK	aminokyselina
ATF2	aktivační transkripční faktor 2
BSA	bovinní sérový albumin
cDC	konvenční dendritická buňka
CsCl	cesium chlorid
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA	kyselina ethylendiaminotetraoctová
ER	endoplasmatické retikulum
ERK 1/2	extracelulárním signálem regulovaná kináza
FBS	fetální bovinní sérum
GM-CSF	faktor stimulující růst granulocytů a monocyty
HCV	virus hepatitidy C
Hsp27	protein teplotního šoku 27
Hsp70	protein teplotního šoku 70
IFN- γ	interferon gamma
IL-10	interleukin 10
IL-15	interleukin 15
IL-2	interleukin 2
IL-6	interleukin 6
IL-8	interleukin 8
INF- α	interferon alfa
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid
ISRE	interferonem stimulovaný element
JNK	c-Jun N terminální kináza
kDa	kiloDalton
LB médium	Luria-Bertani médium
M	marker molekulových vah
MCP1	monocyty atrahující protein 1
MHCII	MHC glykoproteiny II. Třídy
MOI	multiplicita infekce
NK	negativní kontrola
NLS	nukleární lokalizační signál

ODN	oligodeoxyribonukleotidy
ORF	otevřený čtecí rámec
p38	mitogeny aktivovaná protein kináza p38
PBMCs	periferní krevní mononukleární buňky
PBS	fosfátový pufr
PCR	polymerázová řetězová reakce
PCV1	prasečí cirkovirus typ 1
PCV2	prasečí cirkovirus typ 2
PCVAD	onemocnění asociovaná s prasečím cirkovirem typu 2
pDC	plasmacytoidní dendritická buňka
PFU	plak formující jednotka
PI3K	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát 3-kináza
PirH2	p53 indukovaný protein s RING-H2 doménou
PK	pozitivní kontrola
PMSF	fenylmetylsulfonyl fluorid
PMWS	syndrom chřadnutí selat po odstavu
PRRSV	prasečí virus způsobující reprodukční a respirační syndrom
RPM	otáček za minutu
RT-PCR	polymerázová řetězová reakce využívající reverzní transkripci
SDS-PAAGE	dodecylsulfát sodný – polyakrilamid gelová elektroforéza
TAE pufr	tris acetátový pufr
TCR	T buněčný receptor
TE pufr	Tris/EDTA pufr
TEMED	N,N,N',N'- tetramethylethylen diamin
TLR4	Toll-like receptor 4
TLR9	Toll-like receptor 9
TNF- α	tumor nekrotizující faktor α
UV	ultrafialové
VLPs	viru podobné částice

1 Úvod

Schopnost virů způsobovat závažná onemocnění u lidí i zvířat je již dlouhou dobu známa. Z tohoto důvodu je i dnes výzkum virů považován za velice důležitý. Hlubší pochopení vztahu hostitele a viru, totiž brzy vedlo k nástupu vakcín, což v některých případech vedlo dokonce k eradikaci některých virů, popřípadě alespoň k potlačení závažných virových onemocnění. Brzy ovšem bylo jasné, že viry lze také využít ve prospěch lidstva, neboť hlubší pochopení životního cyklu některých virů otevřelo možnosti genové terapie nebo možnosti protinádorové léčby. Vakcíny se brzy uplatnily i v případě virů způsobujících onemocnění u hospodářských zvířat, přičemž zejména z ekonomického hlediska mělo v některých případech zavedení veterinární vakcinace značný pozitivní dopad. Studium nových možností vakcinace a vývoj nových vakcín navíc znamenal významný krok vpřed na poli veterinární vakcinace, neboť levnější vakcíny otevřely možnost masivní vakcinace v hospodářských chovech. Jednou z nových možností vakcinace je také modifikace některých snadno izolovatelných virů nebo popřípadě virových proteinů. Tento přístup tak jednoznačně poukazuje na elegantní řešení boje proti některým virovým onemocněním, neboť proti patogennímu viru lze jednoduše využít jiný virus.

V naší laboratoři se také již dlouhou dobu zabýváme možnostmi využití chimérických pentamerů a chimérických virů podobných částic odvozených od VP1 kapsidového proteinu myšího polyomaviru pro vakcinační účely. Hlavním tématem této práce je proto příprava vakcín proti významnému prasečímu virovému patogenu, který je pojmenován prasečí cirkovirus typ 2 (PCV2). Přestože jsou komerční vakcíny dostupné, jejich cena doposud neumožňuje plošnou vakcinaci v České republice. Byla proto navázána spolupráce s firmou Dyntec, která se zabývá distribucí veterinárních vakcín, přičemž hlavním cílem je vytvoření efektivní vakcíny právě proti PCV2. V této práci budou tedy testovány 2 přístupy možnosti vakcinace proti PCV2. Prvním přístupem je možnost využití DNA vakcín, neboť DNA vakcíny představují z ekonomického hlediska velice atraktivní možnost vakcinace hlavně z důvodu nižších nákladů spojených s výrobou těchto vakcín v porovnání s klasickými proteinovými vakcínami. Druhý přístup vychází z již zmíněné zkušenosti naší laboratoře s využitím chimérických pentamerů VP1 kapsidového proteinu myšího polyomaviru. Chimérické pentamery odvozené od VP1 proteinu myšího polyomaviru totiž vykazují mnoho vhodných vlastností, které poukazují na možnost využití těchto pentamerů v případě plošné vakcinace proti PCV2.

2 Literární přehled

2.1 Prasečí cirkoviry

Objev prvního prasečího cirkoviru je datován do roku 1974, kdy byla v permanentní linii prasečích ledvinových buněk PK-15 objevena neznámá virová kontaminanta podobající se morfologicky picornavirům (Tischer et al., 1974). Trvalo však ještě 8 let, než byl nově objevený virus popsán jako nový neobalený virus, jehož kapsida nese jednořetězcový DNA genom a vykazuje ikosahedrální symetrii (Tischer et al., 1982). Od té doby je tento virus zařazován do rodiny *Circoviridae* a je označován jako prasečí circovirus typu 1 (PCV1). Přestože je PCV1 celosvětově rozšířený, doposud není asociován s žádným typem onemocnění u prasat a je považován za nepatogenní.

PCV1 však dlouho nezůstal jediným členem skupiny cirkovirů schopných infikovat prasata. Objev druhého prasečího cirkoviru šel ruku v ruce s rostoucím výskytem nově popsaného onemocnění u prasat, které podle symptomů a času kdy propuká, dostalo název syndrom chřadnutí selat po odstavu (PMWS) (Grau-Roma et al., 2011). Následně byl z tkání nemocných prasat izolován virus, který morfologicky připomínal PCV1. Fakt, že se zřejmě jedná o dalšího zástupce cirkovirů, podpořilo i zjištění, že neznámý virus bylo možné zachytit za pomoci DNA sond připravených z genomu PCV1. Nicméně za pomoci monoklonálních protilátek cílených proti PCV1 bylo zjištěno, že nově izolovaný virus je od PCV1 antigenně značně odlišný (Allan et al., 1998). Další analýzou bylo prokázáno, že virus izolovaný z prasat postižených PMWS vykazuje zhruba 68% homologii s nepatogením PCV1 (Hamel et al., 1998). Nejasnost ohledně neznámého viru trvala až do doby, kdy byla zjištěna zhruba 96% homologie mezi virovými genomy izolovaných z PMWS prasat z Evropy a Severní Ameriky a virus byl pojmenován jako prasečí cirkovirus typ 2 (PCV2) (Meehan et al., 1998). Dnes je již známo, že PCV1 i PCV2 pochází ze společného předchůdce (Olvera et al., 2007).

2.2 Prasečí cirkovirus typ 2

2.2.1 Základní přehled o PCV2

PCV2 je neobalený DNA virus, jehož genom tvoří jednořetězcová DNA o velikosti zhruba 1767 nukleotidů, což tento virus řadí mezi nejmenší savčí DNA viry. Jak již bylo zmíněno, tento virus byl poprvé pojmenován a zařazen do rodu *Circovirus* spadající do rodiny *Circoviridae* v roce 1998 (Meehan et al., 1998). V České republice byl tento virus poprvé popsán v roce 2002 (Celer and Carasova, 2002). Virus byl následně retrospektivně detekován i ze vzorků prasečích tkání archivovaných v 70 letech 20. století (Grierson et al., 2004). Tento fakt otevřel jednu z doposud nezodpovězených otázek týkající se PCV2 a to, proč začal tento

virus způsobovat fatální onemocnění u prasat teprve až od 90 let minulého století. Přestože se již objevilo několik teorií, tuto klíčovou otázku se zatím nepovedlo plně vysvětlit. Díky schopnosti PCV2 způsobovat značné ekonomické ztráty chovatelům prasat se tento virus záhy dostal, na rozdíl od svého nepatogenního příbuzného PCV1, do popředí vědeckého výzkumu a samozřejmě se také stal skvělým terčem pro vývoj vakcín.

Až doposud jsou známy 3 různé genotypové varianty PCV2. Zatímco genotypy 2a a 2b jsou široce rozšířené (Cortey et al., 2011), genotyp 2c byl identifikován pouze v Dánsku z archivovaných vzorků (Dupont et al., 2008). Jednotlivé genotypy lze navíc ještě rozdělit do několika podskupin (Olvera et al., 2007). Vysokou diverzitu v rámci jednotlivých genotypů PCV2 lze zřejmě vysvětlit, jednak vysokou mutační rychlostí PCV2 blížíící se úrovni mutační rychlosti jednořetězcových RNA virů, a také nezávislým vývojem genotypů a i b, které se zhruba před 100 lety vyčlenily ze společného předka (Firth et al., 2009). Diverzitu dále zvyšuje i fakt, že v jednom hostiteli mohou koexistovat oba genotypy PCV2, přičemž několik studií jednoznačně prokázalo, že jednotlivé genotypy mohou mezi sebou rekombinovat, což vede ke vzniku nových typů v rámci jednotlivých genotypových rodin PCV2 (Cai et al., 2012; Hesse et al., 2008).

Také vliv jednotlivých genotypů PCV2 na výskyt a závažnost onemocnění není doposud plně objasněn. Zatímco prvotní studie neprokázaly rozdílný vliv genotypů na indukci onemocnění spjatých s PCV2 (de Boissésón et al., 2004; Larochelle et al., 2003). Některé studie naopak jednoznačně poukázaly na vyšší virulenci genotypu b (Gauger et al., 2011; Grau-Roma et al., 2008). Vyšší virulenci genotypu b potvrdila také zjištění, že nové epidemické vlny PMWS v Kanadě a USA v roce 2005 byly spjaty s výskytem genotypu b, který se v těchto zemích doposud nevyskytoval a predominoval zde až doposud genotyp a (Cheung et al., 2007; Gagnon et al., 2007). Rozdílné výsledky týkající se virulence jednotlivých genotypů lze zřejmě částečně vysvětlit tím, že i jednotlivé izoláty v rámci genotypových rodin vykazují rozdíl ve virulenci (Opriessnig et al., 2008). Novější studie jednotlivých genotypů však ukázala, že svojí roli hraje i přítomnost obou genotypů v jednom jedinci, neboť prasata experimentálně infikována oběma genotypy vykazovala znatelně vyšší závažnost onemocnění vyvolaných PCV2 (Harding et al., 2010). Význam rekombinace mezi jednotlivými genotypy byl navíc umocněn *in vitro* koinfekcí prasečích ledvinových buněk PK-15 pomocí obou genotypů, kdy bylo možné následně vyselektovat dvě rekombinantní mutanty PCV2, které vykazovaly oproti původním izolátům zvýšenou hladinu replikace a také rozdíl v antigenicitě (Guo et al., 2011b). Nicméně přisuzovat vznik onemocnění pouze

genotypovým variantám PCV2 může být značně zkreslující, neboť onemocnění spjatá s PCV2 mají multifaktoriální charakter (Grau-Roma et al., 2011).

Souhrnně lze ovšem říci, že PCV2 vykazuje značnou evoluční plasticitu zejména díky vysoké mutační rychlosti a rekombinací mezi jednotlivými genotypovými variantami, přičemž oba tyto mechanismy mohou značně ovlivnit virulenci a musí být vzaty v potaz při tvorbě vakcín.

2.2.2 Mechanismy šíření viru v prostředí a buněčné typy podporující replikaci PCV2

Vůbec prvním faktorem stojícím na počátku vysoké virulence PCV2 je samotný fakt, že jakožto neobalený virus vykazuje PCV2 značnou stabilitu v okolním prostředí. Bylo prokázáno, že virus je v tekutém médiu značně termostabilní. K jeho účinné neutralizaci dochází až při teplotě 75 °C, přičemž pro úplnou eliminaci infekivity bylo nutné vystavit virus této teplotě po dobu více než 15 minut (O'Dea et al., 2008). Existuje ovšem i studie, kdy po zmrazení a vysušení vykazoval virus infektivitu i po použití teploty dosahující 120 °C, nicméně jestli se tento druh termostability uplatňuje při šíření viru v normálních podmínkách je potřeba dále ověřit (Welch et al., 2006). Značnou úlohu v šíření PCV2 zřejmě hraje také odolnost PCV2 proti desinfekčním prostředkům běžně používaných v chovech prasat (Martin et al., 2008).

PCV2 se šíří v postižených chovech přímým kontaktem mezi zvířaty, přičemž tento typ přenosu se zdá být nejefektivnějším. Velmi významný je také oronasální přenos, neboť virus je vylučován pomocí tělních sekretů, detekován byl také v trusu, mateřském mléce a velice pravděpodobným, i když zřejmě ne zcela častým, je i přenos PCV2 pomocí infikovaného semene (Grau-Roma et al., 2011). V komerčních chovech prasat bylo ovšem možné detekovat PCV2 také v mouše domácí (*Musca domestica*), zda se ovšem jedná o vektor přenášející PCV2 není zatím zcela jasné (Blunt et al., 2011). Experimentálně bylo také prokázáno, že po inokulaci PCV2 do myši BALB/c je virus schopen se částečně replikovat a způsobovat mírné léze, které jsou charakteristické pro infekci u prasat (Kiupel et al., 2001). Význam myši pro šíření PCV2 není ovšem opět dodnes plně objasněn.

Pomocí experimentální inokulace prasat PCV2 a následnou přípravou tkáňových kryořezů ze sleziny a lymfatických uzlin bylo za použití protilátek charakteristických pro určité populace imunitních buněk zjištěno, že PCV2 se vyskytuje zejména v monocytech a makrofázích, přičemž jen velmi malá frakce PCV2 byla zaznamenána v T lymfocytech (Sanchez et al., 2004). Schopnost viru replikovat se v prasečích alveolárních makrofázích byla

prokázána také *in vitro* (Chang et al., 2006b). PCV2 je schopen se dále replikovat v primárních prasečích hepatocytech (Hirai et al., 2006) a v některých typech endotelů, epitelů a ve fibrocytech (Steiner et al., 2008). PCV2 je nicméně také lymfotropní virus, neboť bylo potvrzeno pomocí RT-PCR, že je schopen replikace v prasečích periferních krevních mononukleárních buňkách (PBMCs), přičemž po stimulaci těchto buněk pomocí konkanavalinu A navíc bylo možné detekovat značný nárůst virové replikace i transkripce PCV2 kapsidového proteinu. Následnou analýzou jednotlivých subpopulací PBMCs bylo zjištěno, že destinací pro replikaci viru jsou zejména aktivované T lymfocyty (Yu et al., 2007). Permisivní pro virovou replikaci jsou také B lymfocyty (Lin et al., 2008). Pro pomnožení viru *in vitro* se dodnes nejčastěji používají prasečí ledvinové buňky PK-15, přičemž jednotlivé kmeny PCV2 vykazují rozdílnou kinetiku replikace v této buněčné linii (Meerts et al., 2005a).

2.2.3 Typy onemocnění vyvolaných PCV2 a faktory podílející se na rozvoji těchto onemocnění

PCV2 je schopen vyvolat u prasat řadu onemocnění, které se souhrnně nazývají onemocnění asociované s prasečím cirkovirem typu 2 (PCVAD). Jak již bylo zmíněno, prvním popsáním onemocnění patřící mezi PCVAD je syndrom chřadnutí selat po odstavu (PMWS). Toto onemocnění bylo doposud popsáno ve většině zemí podílejících se významnou měrou na chovu prasat a produkci vepřového masa (obr. 1). Postupem doby byla zjištěna asociace PCV2 u prasat trpících reprodukčními chorobami, dermatitidami, nefritidami a zejména respiračními chorobami a seznam PCVAD byl dále rozšířen. Souhrnně lze říci, že PCVAD představují velice heterogenní skupinu onemocnění (Grau-Roma et al., 2011), přičemž za různorodostí jednotlivých onemocnění zřejmě stojí schopnost viru napadat buňky imunitního systému (Mandrioli et al., 2004), popřípadě manipulovat s imunitní odpovědí hostitele (Kekarainen et al., 2008).



Obrázek 1: Mapa červeně znázorňující místa výskytu onemocnění syndromu chřadnutí selat po odstavu (PMWS). Obrázek převzat od Grau-Roma et al. (2011)

Hlavním hybatelem vzniku PCVAD je samozřejmě přítomnost viru, přičemž jednotlivé kmeny v rámci genotypových rodin PCV2 vykazují rozdílnou úroveň virulence. Nicméně ani tento fakt nedokázal vysvětlit, proč ne každé prase infikované PCV2 vykazuje klinické symptomy typické pro PCV2 (Brunborg et al., 2004). Dnes ji již ovšem známo, že přestože je přítomnost PCV2 hlavním kritériem pro vznik PCVAD, na rozvoj onemocnění má značný vliv mnoho dalších faktorů.

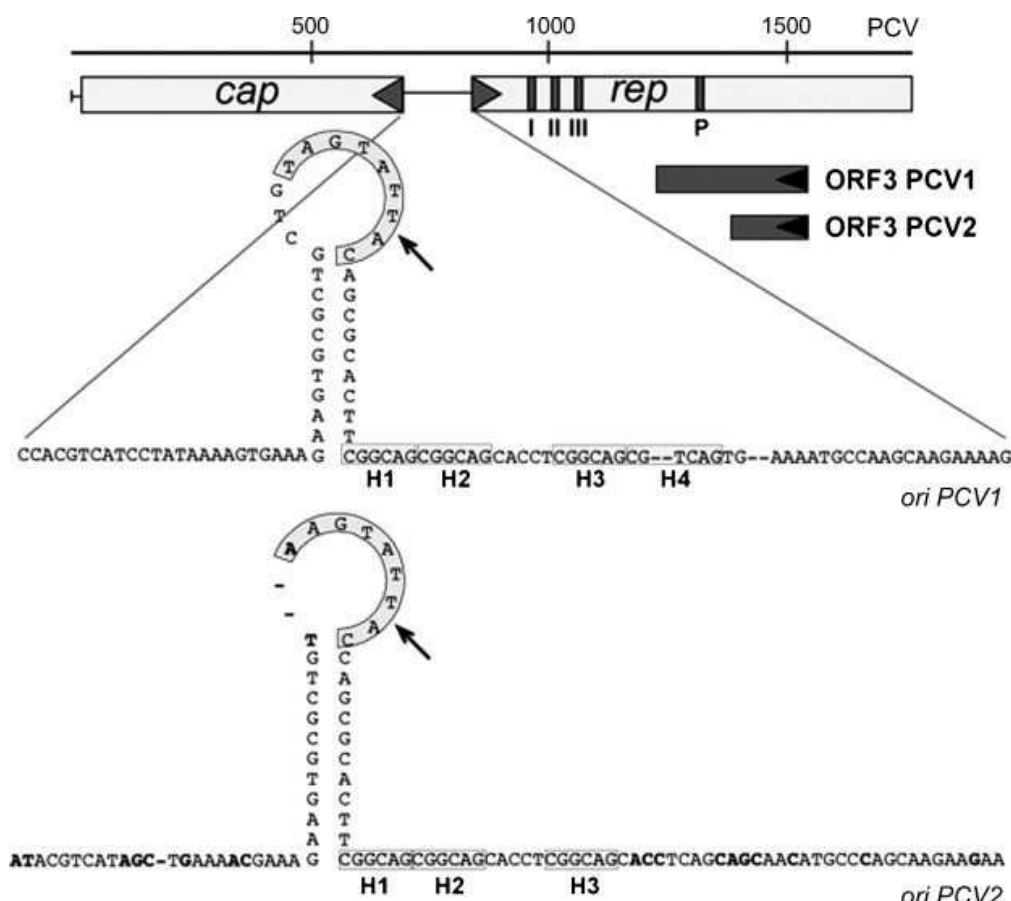
Velice důležitou roli v případě infekce PCV2 hraje samozřejmě imunitní systém, přičemž právě určitý typ ovlivnění imunitního systému infikovaného zvířete představuje významnou složku v rozvoji PCVAD. Prvotní studie totiž odhalily, že prasata vykazující klinické symptomy PCVAD byly kromě přítomnosti PCV2 také velmi často postiženy prasečím virem způsobující reprodukční a respirační syndrom (PRRSV) a velmi časté byly také různé bakteriální patogeny (Pallarés et al., 2002). Vliv přítomnosti dalšího infekčního agens na závažnost PCVAD byla potvrzena pomocí experimentální koinfekce prasat pomocí PCV2 a prasečího parvoviru (PPV), přičemž došlo ke značnému zhoršení patologických symptomů oproti prasatům, které byly infikovány pouze PCV2 (Kennedy et al., 2000). Stejný efekt na zhoršení průběhu PCVAD byl prokázán také pro již zmíněný PRRSV (Rovira et al., 2002). Co se týče bakteriálních patogenů, vliv na rozvoj PCV2 asociovaných onemocnění byl experimentálně ověřen v případě koinfekce PCV2 a *Mykoplasma hyopneumoniae* (Opriessnig et al., 2004). Dále bylo zjištěno, že experimentálně infikovaná prasata, která byla současně imunizována hemocyaninem v nekompletním Freundovo adjuvans nebo byl imunitní systém stimulován pomocí thioglykolátu, vykazovala mnohem závažnější klinické symptomy PMWS než prasata infikovaná pouze PCV2 (Krakowka et al., 2001). Pomocí epidemiologické studie

bylo navíc prokázáno, že vakcinace proti PRRSV je spjata s vyšším výskytem PCVAD, což také poukazuje na možnou asociaci mezi imunostimulací vyvolanou běžnou vakcinací proti některým prasečím patogenům a rozvojem PCVAD (López-Soria et al., 2005). Pomocí cyklosporinu A, který působí imunosupresivně, byla nicméně jednoznačně potvrzena důležitost adaptivní imunity v kontrole PCV2 infekce (Meerts et al., 2005b). Lze tedy usoudit, že stav imunitního systému infikovaného zvířete hraje v případě vzniku PCVAD značnou roli. Interakce imunitního systému s PCV2 je nicméně značně složitější a bude jí věnována celá kapitola (viz 2.2.6).

Další významný faktor představuje také genetická variabilita hostitele, neboť různá prasečí plemena vykazují rozdílnou citlivost k PCVAD. Svoji úlohu má jistě také načasování infekce a určitý časový sled faktorů spolupodílejících se na rozvoji PCVAD a v neposlední řadě zřejmě i rozdílné způsoby v chovu prasat mohou značně modulovat rozvoj PCVAD. Tento konečný výčet jasně poukazuje na fakt, že onemocnění vyvolaná PCV2 vykazují multifaktoriální charakter a výčet faktorů podílejících se na PCVAD nemusí být konečný (Grau-Roma et al., 2011).

2.2.4 Organizace virového genomu a funkce virových proteinů

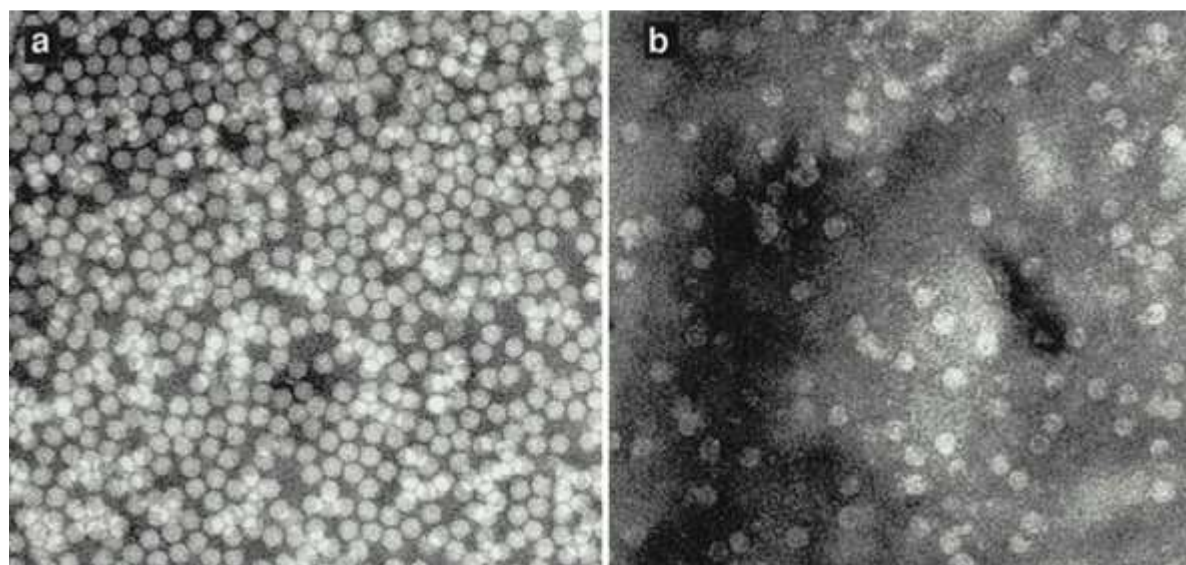
Genomem PCV2 je jednořetězcová kruhová DNA, která v závislosti na virovém podtypu dosahuje velikosti 1766-1768 nukleotidových bází. Přestože bylo v genomu PCV2 predikováno 11 potencionálních otevřených čtecích rámců (ORFs), pouze 4 ORF byly potvrzeny experimentálně. Charakteristickým znakem virového genomu je přítomnost dvou intergenových oblastí, které oddělují dva hlavní virové čtecí rámce (obr. 2). V delší z intergenových oblastí se nachází nukleotidový motiv, který je velmi konzervovaný a to i mezi PCV1 a PCV2 (Hamel et al., 1998). Tento motiv je součástí smyčkovité sekundární struktury, přičemž tato struktura hraje významnou úlohu v replikaci virového genomu (Mankertz et al., 2003).



Obrázek 2: Uspořádání genomu PCV1 a PCV2 s detailem konzervované intergenové oblasti se sekundární vlásenkovitou strukturou. Tato sekundární struktura obsahuje centrální 8 nukleotidovou sekvenci (černá šipka), následovanou hexamerními (CGGCAG) repetitivními sekvencemi (H1-H4), přičemž tyto sekvence hrají důležitou roli v replikaci virového genomu. V sekvenci Rep proteinu jsou dále vyznačeny oblasti konzervované mezi enzymy podílejících se na amplifikaci DNA metodou valivé kružnice (I-III) a také sekvenci domény podílející se na vazbě DNA (P). Převzato od Finsterbusch a Mankertz (2009).

K objasnění funkce proteinu kódovaného otevřeným čtecím rámcem 2 (ORF2) byl využit bakulovirový expresní systém. Jeho pomocí bylo zjištěno, že tento čtecí rámec kóduje protein o velikosti zhruba 30 kDa. Mnohem zajímavějším zjištěním ovšem byl fakt, že tento protein je schopen skládat se do viru podobných částic (VLPs), přičemž po elektronmikroskopické analýze bylo jasné, že tyto VLPs mají velikost 17 nm stejně jako infekční virové částice (obr. 3). Bylo tak potvrzeno, že ORF2 kóduje jediný kapsidový protein PCV2, který byl pojmenován Cap protein (Nawagitgul et al., 2000). Další strukturní analýzou bylo zjištěno, že kapsida PCV2 vykazuje ikosaedrální symetrii a je složena z 60 monomerů kapsidového proteinu (Crowther et al., 2003). Na N-konci PCV2 Cap proteinu je lokalizováno několik bazických aminokyselin zejména argininů a histidinů. Tyto aminokyseliny vytvářejí jaderný lokalizační signál (NLS) a podílejí se na lokalizaci proteinu do jádra. To bylo potvrzeno také tím, že PCV2 Cap protein zkrácený o 41 N-koncových aminokyselin je, na rozdíl od nezkrácené formy, lokalizován v cytoplasmě (Liu et al., 2001). Kapsidový protein

má ale v životním cyklu viru i další funkce. Možné je zapojení Cap proteinu ve virové replikaci, což je podpořeno prokázanou interakcí Cap proteinu s virovým Rep proteinem, který je pro replikaci PCV2 klíčový (Timmusk et al., 2006). Tato interakce by mohla poskytnout další pravděpodobné vysvětlení rozdílné virulence jednotlivých PCV2 subtypů (Cheung and Greenlee, 2011). V neposlední řadě je kapsidový protein terčem imunitní odpovědi hostitele. Vztah PCV2 Cap proteinu a imunitního systému bude vzhledem k významu k vývoji vakcín proti PCV2 probrán v samostatné kapitole (viz 2.2.6).



Obrázek 3: Elektronmikroskopické snímky izolovaných virových partikulí PCV2 (a) a VLPs (b) vyprodukovaných pomocí bakulovirového expresního systému. Převzato a upraveno od Nawagitgul et al., (2000).

Otevřený čtecí rámec 1 (ORF1) kóduje replikační iniciační protein (Rep) a jeho sestřihovou variantu Rep', přičemž oba dva proteiny hrají klíčovou úlohu v životním cyklu PCV2, konkrétně v replikaci virového genomu (Mankertz et al., 2003). Transkripční analýzou bylo dále zjištěno, že alternativním sestřihem z ORF1 vznikají další RNA produkty nazvané Rep3a, Rep3b a Rep3c. Kromě toho jsou z různých promotorů lokalizovaných uvnitř ORF1 transkribovány ještě 3 různé RNA produkty nazvané NS515, NS672 a NS0 (Cheung, 2003a). Přesná funkce těchto minoritních RNA produktů není dosud objasněná, nicméně pomocí cílené mutagenese bylo prokázáno, že pro úspěšnou replikaci virového genomu nejsou tyto minoritní RNA produkty zapotřebí (Cheung, 2003b). Klíčovou úlohu v replikaci ovšem hraje Rep protein, který kromě DNA vazebné aktivity vykazuje také specifickou endonukleázovou aktivitu, která je plně závislá na přítomnosti manganatých nebo hořečnatých kationtů. Rep protein navíc vykazuje i slabou nukleotidyl transferázovou aktivitu (Vega-Rocha et al., 2007). Dále bylo zjištěno, že Rep interaguje s transkripčním regulátorem c-myc a prasečím

intermediárním filamentárním proteinem, který je podobný lidskému synkoilinu. Přesná funkce těchto interakcí ovšem není objasněna (Timmusk et al., 2006).

Významnou úlohu v patogenezi PCV2 hraje také protein kódovaný otevřeným čtecím rámcem 3 (ORF3). Tento virový protein je označen jako ORF3 protein a je převážně lokalizován v jádře infikovaných buněk. Pomocí cílené mutagenese virového genomu, kdy byl změněn iniciační kodon ORF3, bylo zjištěno, že ORF3 protein není nutný pro produkci infekčního viru *in vitro*. ORF3 se ovšem podílí na aktivaci kaspáz 8 a 3 a hraje tak zřejmě úlohu v navození apoptózy v infikovaných buňkách (Liu et al., 2005). Další analýzou ORF3 proteinu bylo zjištěno, že je schopen interagovat s prasečí Pirh2 E3 ubiquitin ligázou, přičemž tato interakce vede ke zvýšení množství transkripčního faktoru p53, což vede ke spuštění apoptózy (Karuppannan et al., 2010; Liu et al., 2007). Role ORF3 proteinu byla také potvrzena *in vivo*, neboť ORF3 deficientní virus vykazoval po inokulaci do prasat značně sníženou patogenicitu (Karuppannan et al., 2009). Poslední objevený protein je pojmenován ORF4 protein, přičemž stejně jako ORF3 protein není potřeba pro úspěšnou virovou replikaci. ORF4 protein zřejmě ovlivňuje funkci ORF3 proteinu, neboť ORF4 deficientní virus vykazuje mnohem vyšší aktivaci kaspáz 3,8 a 9 oproti divokému typu PCV2 (He et al., 2013). Vyšší aktivace kaspáz po infekci PK-15 buněk ORF4 deficientním PCV2 je pravděpodobně způsobena zvýšenou expresí ORF3 proteinu, nicméně mechanismus, jakým ORF4 protein ovlivňuje expresi ORF3 proteinu, není plně objasněn (Gao et al., 2014).

2.2.5 Životní cyklus PCV2

Významnou roli ve vstupu viru hraje kapsidový protein, který obsahuje aminokyselinový motiv schopný vázat potencionální buněčný receptor heparan sulfát. Tento vazebný motiv je navíc velice konzervovaný mezi různými izoláty. Interakce Cap proteinu s povrchovými buněčnými proteoglykany, tak zřejmě představuje prvotní krok pro virový vstup do buňky (Misinzo et al., 2006). O jeho funkci svědčí fakt, že solubilní formy heparinu, heparin sulfátu a chondroitin sulfátu B významně snižují prvotní virovou vazbu na povrch buněk a tím i infektivitu PCV2 *in vitro*. Na monocytické prasečí linii 3D4/31 bylo zjištěno, že po relativně rychlé vazbě na povrch buňky následuje velice pomalá internalizace. Významnou úlohu pro virovou infekci hrají aktinová filamenta a endocytóza závislá na klathrinu, neboť disrupce aktinu a inhibice klathrinové endocytózy vedla ke značné inhibici infekce. Svojí úlohu hraje také pH endosomálního systému, protože za použití inhibitorů acidifikace, chloridu amonného a chloroquine difosfátu, došlo ke značné redukci infekce (Misinzo et al.,

2005). U prasečích ledvinových buněk PK-15 a prasečích epiteliálních linií ovšem inhibitory endosomální acidifikace vykazovaly opačný efekt, neboť docházelo ke značnému zvýšení infekitivity. Navíc bylo zjištěno, že serinové proteázy přispívají k rozbalení viru v endosomálním systému. Vysvětlení rozdílného efektu inhibitorů endosomální acidifikace tak zřejmě lze vysvětlit tím, že různé pH v monocytech a epiteliálních buňkách ovlivňuje rozdílně aktivitu endosomálních proteáz, které se podílejí na rozbalení virové kapsidy a přispívají tak k produktivní infekci (Misinzo et al., 2008). Na rozdílnou cestu infekce v různých buněčných typech poukazuje i zjištění, že PCV2 využívá pro infekci epiteliálních buněk, na rozdíl od monocytů, endocytózu nezávislou na klathrinu. Nicméně centrální roli pro infekční vstup viru opět představují aktinová filamenta a pravděpodobně také malé GTPázy (Misinzo et al., 2009).

Jak již bylo zmíněno endosomální systém a serinové proteázy se významně podílejí na rozvolnění virové kapsidy, nicméně přesný mechanismus dopravy virového genomu do jádra není doposud plně objasněn. Prvním krokem po dopravě virového genomu do jádra je konverze jednořetězcové virové DNA na dvouřetězcovou formu, přičemž tuto konverzi zprostředkovávají buněčné enzymy (Tischer et al., 1987). Přestože délka replikačního cyklu se značně liší v závislosti na buněčném typu, obecně lze říci, že v časně fázi infekce nastává exprese Cap proteinu a dvou forem replikačního proteinu, přičemž právě Cap protein je prvně detekovatelný virový protein po infekci. Následuje replikace virového genomu, přičemž k uvolňování virového potomstva po infekci prasečích ledvinových buněk PK-15 dochází zhruba po 36 hodinách po infekci (Meerts et al., 2005a). Replikace virového genomu je závislá na buněčných enzymech a virus tak vyžaduje S fázi buněčného cyklu (Tischer et al., 1987). Klíčové pro úspěšnou virovou replikaci jsou proteiny Rep a Rep', které rozeznávají replikační počátek lokalizovaný v delší intergenové oblasti mezi ORF1 a ORF2. Replikační počátek je tvořen vlásenkovitou strukturou s centrální 8 nukleotidovou sekvencí, následovanou hexamerními (CGGCAG) a pentamerními (CACCT) repetitivními sekvencemi (obr. 2) (Mankertz et al., 2003). Model replikace virového genomu byl navržen pro PCV1, kdy Rep a Rep' společně rozeznávají replikační počátek, přičemž vazba obou proteinů indukuje DNA nestabilitu v místě počátku s následným štěpením v místě centrální 8 nukleotidové sekvence, přičemž volný 3' konec je využit jako primer a virový genom je replikován mechanismem valivé kružnice (Cheung, 2004). Po úspěšné virové replikaci probíhá zabalení jednořetězcové DNA do virových kapsid, nicméně přesný mechanismus zabalení virového genomu není plně objasněn. V pozdní fázi virového cyklu zřejmě hraje

úlohu i ORF3 protein, který indukuje apoptózu a přispívá tak k uvolnění virového potomstva (Liu et al., 2005).

PCV2 je navíc schopen využít některé buněčné procesy a ovlivňovat důležité signální dráhy, které mohou značně podpořit virový replikační cyklus. Jedním z příkladů je využití autofágie, neboť bylo zjištěno, že po infekci prasečích ledvinových buněk PK-15 dochází k hromadění autofagosomů v infikovaných buňkách, přičemž indukce autofágie vede ke zvýšení produkce Cap proteinu a také ke zvýšení produkce virového potomstva. Přesný mechanismus jakým dokáže PCV2 využít autofagii ve svůj prospěch nicméně vyžaduje další studium (Zhu et al., 2012). PCV2 dále aktivuje PI3K/Akt signální dráhu, přičemž pro aktivaci není vyžadována aktivní replikace ani transkripce virového genomu. PI3K/Akt signální dráha pravděpodobně hraje značnou úlohu v časných fázích infekce, kdy negativně ovlivňuje apoptózu (Wei et al., 2012). PCV2 dále aktivuje JNK a p38 kinázy, přičemž tato aktivace vede k fosforylaci transkripčních faktorů c-Fos a ATF-2. Aktivace těchto MAP kináz vyžaduje virovou replikaci nebo popřípadě transkripci, neboť při použití UV-ozářeného viru nedošlo k aktivaci p38 a JNK. Za použití inhibitorů p38 a JNK bylo dále zjištěno, že aktivace těchto kináz vede k zesílení virové transkripce a ke zvýšení produkce virového potomstva (Wei et al., 2009). PCV2 je schopen aktivovat také ERK1/2, přičemž stejně jako v případě aktivace JNK a p38 dochází ke stimulaci virového replikačního cyklu (Wei and Liu, 2009). Významnou roli zřejmě hrají také některé chaperony, neboť buňky vystavené teplotnímu šoku vykazují značně zvýšenou produkci PCV2 a stoupá také množství infikovaných buněk. Další analýzou bylo zjištěno, že Cap protein je schopen interagovat s Hsp70, přičemž tato interakce pravděpodobně pozitivně ovlivňuje virovou transkripci, neboť za použití siRNA cílené proti Hsp70 dochází ke značnému snížení transkripce Cap proteinu. Naopak zvýšení exprese Hsp70 za použití rekombinantního adenoviru vedlo ke značnému zvýšení exprese Cap proteinu a také ke zvýšení produkce virového potomstva (Jie Liu et al., 2013). Podobný stimulační efekt na životní cyklus PCV2 byl popsán také pro další chaperon Hsp27 (Liu et al., 2014).

2.2.6 PCV2 a imunitní systém hostitele

Obecně lze říci, že jednou z důležitých rolí imunitního systému, který lze rozdělit ještě na vrozenou a adaptivní složku, je obrana proti mnoha patogenům jakou jsou bakterie, mnohobuněční parazité a v neposlední řadě také viry. I prasečí imunitní systém je schopen v mnoha případech rozeznat infekci PCV2 a úspěšně se s ní vypořádat, přičemž zejména aktivace buněčně zprostředkovaných imunitních mechanismů a tvorba neutralizačních

protilátek představuje důležitý předpoklad pro zvládnutí PCV2 infekce bez vedlejších patologií (Meerts et al., 2005b). Nicméně viry si osvojily mnoho mechanismů úniku před imunitním systémem. Také PCV2, ačkoliv patří mezi vůbec nejmenší DNA viry, je schopen značně ovlivnit vrozenou i adaptivní složku imunitního systému svého hostitele. Další studium interakcí PCV2 a imunitního systému by tak v budoucnu mohlo poodhalit některé nevysvětlené otázky týkající se zejména rozvoje PCVAD a v neposlední řadě by hlubší pochopení vztahu PCV2 s imunitou mohlo vést k rozvoji nových typů vakcín.

2.2.6.1 Interakce PCV2 s vrozenou imunitou

Jednou z charakteristických znaků PCVAD je přítomnost granulomatózního zánětu v mnoha typech tkání (Segalés, 2012). Tento fakt by mohl být vysvětlen schopností PCV2 aktivovat makrofágy. Alveolární makrofágy jsou schopny rozeznat virus a následně produkují značné množství prozánětlivého tumor nekrotizujícího faktoru alfa (TNF- α) a také některé chemokiny jako interleukin 8 (IL-8) a monocyty atrahující protein 1 (MCP1), které se dále podílejí na rozvoji zánětu. Zajímavostí ovšem je fakt, že PCV2 snižuje transientně proces fagocytózy a také značně snižuje produkci kyslíkových radikálů, čímž snižuje mikrobicidní schopnost makrofágů. To může mít za následek vyšší citlivost PCV2 infikovaných prasat k sekundárním bakteriálním infekcím (Chang et al., 2006a). PCV2 je také schopen aktivovat NF- κ B v prasečích ledvinových buňkách PK-15, přičemž aktivace toho transkripčního faktoru zvyšuje produkci virového potomstva (Wei et al., 2008). Na rozdíl od makrofágů navíc po infekci PK-15 buněk vzrůstá produkce kyslíkových radikálů, což opět podporuje replikační cyklus PCV2 (Chen et al., 2012). Není ovšem plně objasněno, jestli aktivace NF- κ B v PK-15 buněčné linii vede k produkci prozánětlivých cytokinů, nicméně nelze vyloučit příspěvek dalších buněčných typů na rozvoji imunopatologických zánětů typických pro PCVAD.

Velice zajímavá je také interakce PCV2 s dendritickými buňkami, neboť bylo zjištěno, že PCV2 je internalizován konvenčními dendritickými buňkami (cDC) i plasmacytoidními dendritickými buňkami (pDC), přičemž nedochází k virové replikaci. Internalizace PCV2 přitom nevede k maturaci dendritických buněk. Přítomnost PCV2 ovšem negativně ovlivňuje maturaci dendritických buněk vyvolanou pomocí oligodeoxynukleotidů (ODN) obsahujících stimulační CpG sekvence. Navíc bylo zjištěno, že značné množství PCV2 není v konvenčních dendritických buňkách degradováno, neboť i 5 dní po infekci bylo možné vyizolovat infekční virus. Dendritické buňky by se tak mohly podílet na přenosu viru v hostiteli, nicméně *in vitro* nebyl přenos z dendritických buněk do T lymfocytů prokázán a role dendritických buněk v šíření infekce je proto nejasná (Vincent et al., 2003, 2005). Při použití ODN odvozených ze

sekvence virového genomu bylo zjištěno, že některé ODN jsou schopny inhibovat produkci interferonu alfa (IFN- α) vyvolanou imunostimulačními ODN v prasečích periferních krevních mononukleárních buňkách (PBMCs) (Hasslung et al., 2003). Schopnost inhibice těchto PCV2 derivovaných ODN přitom závisí na schopnosti vytvářet sekundární vlásenkovitou strukturu (Wikström et al., 2007). PCV2 je také schopen v pDC inhibovat ODN zprostředkovanou produkci IFN- α , přičemž dochází také k poklesu produkce interleukinu 6 (IL-6) a TNF- α . Přítomnost PCV2 v dendritických buňkách tak zřejmě významně ovlivňuje Toll-like receptor 9 (TLR9) mediovanou produkci cytokinů (Vincent et al., 2007). PCV2 v dendritických buňkách ovlivňuje také reorganizaci aktinového cytoskeletu, čímž ovlivňuje endocytické procesy, neboť bylo prokázáno, že dendritické buňky v přítomnosti virové DNA vykazovaly sníženou internalizaci PCV2 VLPs (Balmelli et al., 2011). Obecně lze tedy říci, že schopnost PCV2 ovlivňovat profesionální antigen prezentující buňky může významně přispívat ke vzniku PCVAD.

Životní cyklus PCV2 je také značně modulován cytokinovým prostředím, neboť v přítomnosti IFN- α dochází po infekci PK-15 buněk k významnému nárůstu produkce virového potomstva (Meerts et al., 2005c). Signalizace vyvolaná IFN- α tak zřejmě zesiluje virovou replikaci, neboť PCV2 obsahuje v oblasti Rep promotoru sekvenci ISRE (Gu et al., 2012b; Ramamoorthy et al., 2009). Dále bylo zjištěno, že izolované imunitní buňky z prasat trpících PCVAD vykazují daleko vyšší produkci interleukinu-10 (IL-10), který významně ovlivňuje adaptivní imunitu. Zvýšená produkce IL-10 tak může dále přispívat k patologiím (Crisci et al., 2010). V neposlední řadě mohou změny na úrovni vrozené imunity významně ovlivnit také adaptivní imunitu, což může přispět k virovému úniku před dohledem imunitního systému a vést k rozvoji patologických onemocnění.

2.2.6.2 Interakce PCV2 s adaptivní imunitou

Adaptivní imunita se významně podílí na kontrole PCV2 infekce, což bylo experimentálně potvrzeno navozením imunosuprese za pomoci cyklosporinu A u PCV2 infikovaných prasat, neboť utlumení adaptivní imunity silně korelovalo s vyšším množstvím viru (Meerts et al., 2005b). Při experimentální infekci a následné izolaci PBMCs, byla metodou ELISPOT detekována produkce interferonu gamma (IFN- γ) až 21 dní po infekci PCV2 (Fort et al., 2009). Pozdní indukce buněčné imunity byla následně potvrzena další studií. Navíc bylo zjištěno, že CD4⁺ a CD8⁺ pozitivní buňky jsou hlavními producenty IFN- γ . Pomocné T lymfocyty a cytotoxické T lymfocyty tak zřejmě hrají důležitou roli v kontrole PCV2 infekce a pozdní vývoj buněčné imunity je pravděpodobně způsoben pomalou replikací

PCV2 v hostiteli (Steiner et al., 2009). Dále bylo zjištěno, že intenzita buněčné odpovědi se značně liší mezi různými genotypy PCV2 a také fakt, že mimo CAP proteinu je buněčná imunita zaměřená také proti Rep proteinu (Fort et al., 2010).

PCV2 je schopen ovlivnit také buněčnou imunitu, neboť charakteristickým znakem PCVAD je deplece T i B lymfocytů (Segalés, 2012), přičemž schopnost PCV2 způsobit úbytek T i B lymfocytů se stala na dlouhou dobu předmětem debat a ani dnes není zřejmě tento jev plně objasněn. Jak již bylo zmíněno T i B lymfocyty podporují virovou replikaci PCV2 (Lin et al., 2008; Yu et al., 2007). Pomocí imunohistochemie bylo zjištěno, že B lymfocyty v lymfoidních tkáních postižených prasat vykazují zvýšené známky apoptózy (Shibahara et al., 2000). Přímé působení viru na depleci T lymfocytů prokázala také studie, kde byla využita lymfoblastoidní buněčná linie L35, kdy po infekci PCV2 došlo k nárůstu apoptózy (Rodríguez-Cariño et al., 2011). Některé další imunohistochemické studie ovšem nenalezly zvýšené znaky apoptózy B a T lymfocytů v lymfatických tkáních a efekt deplece byl připsán spíše snížené proliferaci T i B lymfocytů (Mandrioli et al., 2004; Resendes et al., 2004). Při použití techniky tkáňové microarray, kdy bylo analyzováno více vzorků z postižených prasat, bylo dále zjištěno, že PCV2 v uzlinách pravděpodobně přímo indukuje apoptózu B lymfocytů, nicméně úbytek T lymfocytů je pravděpodobně způsoben nepřímo, neboť dochází ke změně uspořádání lymfatické uzliny (Lin et al., 2011). Schopnost PCV2 indukovat apoptózu v infikovaných lymfocytech byla nicméně potvrzena *in vitro* (Lv et al., 2012), což poukazuje na možnost zapojení přímých i nepřímých mechanismů. Jeden z nepřímých efektů působení PCV2 byl popsán také v případě experimentální koinfekce prasat pomocí PCV2 a PRRSV. Slezinné makrofágy prasat koinfikovaných oběma viry vykazovali značně zvýšenou expresi Fas ligandu. Následná společná kultivace makrofágů a vyizolovaných T lymfocytů vedla k nárůstu počtu apoptických T lymfocytů, přičemž ty vykazovali zvýšenou expresi Fas. Interakce Fas-Fas ligand tak zřejmě představuje další možnost vysvětlení úbytku T lymfocytů a dále poukazuje na nutnost dalších kofaktorů na rozvoj PCVAD, neboť tento nepřímý efekt byl významný pouze v případě koinfekce dvou virů (Chang et al., 2007).

Důležitá je také role protilátkové odpovědi, přičemž neutralizační protilátky cílené proti kapsidovému proteinu se významně podílejí na kontrole PCV2 infekce. Prasata vykazující onemocnění mají nízké titry neutralizačních protilátek a také množství neutralizačních protilátek inverzně koreluje s množstvím viru (Fort et al., 2007). Celkový titr protilátek se ovšem neliší mezi prasaty vykazujícími PCVAD a mezi prasaty, které prodělaly subklinickou infekci (Meerts et al., 2006). Přípravou monoklonálních protilátek proti Cap

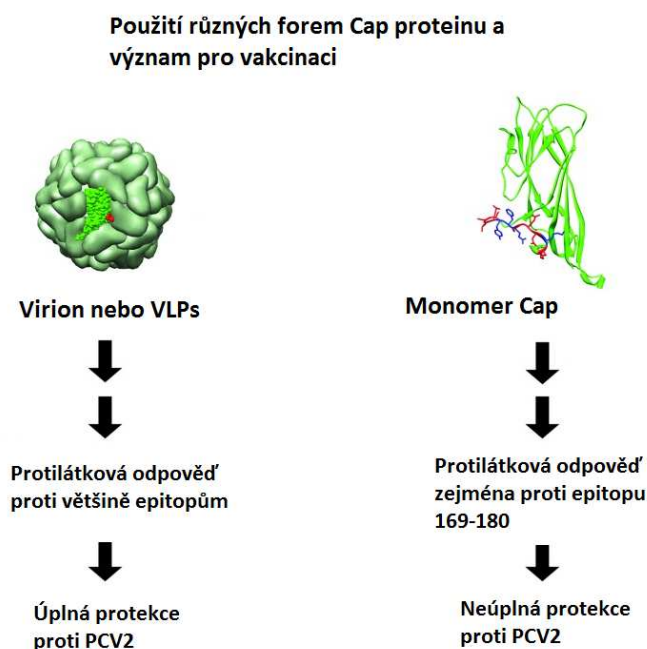
proteinu bylo zjištěno, že Cap protein obsahuje tři hlavní oblasti (obr. 4), proti kterým je humorální odpověď zaměřena. Tyto oblasti obsahují také neutralizační epitopy, neboť některé monoklonální protilátky vykazovaly schopnost inhibovat virovou infekci (Lekcharoensuk et al., 2004). Další mapování protilátkové odpovědi proti Cap proteinu pomocí techniky PEPSCAN a za pomoci fágového displeje odhalila také přítomnost několika lineárních epitopů ležících mimo 3 hlavní antigenní oblasti popsané Lekcharoensukovou (Ge et al., 2013; Shang et al., 2009). Dále bylo zjištěno, že mutace jediné aminokyseliny může vést ke změně konformace neutralizačního epitopu, což bylo prokázáno pomocí monoklonální protilátky s potvrzenou neutralizační aktivitou. Aminokyseliny lokalizované na pozici 59 a 60 Cap proteinu se tak zřejmě významně podílejí na konformaci důležitého neutralizačního epitopu (Jianbo Liu et al., 2013). Na konformaci neutralizačních epitopů se dále podílejí aminokyseliny lokalizované na pozici 131,151,190 a pravděpodobně také poslední tři C-koncové aminokyseliny (Saha et al., 2012; Shang et al., 2009).



Obrázek 4: Schéma AK sekvence PCV2 Cap proteinu s vyznačenými (černě) oblastmi, proti kterým je zaměřena protilátková odpověď. Převzato od Lakcharoensuk et al. (2004).

Zajímavé zjištění přineslo srovnání protilátkové odpovědi mezi několika skupinami experimentálně infikovaných prasat. Bylo zjištěno, že zejména PCVAD pozitivní prasata přednostně vytvářejí protilátkovou odpověď zaměřenou proti jednomu epitopu, který je lokalizován na pozici 169-180, přičemž pomocí mutagenese bylo zjištěno, že tyrosin na pozici 173, fenylalanin na pozici 174, glutamin na pozici 175 a lysin na pozici 179 představují kritické aminokyseliny pro konformaci tohoto epitopu. Tento epitop tak zřejmě slouží jako „návnada“ pro protilátkovou odpověď, neboť prasata vytvářející přednostně protilátky proti tomuto epitopu měly významně nižší titry neutralizačních protilátek (Trible et al., 2011). Následně bylo zjištěno, že epitop 169-180 nemůže být protektivní, neboť většina aminokyselin vytvářející tento epitop je lokalizována uvnitř virové kapsidy a pravděpodobně v případě intaktního virionu není tento epitop přístupný pro protilátky. Tento epitop je nicméně velice důležitý z hlediska vakcinace, neboť prasata vakcinovaná monomery Cap proteinu vytvářela silnou protilátkovou odpověď proti epitopu 169-180, což následně vedlo ke zvýšené virémii po experimentální infekci. Naopak prasata vakcinovaná pomocí VLPs, kde

zřejmě tento epitop není dostupný, vykazovala po experimentální infekci mnohem vyšší úroveň protekce. Na základě toho zjištění byl vytvořen model (obr. 5), který předpokládá imunodominanci epitopu 169-180, přičemž právě schopnost toho epitopu v odvedení protilátkové odpovědi od protektivních epitopů musí být vzata v potaz při vývoji vakcín (Trible et al., 2012).



Obrázek 5: Význam využití různých forem PCV2 Cap proteinu a možný důsledek pro vakcinaci. Převzato a upraveno od Trible et al. (2012).

2.2.7 Dostupné vakcíny a nové možnosti vakcinace proti PCV2

Význam vakcinace byl v minulosti mnohokrát demonstrován na lidských patogenech, neboť právě vývoj vakcín vedl ke snížení mnoha častých onemocnění a v několika případech i k eradikaci některých lidských patogenů. Zavedení vakcinace neovlivnilo pouze zlepšení veřejného zdraví, ale mělo také značný ekonomický význam. Přestože dodnes bylo vyvinuto mnoho typů vakcín, proti některým patogenům nebyla doposud vytvořena efektivní vakcína a výzkum a vývoj nových vakcín je proto nezbytný i v budoucnu (Nabel, 2013). Také v případě PCV2 bylo vytvořeno několik typů komerčně dostupných vakcín. Tyto vakcíny jsou většinou založeny na expresi Cap proteinu v bakulovirovém expresním systému, nicméně využívá se také inaktivovaný virus a chimerický virus založený na nepatogenním PCV1, který má otevřený čtecí rámec pro kapsidový protein nahrazen kapsidovým proteinem PCV2 (Beach and Meng, 2012). Přestože bylo experimentálně testováno mnoho možností využití nových

typů vakcín proti PCV2, v této práci bude probírána pouze možnost využití rekombinantních podjednotkových vakcín a možnost využití DNA vakcinace.

2.2.7.1 Využití DNA vakcín proti PCV2

Vývoj DNA vakcín započal od 90. let minulého století, kdy bylo zjištěno, že doprava expresního plasmidu kódujícího specifický antigen do živého zvířete vyvolává specifickou imunitní odpověď. Vysvětlením tohoto zjištění je fakt, že expresní plasmid je schopen vstoupit do jádra, kde následně započne exprese vloženého proteinu, který je dále prezentován imunitnímu systému pomocí profesionálních antigen prezentujících buněk. Schopnost DNA vakcín indukovat buněčnou i protilátkovou je pro neživé vakcíny unikátní a dává DNA vakcínám výhodné vlastnosti, především vysokou bezpečnost. Širší jsou i možnosti jejich využití, testuje se například jejich nádorově terapeutický potenciál. Další nesporné výhody DNA vakcinace jsou odvozeny od jejich přípravy, neboť expresní plasmidy mohou být rychle izolovány ve velkém množství a DNA obecně vykazuje mnohem vyšší stabilitu a je mnohem lépe skladována než proteinové a živé vakcíny. Nicméně DNA vakcíny nedosahují takové úrovně indukce imunitní odpovědi, neboť například protilátková odpověď vyvolaná DNA vakcinací je v mnoha případech mnohem slabší než za použití klasických neživých proteinových vakcín. V posledních letech se ovšem objevilo několik typů optimalizace, které vedly ke zvýšení imunogenicity (Kutzler and Weiner, 2008).

Možnost využití DNA vakcín byla studována také v případě PCV2, neboť bylo zjištěno, že eukaryotní expresní plasmid nesoucí sekvenci Cap proteinu je schopen, po dopravě toho plasmidu do myši pomocí biolistické metody, indukovat protilátkovou odpověď zaměřenou proti Cap proteinu (Kamstrup et al., 2004). Dále byla testována možnost různého cílení Cap proteinu, kdy bylo zjištěno, že Cap protein zkrácený o 41 N-terminálních aminokyselin a fúzovaný se signální sekvencí směřující tento protein do sekreční dráhy vyvolává mnohem vyšší protilátkovou odpověď, přičemž vzrůstá také titer neutralizačních protilátek (Fan et al., 2008). Byla použita také koimunizace, kdy společně s expresním plasmidem nesoucím sekvenci Cap proteinu byl použit také plasmid kódující Rep protein nebo kódující ORF3 protein. Koimunizace nicméně vedla spíše ke snížení imunitní odpovědi zaměřené proti Cap proteinu (Shen et al., 2009). Naopak koimunizace expresního plasmidu kódujícího kapsidový protein a plasmidu nesoucí interleukin 15 (IL-15) vedla k významnému zesílení buněčné i protilátkové odpovědi proti Cap proteinu (Dong et al., 2013). Testována byla také možnost exprese Cap proteinu spolu s proteinem ovlivňujícím imunitní odpověď, přičemž bylo demonstrováno, že plasmidy kódující Cap protein spolu s dalším proteinem

mohou významně zvýšit imunitní odpověď. Tento efekt byl v případě DNA vakcinace proti PCV2 potvrzen pro protein teplotního šoku 70 (Hsp70), interleukin 2 (IL-2) nebo také pro ubiquitin (Fu et al., 2013a, 2013b). Experimentální data tak jasně poukazují na možnost využití DNA vakcín v případě PCV2, nicméně není zcela jasné, jestli bude metodika DNA vakcinace využitelná komerčně jako standardní vakcinační postup proti PCV2.

2.2.7.2 Využití rekombinantních vakcín proti PCV2

Jak již bylo zmíněno, mnoho komerčních vakcín je založeno na produkci Cap proteinu bakulovirovým expresním systémem, protože je obtížné produkovat Cap v bakteriálním expresním systému (Marcekova et al., 2009; Wu et al., 2008). Podle práce Tribble et al. (2011) nicméně bylo demonstrováno, že mnohem vhodnější pro vakcinaci jsou VLPs. Přestože mnoho autorů využilo pro produkci VLPs bakulovirový systém a úspěšně popsali formování VLPs, z elektronmikroskopických snímků je patrné, že množství VLPs je nízké (Misinzo et al., 2005; Nawagitgul et al., 2000), což bylo také potvrzeno v laboratoři molekulární virologie UK v Praze (M.Fraiberk, osobní komunikace).

Jedna z možností vytvoření nové vakcíny je fúze PCV2 Cap proteinu s VP1 kapsidovým proteinem myšího polyomaviru, neboť produkce toho chimérického proteinu v bakulovirovém expresním systému vede k produkci pentameru, které lze snadno vyizolovat a navíc tyto pentamery jsou schopné vyvolat účinnou protilátkovou odpověď po imunizaci myší, přičemž dochází také k tvorbě neutralizačních protilátek (Fraiberk et al., nepublikované výsledky). Nicméně lze předpokládat, že imunodominantní epitop popsáný v práci Tribble et al. (2011) je zřejmě v případě chimerické pentamery dostupný pro protilátkovou odpověď a může tedy odvádět protilátkovou odpověď od důležitých neutralizačních epitopů. Nicméně aminokyseliny důležité pro správnou konformaci tohoto epitopu jsou dobře definovány (Tribble et al., 2011), což naskýtá možnost přípravy chimerických pentamer s aminokyselinovými substitucemi v imunodominantním epitopu a také možnost otestování vlivu těchto AK substitucí na úroveň protektivní protilátkové imunity.

3 Cíle práce

Hlavním cílem naší laboratoře je vytvořit efektivní vakcínu proti PCV2 dostupnou pro komerční využití. Jednou z možností je přitom využití DNA vakcinace. Byla proto navázána spolupráce s RNDr. Michalem Šmahelem, Ph.D. z Ústavu hematologie a krevní transfúze, kde se DNA vakcinací zabývají. Pro účely DNA vakcinace byl získán vhodný eukaryotický expresní plasmid pBSC. Prvním krokem bylo vložení vhodného antigenu do tohoto plasmidu. Za účelem posílení imunitní odpovědi byly do plasmidu pBSC vloženy také geny kódující imunostimulační cytokiny. Prvním cílem této práce tedy bylo:

1) Připravit expresní plasmidy kódující různé varianty PCV2 Cap proteinu a expresní plasmidy kódující imunostimulační cytokiny pro účely DNA vakcinace

Tento cíl konkrétně zahrnuje:

- a) Vložení neupravené DNA sekvence PCV2 Cap proteinu do plasmidu pBSC a DNA sekvence PCV2 Cap proteinu zkráceného o 41-N terminálních AK s přídanou DNA sekvencí kódující N-koncovou signální sekvencí IL-2
- b) Vložení DNA sekvencí kódujících cytokiny TNF- α a IFN- α 1 do plasmidu pBSC
- c) Ověření exprese vložených genů *in vitro*

Další alternativou v případě vakcinace proti PCV2 by mohly být chimerické pentamery odvozené od VP1 kapsidového proteinu myšího polyomaviru, přičemž k c-konci VP1 je přidán PCV2 Cap protein. Tyto pentamery byly již dříve připraveny Mgr. Martinem Fraiberkem. Za účelem zlepšení protektivní protilátkové odpovědi byly tyto chimerické pentamery dále modifikovány, neboť byla upravena AK sekvence imunodominantního epitopu, který je lokalizován na pozici 169-180 PCV2 Cap proteinu. Druhým cílem tedy bylo:

2) Připravit chimerické pentametry VP1 kapsidového proteinu myšího polyomaviru fúzaného s PCV2 Cap proteinem obsahujícím aminokyselinové substituce v imunodominantním epitopu

Tento cíl konkrétně zahrnuje:

- a) Produkci rekombinantních chimérických pentametr v bakulovirovém expresním systému
- b) Izolace těchto chimérických pentametr pomocí izopyknické centrifugace v cesium chloridovém gradientu

Posledním cílem této práce bylo zjištění schopnosti připravených DNA vakcín a chimérických pentametr indukovat protektivní protilátkovou odpověď cílenou proti PCV2 v imunizovaných myších. Posledním cílem tedy bylo:

3) Vyhodnotit protilátkovou odpověď vyvolanou pomocí DNA vakcín a chimérických pentametr

Tento cíl konkrétně zahrnuje:

- a) Imunizaci myší připravenými vakcínami
- b) Vyhodnocení protilátkové odpovědi pomocí metody ELISA a neutralizačních testů

4 Materiál a metody

4.1. Použité bakteriální kmeny, buněčné linie a virová inokula

Bakteriální kmen *E.coli* TOP 10: *F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ-*

Bakteriální kmen *E.coli* DH10Bac: *F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara leu) 7697 galU galK λ- rpsL nupG/ pMON14272/pMON7124* (Invitrogen)

Bakteriální kmen *E.coli* SCS110: *rpsL thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ(lac-proAB)*

Myší buněčná linie WOP – myší embryonální fibroblasty 3T3 transformované velkým T antigenem myšího polyomaviru

Myší buněčná linie NIH 3T6 – stabilní linie myších fibroblastů (získáno od Prof. Griffinové)

Prasečí buněčná linie PK15 – prasečí ledvinové epiteliální buňky, které jsou permissivní pro prasečí cirkovirus typ 2 (získáno od firmy Dyntec)

Linie hmyzích buněk Sf9 – linie odvozená z ovárií *Spodoptera frugiperda*

Prasečí cirkovirus typ 2 – virové inokulum PCV2, získáno od Dr. Pšikala (Dyntec)

4.2 Použité plasmidy

pBLAST42: savčí expresní plasmid s klonovacími místy umožňující N-terminální fúzi s IL-2 signální sekvencí (Invivogen)

pBLAST Δ41N-CAP: savčí expresní plasmid nesoucí DNA sekvenci PCV2 Cap proteinu zkráceného o 41 N-terminálních aminokyselin

pUC57-IFNA1: plasmid nesoucí DNA sekvenci myšího interferonu alfa1 (Genescript)

pUC57-TNF-α: plasmid nesoucí DNA sekvenci myšího tumor nekrotizujícího faktoru alfa (Genescript)

pBSC: savčí expresní plasmid používaný pro DNA imunizace – získáno od RNDr. Michala Šmahela, Ph.D.

pBSC-IL2ssΔ41NCAP: plasmid nesoucí DNA sekvenci Cap proteinu s N-terminální 41 aminokyselinovou delecí a N-terminální fúzí se signální sekvencí interleukinu 2

pBSC-IL2ssΔ41NCAP-HIS: plasmid nesoucí DNA sekvenci Cap proteinu s přidaným C-koncovým His-tagem, DNA sekvence Cap proteinu byla navíc zkrácena o 41 N-koncových AK a byla přidána DNA sekvence kódující signální sekvenci interleukinu 2

pBSC-CAP: plasmid nesoucí DNA sekvenci PCV2 Cap proteinu

pBSC-IFNA1: plasmid nesoucí DNA sekvenci myšího interferonu alfa1

pBSC-TNF-α: plasmid nesoucí DNA sekvenci myšího tumor nekrotizujícího faktoru alfa

pFasBac 1: komerční plasmid určený pro produkci rekombinantního bakuloviru systémem Bac-to-Bac (Invitrogen)

pFastBac1-VP1-CAP-HIS: plasmid nesoucí fúzní sekvenci VP1 kapsidového proteinu myšího polyomaviru a PCV2 Cap proteinu s c-koncovým his-tagem (získáno od Mgr. Martina Fraiberka)

pFastBac1-VP1-CAPIM-HIS: plasmid nesoucí sekvenci VP1 kapsidového proteinu myšího polyomaviru fúzovaného s PCV2 Cap proteinem obsahujícím aminokyselinové substituce v imunodominantním epitopu

pKLON5-CAP: plasmid nesoucí sekvenci PCV2 Cap proteinu (získáno od Dr. Pšikala, Dyntec)

4.3 Použité DNA primery

Veškeré sekvence jsou psány ve směru 5'-3'. Místa rozeznávaná restrikními endonukleázami jsou označena červeně. Nekomplementární přídatné sekvence jsou označeny zeleně.

Primery pro amplifikaci zkráceného PCV2 Cap proteinu s restrikními místy pro NruI a NheI:

CAPdelece_NruI_FW: CAAGAATCGCGAAATGGCATCTTCAACACCCGCCTG

CAPdelece_NheI_REV: GAAGAAGCTAGCTTAAGGGTTAAGTGGGGGGTCTTTAAG

Primery pro amplifikaci PCV2 Cap proteinu s restrikními místy pro XhoI a BglII:

CAP_XHOI_FW: GAAGTTCTCGAGATGACGTATCCAAGGAGGCGTTAC

CAP_BGLII_REV: GAAGTTAGATCTTTAAGGGTTAAGTGGGGGGTCT

Primery pro amplifikaci zkráceného PCV2 Cap proteinu se signální sekvencí interleukinu 2 s restrikními místy pro XhoI a BglII:

IL-2_XHOI_FW: CAAGTTCTCGAGATGTACAGGATGCAACTCC

CAP_BGLII_REV: GAAGTTAGATCTTTAAGGGTTAAGTGGGGGGTCT

Primery pro amplifikaci zkráceného PCV2 Cap proteinu se signální sekvencí interleukinu 2 s restrikními místy pro XhoI a BglII a s přídanou sekvencí kódující His-tag (sekvence označena modře):

IL-2_XHOI_FW: CAAGTTCTCGAGATGTACAGGATGCAACTCC

delCAPhis_BglII_REV:

GAAGTTAGATCTTTAATGGTGATGGTGATGATGAGGGTTAAGTGGGGGGTCT

Primery pro amplifikaci interferonu alfa1 s restrikčními místy pro XhoI a BglII:

IFNa1_XHOI_FW: **GAAGTTCTCGAG**ATGGCTAGGCTCTGTGCTTTC

IFNa1_BglII_REV: **ACCGTTAGATCTT**CATTCTCTTCTCTCAGTCTTC

Primery pro amplifikaci tumor nekrotizujícího faktoru alfa s restrikčními místy pro XhoI a BglII:

TNFa_XHOI_FW: **GAAGTTCTCGAG**ATGAGCACAGAAAGCATGATC

TNFa_BGLII_REV: **ACCGAAAGATCTT**CACAGAGCAATGACTCCAAAG

Primery pro cílenou mutagenezi PCV2 Cap proteinu (substituovaná DNA sekvence označena červeně):

CAPIM_FW: CTAGATTCCACTATTGAT**GCCGCTGCC**CAAACAACAAAAGAAACCAG

CAPIM_REV: CTGGTTTCTTTTGTGTTTGG**GCGAGCGG**CATCAATAGTGGAATCTAG

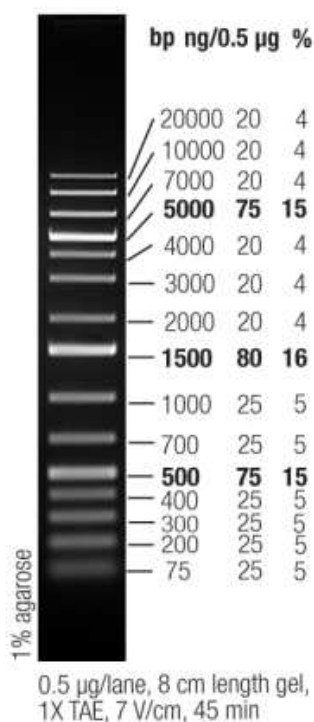
Primery pro analýzu rekombinantního bakmidu:

pUC/M13_FW: CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG

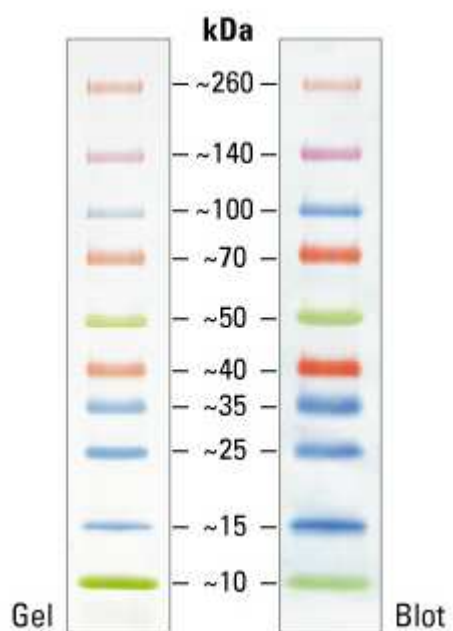
pUC/M13_REV: AGCGGATAACAATTTACACACAGG

4.4. Markery molekulových vah

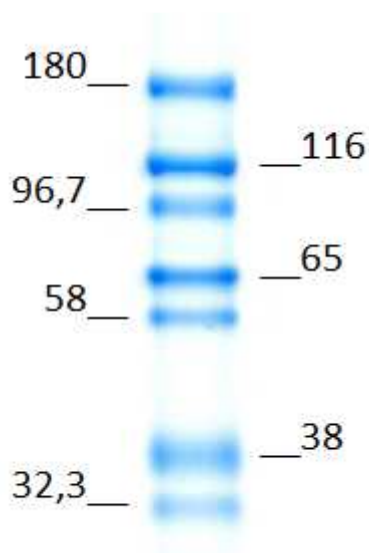
DNA marker molekulových vah: GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Life Technologies)



SDS-PAAGE markery molekulových vah: Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas)



Prestained Molecular Weight Marker, M.W. 27,000-180,000 (Sigma-Aldrich), molekulární váhy udány v kDa



4.5. Protilátky

4.5.1. Použité primární protilátky

Komerční myší monoklonální protilátka proti PCV2 Cap proteinu (ředění 250x, Biotech)

C1C6/H9 myší monoklonální protilátka cílená proti PCV2 Cap proteinu (hybridomový supernatant; získáno od Dr. Pšikala)

C6C10/B1 myší monoklonální protilátka cílená proti PCV2 Cap proteinu (hybridomový supernatant; získáno od Dr. Pšikala)

Králíčí polyklonální protilátka proti myšímu interferonu alfa1 (ředění 200x, BioVision)

Myší monoklonální protilátka proti His-tagu (ředění 250x, Penta)

4.5.2. Použité sekundární protilátky

Oslí monoklonální protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s Alexa Fluor 488 (ředění 1000x, Life Technologies)

Kozí monoklonální protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou (ředění 1000x, Life Technologies)

Kozí monoklonální protilátka proti králíčím imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou (ředění 1000x, Life Technologies)

4.6. Kultivační média

4.6.1 Bakteriální kultivační média

Luria-Bertani (LB) médium: 1% (w/v) pepton (Imuna), 0,5% (w/v) kvasničný autolyzát (Imuna), 1% (w/v) NaCl

TPN medium: 2% (w/v) pepton (Imuna), 0,5% (w/v) kvasniční autolyzát (Imuna), 0,5% (w/v) NaCl

SOC medium: 2% (w/v) pepton (Imuna), 0,5% (w/v) kvasničný autolyzát (Imuna), 20 mM glukóza, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄

4.6.2 Kultivační média pro savčí buňky

DMEM médium s 10% sérem: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma), 10% fetální bovinní sérum (Sigma), 2 mM L – glutamin (Gibco), podle potřeby 1/100 objemu směsi antibiotik pro tkáňové kultury (Sigma)

DMEM médium s 5% sérem: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma), 5% fetální bovinní sérum (Sigma), 2 mM L – glutamin (Gibco), podle potřeby 1/100 objemu směsi antibiotik pro tkáňové kultury (Sigma)

DMEM medium bez séra: : DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma), 2 mM L – glutamin (Gibco)

Médium pro hmyzí buňky s 10% sérem: TNM-FH insect medium (Sigma), 10% fetální bovinní sérum (Sigma), směs antibiotik pro tkáňové kultury (Sigma)

Médium pro hmyzí buňky bez séra: TNM-FH insect medium (Sigma)

4.7. Použitá selekční antibiotika

Ampicilin (Biomedika, pracovní koncentrace 100 µg/ml)

Blasticidin (Invivogen, pracovní koncentrace 100 µg/ml)

Gentamycin (Gibco, pracovní koncentrace 7 µg/ml)

Kanamycin (MP Biomedicals, pracovní koncentrace 50 µg/ml)

Tetracyklin (Sigma, pracovní koncentrace 10 µg/ml)

Směs antibiotik pro tkáňové kultury (Sigma) 100x koncentrovaný roztok

4.8 Sterilizace

Všechny použité špičky, mikrozkušavky a používané roztoky byly sterilizovány v autoklávu při teplotě 127 °C, tlaku 120 kPa po dobu 30 minut. Veškeré použité chemické sklo bylo předem sterilizováno horkým vzduchem o teplotě 160 °C po dobu 3 hodin. Roztoky, které nebylo možno sterilizovat pomocí autoklávu, byly sterilizovány filtrací přes sterilní filtr (šířka pórů 0,22 µm). Hokejky, bakteriologické kličky, skleněné tyčinky a pinzety byly sterilizovány vyžeháním pomocí ethanolu.

4.9 Práce s tkáňovými kulturami

4.9.1 Pasážování hmyzích buněk Sf9

Hmyzí buňky byly kultivovány v médiu pro hmyzí buňky s 10% FBS v termostatu Termobox LBT 165 při teplotě 28⁰C, přičemž tyto buňky byly pasážovány každý třetí den v poměru 1:4. Pasážování bylo prováděno tak, že narostlé hmyzí buňky z misky o průměru 6 cm byly seškrábány pomocí pryžového škrábátka, následně převedeny do polypropylénové kónické zkumavky (50 ml) a celkový objem byl doplněn na hodnotu 24 ml médiem pro hmyzí buňky s 10% FBS. Buněčná suspenze byla dobře promíchána a po 6 ml rozpipetována na nové misky.

4.9.2 Pasážování savčích buněk 3T6 a WOP

Myší buněčné linie 3T6 a WOP byly kultivovány v DMEM médiu s 10% FBS v termostatu (Forma Scientific) při teplotě 37⁰C a 5% CO₂. Tyto buňky byly pasážovány každý třetí den v poměru 1:6, přičemž z konfluentně narostlých buněk bylo odsáto médium a byly opláchnuty

5 ml Versenu (0,25% EDTA (w/v) v PBS, Sevac). Versen byl odsát a bylo přidáno 0,5 ml 0,25% trypsinu (Sigma) v PBS, dokud nedošlo k oddělení buněk od buněčného povrchu, přičemž inkubace s trypsinem probíhala v termostatu po dobu nepřesahující 10 minut. Následně bylo přidáno 5,5 ml DMEM média s 10% FBS a buňky byly důkladně resuspendovány pipetou. V případě kultivace buněk na misce o průměru 6 cm bylo přidáno 1 ml buněčné suspenze a na misku bylo přidáno 5 ml DMEM média s 10% FBS.

4.9.3 Pasážování savčích buněk PK-15

Prasečí buňky PK-15 byly kultivovány v DMEM médiu s 5% FBS v termostatu (Forma Scientific) při teplotě 37⁰C a 5% CO₂. Tyto buňky byly pasážovány každý třetí den v poměru 1:6, přičemž z konfluentně narostlých buněk bylo odsáto médium a byly dvakrát opláchnuty 5 ml Versenu (0,25% EDTA (w/v) v PBS, Sevac). Po odsátí Versenu byl přidán 1 ml 1% trypsinu (Sigma) ve Versenu a buňky byly inkubovány 20 minut v termostatu. Poté byla buněčná suspenze resuspendována pomocí 2 ml skleněné pipety a bylo přidáno 5 ml DMEM média s 5% FBS. V případě kultivace buněk na misce o průměru 6 cm bylo přidáno 1 ml buněčné suspenze a na misku bylo přidáno 5 ml DMEM média s 5% FBS.

4.9.4 Transfekce savčích buněk pomocí nukleofekce

Před vlastní transfekcí byly den předem pasážovány buňky (viz 4.9.2) v poměru 1:3. Pro transfekci byl použit Amaxa nucleofector kit (Lonza), přičemž bylo postupováno podle návodu od výrobce. Těsně před transfekcí byly buňky převedeny do suspenze (viz 4.9.2) a bylo spočítáno množství buněk v 1 ml pomocí Bürknerovy počítací komůrky. Do polypropylénové kónické zkumavky (15 ml) byla napipetována buněčná suspenze obsahující celkově 4x10⁶ buněk, přičemž toto množství buněk představuje optimální množství pro jednu transfekci. Tato suspenze byla centrifugována na stolní centrifuze MSE při 800 g po dobu 7 minut. Následně bylo odsáto médium a k buněčnému peletu bylo přidáno 0,1 ml transfekčního roztoku. Buněčný pelet byl důkladně resuspendován a bylo přidáno 6 µg plasmidové DNA izolované pomocí komerčních kitů (viz 4.11.1). Následně byla suspenze převedena do elektroporační kyvety (2,5 mm, Lonza). Elektroporační kyveta byla vložena do elektroporátoru Amaxa nucleofector, kde byl po zvolení optimálního programu aplikován elektrický puls. Poté bylo do kyvety přidáno 0,5 ml média RPMI-1640 (Sigma). Následně byla buněčná suspenze převedena do sterilní mikrozkušavky a inkubována v termostatu při 37 °C po dobu 15 minut. Poté byla buněčná suspenze převedena na misku o průměru 6 cm a

bylo přidáno 5,5 ml DMEM média s 10% FBS. Po 4 hodinách bylo médium odsáto a bylo přidáno 6 ml nového DMEM média s 10% FBS.

4.9.5 Transfekce savčích buněk pomocí kationických polymerů (Turbofect)

Den před transfekcí byly buňky převedeny do suspenze (viz 4.9.2) a bylo spočítáno množství buněk v 1 ml pomocí Bürknerovy počítací komůrky. Následně bylo v případě 24 jamkové destičky přidáno takové množství suspenze obsahující celkově 40 000 buněk a pro Petriho misku o průměru 6 cm bylo přidáno takové množství suspenze obsahující 5×10^5 buněk. Těsně před transfekcí bylo namícháno transfekční médium obsahující v případě transfekce 24 jamkové destičky: 0,1 ml DMEM média bez séra, 1 μ g plasmidové DNA a 2 μ l Turbofect transfection reagent (Life Technologies). V případě transfekce Petriho misek (průměr 6 cm) bylo složení transfekční směsi: 600 μ l DMEM bez séra, 6 μ g DNA a 12 μ l Turbofect transfection reagent (Life Technologies). Transfekční směs byla důkladně promíchána a ponechána při pokojové teplotě po dobu 20 minut. Následně byla transfekční směs po zhruba 20 μ l přidána k adherentním buňkám.

4.9.6 Transfekce hmyzích buněk Sf9

Konfluentně narostlé hmyzí buňky Sf9 byly převedeny do suspenze (viz 4.9.1) a následně byly buňky spočítány pomocí Bürknerovy počítací komůrky a bylo vyseto 8×10^5 buněk do jedné jamky 6 jamkové destičky. Buňky byly ponechány přisednout k podkladu a následně bylo přidáno 2 ml „plating média“, které bylo připraveno smícháním 1,5 ml média pro hmyzí buňky s 10% FBS a 8,5 ml média pro hmyzí buňky bez séra. Následně byla připravena transfekční směs, kdy nejprve bylo přidáno 8 μ l Cellfectinu (Invitrogen) do 100 μ l média pro hmyzí buňky bez séra a 5 μ l bakmidové DNA (viz 4.11.3) bylo přidáno do 95 μ l média pro hmyzí buňky bez séra. Obě směsi byly důkladně promíchány a po 15 minutách inkubace při pokojové teplotě byly spojeny dohromady. Následovalo důkladné promíchání a inkubace 10 minut při pokojové teplotě. Poté byly transfekční směs nakapána na hmyzí buňky Sf9, které byly poté inkubovány při 28 °C po dobu 4 hodin. Poté bylo odsáto médium a přidáno nové médium pro hmyzí buňky s 10% FBS a antibiotiky.

4.9.7 Plaková titrace bakulovirového inokula

Na misky o průměru 6 cm bylo vyseto 2×10^6 hmyzích buněk Sf9. Po přichycení buněk na dno misky bylo odsáto médium a bylo přidáno 0,6 ml naředěného virového inokula, přičemž

ředění bylo zvoleno v rozmezí 10^{-4} až 10^{-7} . Buňky byly inkubovány 90 minut při laboratorní teplotě na kývačce. Následně bylo inokulum odsáto a buňky byly převrstveny 4 ml sterilního 1,5% SeaPlaque agaru v médiu pro hmyzí buňky s 10% FBS a antibiotiky, přičemž teplota této směsi činila zhruba 40 °C. Po ztuhnutí agaru byly buňky inkubovány 6-8 dní při 28 °C. Poté byly plaky spočítány a byl určen virový titr.

4.9.8 Infekce hmyzích buněk Sf9 bakulovirem

Buňky byly pasážovány (viz 4.9.1) v poměru 1:4 do média pro hmyzí buňky bez séra a byly ponechány v termostatu, dokud se nepřichytily na povrch misky. Následně bylo odsáto médium a v případě misek o průměru 10 cm bylo přidáno 1 ml bakulovirového inokula ($\text{MOI}=5 \text{ Pfu/ml}$). Následně byly buňky inkubovány při pokojové teplotě na kývačce po dobu 90 minut. Poté bylo přidáno 9 ml média pro hmyzí buňky s 10% FBS. Doba infekce byla počítána od okamžiku přidání bakulovirového inokula.

4.9.9 Fixace a permeabilizace buněk

Buňky narostlé na mikroskopických sklíčkách byly nejprve opláchnuty PBS a následně byl přidán 3,7% paraformaldehyd (Sigma) v PBS. Buňky byly inkubovány s paraformaldehydem při pokojové teplotě po dobu 20 minut. Poté byl paraformaldehyd odsát a byl přidán 0,5% Triton X-100 (Sigma) v PBS, přičemž buňky byly inkubovány při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Poté byl 0,5% Triton X-100 odsát a buňky byly opláchnuty 3x pomocí PBS.

4.9.10 Detekce proteinů pomocí nepřímé imunofluorescence

K zafixovaným buňkám bylo přidáno 1% BSA (Sigma) v PBS a buňky byly ponechány 1 hodinu při pokojové teplotě. Následně bylo 1% BSA v PBS odsáto a byla přidána primární protilátka naředěná v 1% BSA v PBS. Buňky byly inkubovány s primární protilátkou při pokojové teplotě po dobu 1 hodiny. Poté byly buňky promyty 3x10 minut pomocí PBS a byla přidána na 30 minut sekundární protilátka ředěná v 1% BSA v PBS. Poté byly buňky opět promyty 3x10 minut pomocí PBS a mikroskopická sklíčka byla vyjmuta a po oschnutí položeny do kapky 50% glycerolu s DAPI ($c=0,1 \text{ } \mu\text{g/ml}$). Vzorky byly prohlíženy na fluorescenčním mikroskopu BX-60 (Olympus).

4.10 Práce s bakteriemi

4.10.1 Kultivace bakteriálních kultur

Použité bakteriální kultury byly kultivovány na agarových plotnách v termostatu při teplotě 37 °C nebo v tekutém LB médiu v třepačce při teplotě 37 °C a 200 RPM. V případě selekce bakteriální kultury nesoucí plasmid s určitou rezistencí, bylo do tekutého média nebo do agaru přidáno přesné množství vhodného selekčního antibiotika.

4.10.2 Příprava elektrokompetentních buněk pro transformaci

Do 15 ml TPN média byla zaočkována bakteriální kultura *Escherichia coli*, přičemž kultura byla inkubována v třepačce po dobu 16 hodin, 200 RPM a při teplotě 37 °C. Následně byla pomocí spektrofotometru změřena optická densita ($\lambda=560$ nm) a bakteriální kultura byla naředěna do 600 ml TPN takovým způsobem, aby výsledná optická denzita činila 0,1. Po dosažení optické denzity 0,5-0,7 byla kultura převedena do 50 ml kónických zkumavek se šroubujícím víčkem a zkumavky byly centrifugovány (centrifuga Megafuge) 10 minut při 4000 g a teplotě 4 °C. Bakteriální pelet byl následně resuspendován v 600 ml vychlazené ddH₂O a opět centrifugován 10 minut při 4000 g a teplotě 4 °C. Poté byl pelet resuspendován ve 300 ml vychlazené ddH₂O a opět centrifugován 10 minut při 4000 g a teplotě 4 °C. Následně byl bakteriální pelet resuspendován ve 24 ml 10% glycerolu (Penta) a centrifugován 10 minut při 4000 g a teplotě 4 °C. Poté byl pelet opět resuspendován ve 12 ml 10% glycerolu a centrifugován 10 minut při 4000 g a teplotě 4 °C. Následně byl pelet resuspendován v 1,2 ml 10% glycerolu a po 100 μ l byla suspenze rozplněna do mikrozkušavek, které byly ponořeny do tekutého dusíku a uskladněny při teplotě -80 °C.

4.10.3 Transformace bakterií teplotním šokem

Komerční chemokompetentní buňky *Escherichia coli* DH5 α -T1 (Life Technologies) byly ponechány rozmraznout na ledu. Následně bylo přidáno 2 μ l z rekombinační reakce (viz 4.11.12). Mikrozkušavky byly následně inkubovány 12 minut na ledu a poté přeneseny na 30 sekund do vodní lázně vytemperované na teplotu 42 °C. Následně byla mikrozkušavka opět inkubována na ledu po dobu 2 minut. Poté bylo přidáno 250 μ l komerčního SOC média (Life Technologies). Mikrozkušavky byly inkubovány v třepačce po dobu 60 minut při 200 RPM a teplotě 37 °C. Poté byla bakteriální kultura vyseta na agarové plotny s vhodným selekčním antibiotikem.

4.10.4 Transformace bakterií pomocí elektroporace

Elektrokompetentní buňky *Escherichia coli* TOP10 nebo SCS110 byly ponechány rozmrazit na ledu. Následně bylo k bakteriální kultuře přidáno 1,5 µl plasmidové DNA nebo ligační směsi. Směs byla převedena do elektroporační kyvety. Elektroporační kyveta byla vložena do elektroporátoru (Biorad) a následně byl aplikován elektrický puls. Poté bylo do kyvety přidáno 1 ml SOC média a kultura byla přenesena do sterilní Erlenmeyerovy baňky. Bakteriální kultura byla následně kultivována v třepačce po dobu 60 minut při 200 RPM a teplotě 37 °C. Poté byla bakteriální kultura vyseta na agarové plotny s vhodným selekčním antibiotikem.

4.10.5 Tvorba bakteriálních konzerv

Pro dlouhodobé uskladnění bakteriálních kultur byly bakteriální kultury smíchány s 50% glycerolem v takovém poměru, aby výsledná koncentrace glycerolu činila 15%. Následně byly kultury uskladněny při teplotě -80 °C.

4.11 Práce s DNA

4.11.1 Agarózová elektroforéza

Pro stanovení velikosti DNA byly využity 0,8% až 2% agarózové gely. Odpovídající množství agarózy bylo rozpuštěno ve 30 ml TAE pufru (40mM Tris, 20 mM kyselina octová, 1 mM EDTA), celá směs byla následně krátce povařena a po ochladnutí nalita do plastového bločku. Následně bylo přidáno 30 µl 1000x koncentrovaného ethidiumbromidu (Serva) a na jeden okraj gelu byl umístěn plastový hřeben. Po ztuhnutí byl gel vložen do elektroforetické vaničky a byl přelit TAE pufrem. Ke vzorkům byla přidána nanášecí barvička (40% sacharóza, 0,12% bromfenolová modř) a vzorky byly nepipetovány do jamek. Aparatura byla zapojena do elektrického zdroje, přičemž vlastní elektroforéza probíhala při intenzitě elektrického pole 5V/cm². Po doputování bromfenolové modře do vzdálenosti 1 cm od okraje byla elektroforéza ukončena a gel byl prohlédnut UV transiluminátorem.

4.11.1 Izolace plasmidové DNA a čištění PCR směsí pomocí komerčních kitů

Pro minipreparaci plasmidové DNA byly použity GenElute HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma) a GenBond Plasmid FlexSpin Kit (Renogen Biolab). Pro maxipreparaci plasmidové DNA

vhodné pro transfekce savčích buněk byly využity EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen) a Jetstar Plasmid Purification Maxi Kit (Genomed). Pro přečištění DNA po PCR byl využit High Pure PCR Product Purification Kit (Roche). Izolace DNA byla provedena podle pokynů od výrobce.

4.11.2 Minipreparace plasmidové DNA pomocí alkalické lýze

Vybraná bakteriální kolonie byla zaočkována do 1,5 ml mikrozkušavky obsahující 700 µl LB média s vhodným selekčním antibiotikem. Následně byla kultura inkubována v třepačce po dobu 16 hodin při 200 RPM a teplotě 37 °C. Poté byla bakteriální kultura centrifugována na stolní centrifuze (Mini Spin, eppendorf) při 4000 g po dobu 5 minut. Bakteriální pelet byl resuspendován v 250 µl roztoku I (25 mM TRIS-HCl, 10 mM EDTA, pH=8). Poté bylo přidáno 250 µl roztoku II (1% SDS, 0,2 M NaOH). Mikrozkušavka byla promíchána otáčením a následovala 10 minutá inkubace při pokojové teplotě. Následně bylo přidáno 200 µl ledově vychlazeného roztoku III. Mikrozkušavka byla opět promíchána a následovala inkubace 10 minut na ledu. Poté byla směs centrifugována (Centrifuge M, Beckman) při 20 000 g po dobu 10 minut a supernatant byl přelit do nové mikrozkušavky obsahující 500 µl izopropanolu. Následovala inkubace 10 minut při pokojové teplotě a poté centrifugace při 20 000 g při teplotě 4 °C a po dobu 20 minut. Pelet byl promyt 70% ethanolem a opět centrifugován po dobu 20 minut při 20 000 g a teplotě 20 °C. Pelet byl ponechán vyschnout při pokojové teplotě a resuspendován v 15 – 25 µl ddH₂O nebo v TE pufru s 1/10 objemu RNázy A.

4.11.3 Izolace bakmidové DNA

Po transformaci bakterií *Escherichia coli* DH10Bac pomocí elektroporace byly bakterie vysety na selekční agarové plotny obsahující kanamycin, gentamycin, tetracyklin, X-gal a induktor IPTG. Následovala kultivace 48 hodin v termostatu při 37 °C. Pozitivní bílé kolonie byly poté přečárkovány na novou plotnu a kultivovány dalších 48 hodin při 37 °C. Získané bílé monokolonie byly párátkem zaočkovány do 2 ml LB média, přičemž médium obsahovalo opět kanamycin, gentamycin a tetracyklin. Následovala kultivace v třepačce při 200 rpm, teplotě 37 °C a po dobu 16 hodin. Poté bylo odebráno 1,5 ml kultury do mikrozkušavky a kultura byla centrifugována při 4000 g po dobu 5 minut. Buněčný pelet byl resuspendován v 0,3 ml roztoku I (15 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH=8, 100 µg/ml RNáza A). Následně bylo přidáno 0,3 ml roztoku II (0,2 M NaOH; 1% SDS). Směs byla promíchána a inkubována

5 minut při pokojové teplotě. Poté bylo přidáno 0,3 ml octanu draselného (pH = 5,5) a proběhla inkubace na ledu po dobu 10 minut. V dalším kroku byla směs centrifugována při 20000 g, teplotě 4 °C a po dobu 10 minut. Supernatant byl přelit do nové mikrozkušavky obsahující 0,8 ml izopropanolu, promíchán převrácením zkumavky a inkubován na ledu po dobu 10 minut. Směs byla opět centrifugována při 20000 g, teplotě 4 °C a po dobu 25 minut. Pelet byl promyt 0,5 ml 70% ethanolu a centrifugován při 20000 g, teplotě 4 °C a po dobu 25 minut, přičemž tento promývací krok včetně centrifugace byl celkově proveden 2krát. Pelet byl ponechán vyschnout při pokojové teplotě a resuspendován v 15 - 25 µl ddH₂O. Přítomnost vloženého genu byla ověřena pomocí PCR (viz 4.11.10).

4.11.4 Stanovení koncentrace DNA a sekvenace DNA

Koncentrace DNA byla stanovena pomocí Nanodropu. Bylo postupováno pomocí přiloženého návodu k obsluze přístroje. Sekvenace DNA byla provedena laboratoří sekvenace DNA (Přirodovědecká fakulta UK).

4.11.5 Deproteinace DNA pomocí fenolu a chloroformu s isoamylalkoholem

K roztoku obsahující DNA bylo přidáno 0,5 objemu tekutého fenolu saturovaného v TRIS-HCl (Sigma) a 0,5 objemu chloroformu s isoamylalkoholem (poměr 24:1). Suspenze byla důkladně promíchána a následně centrifugována ve stolní centrifuze (Mini Spin, eppendorf) při 11000 g a po dobu 5 minut. Byla odebrána horní vodná fáze, ke které byl přidán stejný objem chloroformu s isoamylalkoholem. Suspenze byla opět důkladně promíchána a následně centrifugována ve stolní centrifuze při 11000 g a po dobu 5 minut. Po ustanovení dvou fází po centrifugaci byla odebrána horní vodná fáze.

4.11.6 Srážení DNA ethanolem

K roztoku DNA byla přidána 1/10 objemu 3M octanu sodného, směs byla důkladně promíchána a následně bylo přidáno 2,5 objemu 96% ethanolu. Směs byla opět důkladně promíchána a byla ponechána při teplotě -20 °C po dobu 1 hodiny. Následně byla vysrážená DNA centrifugována 25 minut při 20000 g a teplotě 4 °C. Pelet byl promyt 70% ethanolem a opět centrifugován 25 minut při 20000 g a teplotě 20 °C. Poté byl pelet ponechán vyschnout při pokojové teplotě a byl rozpuštěn ve vodě nebo v TE pufru (10 mM Tris – HCl, 1 mM EDTA, pH=8).

4.11.7 Štěpení DNA pomocí restrikčních endonukleáz

Po analýze DNA sekvencí byl zvolen vhodný enzym pro štěpení DNA, přičemž podle pokynů od výrobce bylo zvoleno množství enzymu a také vhodný restrikční pufr.

Složení restrikční směsi: 0,5 – 5 µg DNA

5-10 U zvoleného restrikčního enzymu

restrikční pufr (10x) – 1/10 konečného objemu restrikční směsi

ddH₂O – doplnění do konečného objemu

Po namíchání byla restrikční směs důkladně promíchána a byla ponechána inkubovat při 37 °C po dobu 16 hodin.

4.11.8 Defosforylace DNA konců

Pro defosforylaci konců DNA byla použita alkalická fosfatáza FastAP (Fermentas). Složení směsi bylo následující: 1-5 µg lineární DNA

5 µl FastAP pufru

1 µl FastAP enzymu

ddH₂O – doplnění do konečného objemu 50 µl

Po namíchání byla směs důkladně promíchána a byla ponechána inkubovat při teplotě 37 °C po dobu 15 minut. Následně byl enzym teplotně deaktivován inkubací při teplotě 75 °C po dobu 10 minut.

4.11.9 Ligace

Pro ligaci DNA byla použita T4 DNA ligáza (Fermentas), přičemž poměr vkládané DNA (insert) vzhledem k linearizovanému vektoru činil 3:1. Složení ligační směsi:

100 – 200 ng DNA (insert + vektor)

0,5 µl T4 DNA ligázy

2 µl ligační pufr

ddH₂O- doplnění do konečného objemu 20 µl

Po namíchání byla směs důkladně promíchána a byla ponechána inkubovat při teplotě 22 °C po dobu 16 hodin.

4.11.10 Amplifikace DNA pomocí polymerázové řetězové reakce

Pro amplifikaci DNA fragmentů nepřesahujících délku 2000 bp byla využita polymeráza Vent (New England BioLabs) a složení PCR směsi (50 μ l) bylo následující:

1,5 μ l primer reverse (10 μ M)

1,5 μ l primer forward (10 μ M)

0,5 μ l templátové DNA (c=10ng/ μ l)

1 μ l 10 mM směsi dATP, dCTP, dGTP a dTTP

5 μ l 10x koncentrovaného Thermo Pol pufru (New England BioLabs)

0,5 μ l Vent DNA polymerázy (New England BioLabs)

40 μ l ddH₂O

Reakční program:

Denaturace DNA – 3 minuty při 94 °C

25-30 cyklů: Denaturace DNA – 30 sekund při 94 °C

 Nasedání primerů – 30 sekund při 49 - 62 °C

 Polymerace – 60 sekund při 72 °C

Závěrečná polymerace – 5 minut 72 °C

Pro amplifikaci DNA fragmentů přesahujících délku 2000 bp byl využit High Fidelity PCR enzyme mix (Fermentas) a složení PCR směsi (50 μ l) bylo následující:

1,5 μ l primer reverse (10 μ M)

1,5 μ l primer forward (10 μ M)

0,5 μ l templátové DNA

1 μ l 10 mM směsi dATP, dCTP, dGTP a dTTP

5 μ l 10x koncentrovaný High Fidelity PCR enzyme mix pufr (Fermentas)

0,5 μ l High Fidelity PCR enzyme mix (Fermentas)

40 μ l ddH₂O

Reakční program:

Denaturace DNA – 3 minuty při 93 °C

30 cyklů: Denaturace DNA – 45 sekund při 94 °C

 Nasedání primerů – 45 sekund při 55 °C

 Polymerace – 4,5 minuty při 72 °C

Závěrečná polymerace – 7 minut 72 °C

4.11.11 PCR z bakteriálních kolonií („colony PCR“)

Narostlá bakteriální kolonie byla pomocí párátka převedena do mikrozkušavky s 100 µl ddH₂O. Poté byla mikrozkušavka inkubována 5 min při 100 °C. Následovala centrifugace (Mini Spin, eppendorf) při 5000g po dobu 5 min. Z každé mikrozkušavky pak bylo použito 2,5 µl jako templát pro PCR, přičemž bylo postupováno podle obecného schématu PCR (viz 4.11.10) s tím rozdílem, že objem jedné reakční směsi činil 20 µl a do každé reakce bylo přidáno 2 µl 1% Triton X-100.

4.11.12 Cílená mutageneze plazmidové DNA

Cílená mutageneze plazmidové DNA sekvence byla provedena pomocí komerčního kitu GENEART Site-Directed Mutageneses System (Life Technologies). Cílené mutageneze bylo dosaženo pomocí PCR za využití mutagenezních primerů. Reakce byly prováděny na PCR cykléru Mastercycler EPgradient S (Eppendorf). Složení PCR reakce:

5 µl 10x AccuPrime *Pfx* Reaction mix

5 µl 10x Enhancer

1,5 µl primer reverse (10 µM)

1,5 µl primer forward (10 µM)

1 µl plazmidové DNA (20 ng/µl)

1 µl DNA methyláza (4U/µl)

2 µl 25x SAM

0,4 µl AccuPrime *Pfx* (2,5 U/µl)

PCR voda doplnění do konečného objemu 50 µl

Reakční program:

Metylace plazmidové DNA – 20 minut při 37 °C

Denaturace DNA – 2 minuty při 94 °C

18 cyklů: Denaturace DNA – 20 sekund při 94 °C

 Nasedání primerů – 30 sekund při 57 °C

 Polymerace – 210 sekund při 68 °C

Závěrečná polymerace – 5 minut 68 °C

Po proběhnutí PCR reakce byly produkty analyzovány pomocí agarózové DNA elektroforézy (viz 4.11.1). Poté byla namíchána rekombinační reakce o následujícím složení:

4 μ l 5x Reaction Buffer

10 μ l PCR voda

4 μ l PCR produktu

2 μ l 10x Enzymer mix

Po namíchání byla směs důkladně promíchána a inkubována při pokojové teplotě po dobu 10 minut. Poté byla reakce zastavena přidáním 1 μ l 0.5 M EDTA. Reakční směs byla uchována na ledu a pomocí této reakční směsi byly transformovány chemokompetentní buňky *Escherichia coli* DH5 α -T1 (Life Technologies)(viz 4.10.3).

4.12 Práce s proteiny

4.12.1 Izolace chimerických pentametr

Hmyzí buňky Sf9 byly infikovány rekombinantním bakulovirem (viz 4.9.8), poté byly oškrábány do média, přeneseny do 50 ml kónické zkumavky a centrifugovány (MSE centrifuga) 10 minut při 800 g. Supernatant byl uschován a sediment byl resuspendován ve sterilním pufru B (10 mM Tris-HCl, pH= 7,4; 150 mM NaCl; 0,01 mM CaCl₂). Směs byla sonikována (sonikátor Soniprep 150, Schoeller Pharmacia Praha) 3x30 sekund, přičemž mezi sonikacemi byla směs vždy 30 sekund inkubována na ledu. Poté byla směs centrifugována při 12 000 g, teplotě 4 °C a po dobu 10 minut. Supernatant byl následně převeden do ultracentrifugační kyvety a byl centrifugován (centrifuga Optima L-90K, rotor SW41, Beckman) 3 hodiny při 35000 rpm a teplotě 4 °C. Proteinový pelet byl resuspendován v pufru B. Následně byla suspenze převedena do centrifugační kyvety, přičemž hmotnost suspenze byla pomocí B pufru upravena na hodnotu 2,5 g a následně bylo přidáno 1,2 g chloridu cesného. Následovala centrifugace (centrifuga Optima L-90K, rotor SW 55TI, Beckman) při 35000 RPM po dobu 24 hodin a při teplotě 20 °C. Pomocí rozebírače frakcí (Beckman) byl poté gradient rozebrán na několik frakcí, přičemž objem každé frakce činil zhruba 0,5 ml. Pro každou frakci byl stanoven refraktometrický index pomocí refraktometru ABBE (Carl Zeiss Jena) a podle toho indexu byly některé frakce spojeny dohromady. Následně bylo po dobu 10 minut v destilované vodě povařeno dialyzační střevo (Serva, průměr 16 mm) a jednotlivé frakce byly převedeny do dialyzačního střeva. Dialyzační střevo bylo uzavřeno svorkami a

bylo umístěno do 2 litrů vychlazeného pufru B. Po 4 hodinách bylo střevo přemístěno do čerstvého pufru B a bylo ponecháno 16 hodin při teplotě 4 °C. Následně byly vzorky nepipetovány do 2 ml mikrozkušavek a byla změřena koncentrace proteinů (viz 4.12.3).

4.12.2 Izolace proteinů obsahujících His-tag

Pro izolaci proteinů obsahujících His-tag byl využit komerční kit Dynabeads His-Tag Isolation and Pulldown (Invitrogen). Nejprve byla směs proteinů smíchána s binding/wash pufrém (100 mM Na-Fosfát, pH=8; 600 mM NaCl, 0,02% Tween-20) přičemž finální objem činil 700 μ l. Poté bylo přidáno 50 μ l magnetických kuliček a směs byla důkladně promíchána. Následně byly mikrozkušavky umístěny do magnetického stojánku a supernatant byl odstraněn. Magnetické kuličky byly 4x10 minut promyty pomocí binding/wash pufru. Proteiny byly následně uvolněny pomocí přídatku elučního pufru (300 mM Imidazole, 50 mM Na-Fosfát, pH=8; 300 mM NaCl, 0,01% Tween-20).

4.12.3 Stanovení koncentrace proteinů pomocí metody Bradfordové

Nejprve bylo připraveno činidlo Bradfordové tak, že 100 mg Coomassie Brilliant Blue G250 (Serva) bylo přes noc rozpuštěno v 50 ml 96% ethanolu. Druhý den bylo přidáno 100 ml H_3PO_4 a objem byl doplněn do finálního objemu 1000 ml pomocí ddH₂O. Poté bylo namícháno 5 standardů BSA v rozmezí koncentrace 0-1 mg/ml. Pro jednotlivé standardy byla určena absorbance ($\lambda=595$) a byla vytvořena kalibrační křivka. Následně bylo napipetováno 100 μ l vzorku do mikrozkušavky obsahující 1 ml činidla Bradfordové. Vzorek byl důkladně promíchán a byla určena absorbance ($\lambda=595$) vzorku. Pomocí kalibrační křivky byla spočítána koncentrace proteinů ve vzorku.

4.12.4 Tvorba buněčného lyzátu

Buněčná kultura byla opláchnuta pomocí PBS. Poté byly buňky na ledu seškrábány pomocí pryžového škrábátka a převedeny do mikrozkušavky. Suspenze byla centrifugována (Mini Spin, eppendorf) 5 minut při 800 g a buněčný pelet byl následně resuspendován ve 200 μ l RIPA pufru (150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH=7,4, 0,05% NP-40, 1% deoxycholát sodný, 1% Triton X-100, 0,1% SDS) s 2 μ l inhibitoru proteáz PMSF (c=100 μ g/ml). Směs byla důkladně promíchána a ponechána na ledu 25 minut. Poté byla směs sonikována 3x15 sekund, přičemž mezi sonikacemi byla směs vždy 30 sekund inkubována na

ledu. Dále byla směs centrifugována (Centrifuge M, Beckman) 10 minut při 20 000 g a teplotě 4 °C. Supernatant byl odebrán a uskladněn v -20 °C.

4.12.5 SDS polyakrylamidová proteinová elektroforéza (SDS-PAAGE)

Vzorky byly smíchány s 5x koncentrovaným Laemliho pufrem (1,25% SDS, 50 mM Tris – HCl, pH = 6,8, 25% β -merkaptoethanol, 50% glycerol, 0,005% bromfenolová modř) v poměru 4:1 a následně povařeny při teplotě 100 °C po dobu 5 minut. Poté byla sestavena aparatura pro přípravu akrylamidových gelů, přičemž těsnost aparatury byla zkontrolována pomocí nalití dH₂O do aparatury. Poté byla aparatura důkladně vysušena a byl připraven 15% polyakrylamidový gel, který byl připraven smícháním 7,5 ml polyakrylamidu (30%), 5,6 ml 1 M TRIS-HCl (pH=6,8), 150 μ l 10% SDS, 75 μ l 10% APS, 15 μ l TEMED a 4,44 ml ddH₂O. Gel byl opatrně nalit do aparatury a přelit isobutanolem. Po ztuhnutí spodního gelu byl odstraněn isobutanol a byl připraven horní gel, který byl připraven smícháním 1 ml polyakrylamidu (30 %), 0,750 ml 1 M TRIS-HCl (pH=6,8), 60 μ l 10% SDS, 40 μ l 10% APS, 10 μ l TEMED a 4,44 ml ddH₂O. Následně byl přidán hřeben a gel byl ponechán ztuhnout. Poté byla připravena vlastní aparatura pro elektroforézu, do které byly umístěny připravené gely a aparatura byla zalita elektroforetickým pufrem (25 mM Tris, 192 mM glycin, 0,1% SDS, pH = 8,3). Byl odstraněn vrchní hřeben a do jamek bylo nanášeno 5-30 μ l vzorku. Vlastní elektroforéza probíhala nejprve při napětí 8 V/cm² po dobu 30 min a dále při napětí 10 V/cm² po dobu zhruba 2,5 hodiny.

4.12.6 Barvení gelů po SDS-PAAGE

Polyakrylamidový gel byl vyjmut s aparatury pro SDS-PAAGE a následně fixován 30 minut ve fixačním roztoku, který byl připraven smícháním 25 ml dH₂O s 20 ml methanolu a 5 ml kyseliny octové. Poté byl gel vyjmut z fixačního roztoku a obarven pomocí barvicího roztoku (0,5% Coomassie Brilliant Blue G250), přičemž obarvení probíhalo při pokojové teplotě po dobu 16 hodin. Následně byl barvicí roztok slit pro další použití a gel byl několikrát promyt dH₂O pro odbarvení pozadí.

4.12.7 Western blot

Nejprve byl připraven blotovací pufr (25 mM Tris, 195 mM glycin, 20% metanol, pH=8,3), přičemž tento pufr byl před vlastním použitím důkladně vychlazen. Po skončení SDS-PAAGE byl vyjmut polyakrylamidový gel s rozdělenými proteiny a vložen do blotovacího pufru.

Následně byl sestaven blotovací sendvič, přičemž nejdříve byly umístěny 3 filtrační papíry, poté Whatman a nitrocelulózová membrána NC-45 (Serva). Na nitrocelulózovou membránu byl opatrně umístěn polyakrylamidový gel, který byl překryt Whatmanem a 3 filtračními papíry. Po celou dobu práce byl brán zřetel na to, aby sendvič byl neustále navlhčen v blotovacím pufru. Celý sendvič byl uzavřen pomocí plastové mřížky a vložen do blotovací aparatury (TE22, Amersham Biosciences). Přenos probíhal po dobu 3 hodin při $0,8\text{mA}/\text{cm}^2$. Poté byla nitrocelulózová membrána vyjmuta a bylo přikročeno k imunodetekci proteinů (viz 4.12.9).

4.12.8 Dot blot

Byla připravena nitrocelulózová membrána, na kterou byly nanесeny vzorky, přičemž byl nanесen objem 2 μl . Membrána byla ponechána vyschnout při pokojové teplotě a následovala imunodetekce proteinů (viz 4.12.9).

4.12.9 Imunodetekce proteinů na nitrocelulózové membráně

Nitrocelulózová membrána byla nejprve inkubována v 5% odtučněném mléce v PBS po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Poté probíhala inkubace s primární protilátkou vhodně naředěnou v 5% mléce v PBS, přičemž inkubace probíhala po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Membrána byla následně promyta 3×10 minut pomocí PBS. Následně probíhala inkubace se sekundární protilátkou naředěnou v 5% odtučněném mléce v PBS, přičemž inkubace probíhala po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Poté byl namíchán vyvolávací roztok A, který byl připraven smícháním 18 ml dH_2O , 2 ml TRIS-HCl ($\text{pH}=8,5$), luminolu a kyseliny kumarové. Vyvolávací roztok B byl připraven smícháním 18 ml dH_2O , 2 ml TRIS-HCl ($\text{pH}=8,5$) a 30 μl 30% peroxidu vodíku. Tyto roztoky byly slity dohromady a nality na 30 sekund na nitrocelulózovou membránu, přičemž proces vyvolávání probíhal v temné komoře. Poté byla nitrocelulózová membrána usušena a vložena do průhledné plastové fólie, na kterou byl přidán RTG film. Fólie s RTG filmem byla uzavřena ve fotodeskách. Doba expozice se pohybovala od 1 minuty až po dobu 40 minut. Film byl poté vyjmut a vyvolán pomocí vývojky a ustalovače.

4.12.10 Bakulovirový expresní systém

Pro produkci rekombinantních proteinů byl použit Bac-to-Bac Baculovirus Expression System (Invitrogen). Tento systém umožňuje snadnou tvorbu rekombinantního bakuloviru

(*Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus). Nejprve byl použit plasmid pFastBac1, do kterého byl vložen požadovaný gen, jehož exprese je pod kontrolou bakulovirového specifického promotoru (polyhedrinový promotor). Polyhedrinový promotor včetně vloženého genu je z obou stran ohraničen Tn7 sekvencemi. Plasmid pFastBac1 dále nese gen určující rezistenci ke gentamycinu. Po úspěšném vložení DNA sekvence do plasmidu pFastBac1 byl tento plasmid použit pro transformaci bakterií *Escherichia coli* DH10Bac, které obsahují bakulovirový kyvadlový vektor (bakmid), který navíc obsahuje gen pro rezistenci ke kanamycinu. Kromě toho je přítomen ještě pomocný plasmid kódující transpozázu a nesoucí gen pro rezistenci k tetracyklinu. Po transformaci bakterií *Escherichia coli* DH10Bac plasmidem pFastBac1 dochází k transpozici mezi Tn7 sekvencemi, přičemž úsek vloženého genu spolu s promotorem je vnesen do bakmidu. Při správném vložení genu je dále zabráněno komplementaci delece lacZ, čehož lze využít v případě selekce, neboť za pomoci chromogenního substrátu X-gal a induktoru IPTG lze snadněji identifikovat bakteriální kolonie (bílé zbarvení). Pro selekci byly také využity agarové plotny s vhodnými selekčními antibiotiky (gentamycin, kanamycin, tetracyklin). Následně byl z pozitivních (bílých) kolonií izolován bakmid (viz 4.11.3) a přítomnost vloženého genu byla analyzována pomocí PCR (viz 4.11.10). Poté byl rekombinantní bakmid využit pro transfekci hmyzích buněk Sf9 (viz 4.9.6). Po transfekci bylo sebráno médium obsahující rekombinantní bakulovirus. Toto virové inokulum bylo dále použito na infekci hmyzích buněk Sf9 (viz 4.9.8), aby byl zvýšen infekční titr rekombinantního bakuloviru. Následně bylo opět sebráno virové inokulum, přičemž pomocí plakových zkoušek byl určen přesný titr. Toto virové inokulum bylo použito pro produkci rekombinantních proteinů v hmyzích buňkách Sf9 (4.12.1).

4.13. Imunizace a vyhodnocení protilátkové odpovědi

4.13.1 Použité myši

Pro testování připravených vakcín byly použity myši BALB/c (Velaz) staré 6-10 týdnů, přičemž byly imunizovány samice.

4.13.2 Imunizace myší DNA vakcínami

Plasmidová DNA byla nejprve nanášena na zlaté partikule (průměr 1 µm, Biorad). Imunizace byla provedena pomocí Gene gunu (Biorad), přičemž byl použit tlak 400 psi a nastřelena byla

oholená kůže břicha. Myši byly celkem imunizovány 3 dávkami DNA vakcín, přičemž mezi každou dávkou byl 14 denní interval. Jedna imunizační dávka představovala dávku 2 µg DNA (1 µg DNA/náboj) plasmidu kódujícího antigen a 2 µg DNA plasmidu kódujícího imunostimulační cytokin. Celkový obsah na jednu imunizační dávku tak činil 4 µg DNA. V případě využití pouze plasmidu kódujícího antigen byly plasmidy kódující cytokiny nahrazeny plasmidy pBSC. Jako negativní kontrola byly využity myši imunizované plasmidem pBSC (4 µg/dávka). Deset dní po poslední dávce byly myši usmrceny a byla odebrána krev, která byla ponechána 30 minut při pokojové teplotě. Následně byla centrifugována při 500 g po dobu 5 minut a bylo odebráno sérum, které bylo následně analyzováno.

4.13.2 Imunizace myší chimérickými pentamerami

Myši byly imunizovány intraperitoneálně 3 dávkami chimérických pentamer, přičemž mezi každou dávkou byl 14 denní interval. Jedna imunizační dávka představovala dávku 50 µg chimérických pentamer. Jako negativní kontrola byly využity myši imunizované PBS. Deset dní po poslední dávce byly myši usmrceny a byla odebrána krev, která byla ponechána 30 minut při pokojové teplotě. Následně byla centrifugována při 800 g po dobu 5 minut a bylo odebráno sérum.

4.13.3 Detekce protilátek cílených proti PCV2 Cap proteinu pomocí metody ELISA

Do Maxisorp Nunc-Immuno 96 jamkové destičky (Thermo Scientific) bylo napipetováno 100 µl lyzátu/jamku PK-15 buněk infikovaných pomocí PCV2 (c= 20 µg/ml). Jako negativní kontrola bylo do jamek napipetováno PBS. Následovala inkubace přes noc při 4 °C. Poté byla destička 3x promyta PBS/Tween-20 (0.1%). Poté bylo do každé jamky napipetováno 200 µl 2% odtučněného mléka v PBS a proběhla inkubace po dobu 2 hodin při pokojové teplotě. Následně bylo přidáno 100 µl vhodně naředěného séra ve 2% odtučněném mléce v PBS (1:50, 1:250, 1:1250, 1:6250, 1:31000) z imunizovaných myší a proběhla inkubace při pokojové teplotě po dobu 1 hodiny. Destička byla poté promyta 5x pomocí PBS/Tween-20 (0.1%) a byla přidána sekundární protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou. Po 1 hodině inkubace při pokojové teplotě byla destička opět promyta 5x pomocí PBS/Tween-20 a bylo přidáno 100 µl substrátového roztoku ATBS (Sigma). Absorbance byla měřena při 415 nm pomocí přístroje ELISA Reader (BioTek).

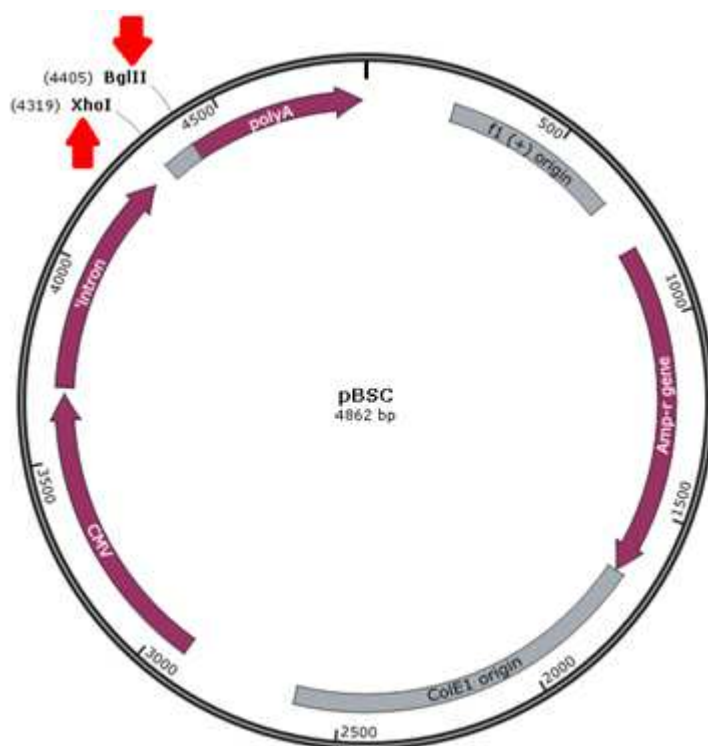
4.13.4 Neutralizační testy

Schopnost protilátek inhibovat infekci PCV2 *in vitro* byla otestována tak, že byly využity PK-15 buňky narostlé na mikroskopických sklíčkách ve 24 jamkové destičce. Pro infekci těchto buněk bylo využito virové inokulum PCV2 s infekčním titrem $TCID_{50}=10^{4,7}$ (získáno od Dr. Pšikala). Na infekci bylo použito 75 μ l virového inokula smíchaného s 25 μ l séra z imunizovaných myší. Z důvodu vysoké spotřeby PCV2 virového inokula byla séra z každé imunizované skupiny spojena (3 myši) a pro neutralizační testy bylo zvoleno ředění séra 1:40. Z několika studií je totiž patrné, že v případě PCV2 je toto ředění séra optimální pro vyhodnocení neutralizační schopnosti testovaných sér (Dong et al., 2013; Wang et al., 2007). Pro určení míry inhibice bylo také k 75 μ l virového inokula přidáno 25 μ l séra z myší imunizovaných PBS v případě využití chimérických pentametr a plasmidem pBSC v případě DNA vakcinace. Následně bylo takto smíchané inokulum ponecháno inkubovat při laboratorní teplotě pod dobu 1 hodiny. Poté bylo inokulum přidáno k PK-15 buňkám a hodinu inkubováno při teplotě 37 °C. Dále bylo přidáno 900 μ l DMEM média s 5% FBS a po 36 hodinách bylo množství infikovaných buněk určeno pomocí nepřímé imunofluorescence (viz 4.9.10).

5 Výsledky

5.1 Příprava expresních plasmidů nesoucích různé varianty PCV2 Cap proteinu a plasmidů nesoucích imunostimulační cytokiny pro účely DNA vakcinace

Jedním z hlavních faktorů pro vývoj DNA vakcín je schopnost eukaryotického expresního plasmidu zajistit účinnou expresi vloženého proteinu *in vivo*. Pro účel vývoje DNA vakcín proti PCV2 byl proto získán od RNDr. Michala Šmahela, Ph.D. plasmid pBSC (obr. 6). Plasmid pBSC obsahuje bakteriální replikační počátek ColE1 a gen pro ampicilinovou rezistenci, což umožňuje izolaci toho plasmidu z bakteriálních kultury *Escherichia coli*. Dále plasmid pBSC obsahuje silný cytomegalovirový promotor zajišťující expresi v eukaryotických buňkách. Pro zesílení exprese vloženého proteinu je v plasmidu také přítomna sekvence intronu z králíčího betaglobinu a poly A místo z králíčího betaglobinu.



Obrázek 6 : Mapa plasmidu pBSC. Podrobná DNA sekvence plasmidu pBSC i s popisem jednotlivých DNA sekvencí byla získána od RNDr. Michala Šmahela, Ph.D. Schématická mapa plasmidu byla poté vytvořena pomocí programu SnapGene. Červené šipky označují restrikční místa, která byla využita pro vložení vybraných kódujících sekvencí.

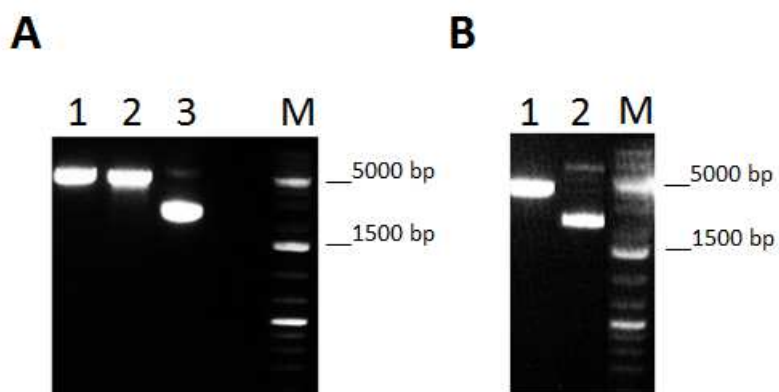
Za účelem testování účinnosti DNA vakcín byly vytvořeny plasmidy nesoucí různé formy PCV2 Cap proteinu. Byl připraven plasmid nesoucí celou sekvenci PCV2 Cap proteinu, ale také plasmid kódující zkrácenou verzi PCV2 Cap proteinu fúzanou se signální sekvencí interleukinu 2 (IL-2), přičemž tato forma PCV2 Cap proteinu by měla být cílená do sekreční dráhy. Důvodem využití této sekretované formy PCV2 Cap proteinu vychází ze

studie Fan et al. (2008), kde bylo zjištěno, že sekretovaná verze PCV2 Cap proteinu vyvolává mnohem vyšší tvorbu neutralizačních protilátek. Pro posílení imunogenicity byly navíc připraveny další plasmidy nesoucí sekvence imunomodulačních cytokinů. Jedním z testovaných cytokinů byl tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- α). Plasmid kódující tento cytokin byl využit v případě testování DNA vakcíny proti viru slintavky a kulhavky, přičemž koimunizace s využitím plasmidu kódujícího TNF- α vedla ke značnému zesílení imunitní odpovědi (Su et al., 2008). Dále za účelem zvýšení účinnosti DNA vakcinace byl připraven expresní plasmid nesoucí sekvenci interferonu alfa1 (IFN- α 1).

5.1.1 Konstrukce expresních plasmidů

5.1.1.1 Příprava plasmidu pBSC pro inzerci vybraných DNA sekvencí

Plasmid pBSC byl vnesen pomocí elektroporace do bakterií *Escherichia coli* TOP 10 a transformované kolonie byly vyselektovány na agarových plotnách s ampicilinem. Vybraná kolonie byla zaočkována do LB média s ampicilinem a byl vyizolován plasmid pBSC pomocí GenElute HP Plasmid Miniprep kitu (Sigma). Následně bylo provedeno kontrolní štěpení pomocí XhoI a BglII, pro ověření přítomnosti pBSC plasmidu (obr. 7A).



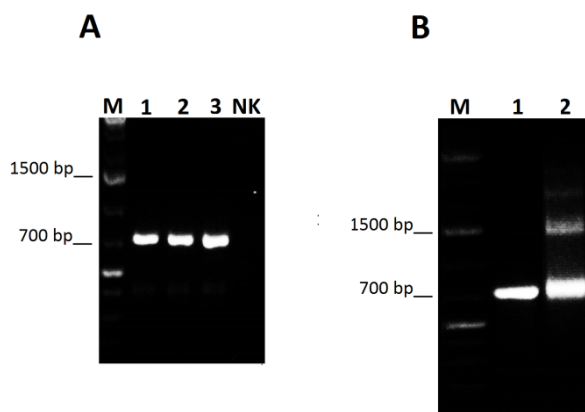
Obrázek 7 : A) Kontrolní restriční štěpení plasmidu pBSC pomocí XhoI (1) a pomocí BglII (2). Pro kontrolu byl nanesen také neštěpený plasmid (3). M=marker molekulových vah; B) Naštěpený plasmid pBSC pomocí BglII a XhoI (1), pro kontrolu byl přidán neštěpený plasmid pBSC (2). M=marker molekulových vah

Po ověření úspěšné izolace pBSC plasmidu, byl tento plasmid nejdříve naštěpený pomocí XhoI, přečištěn pomocí fenol/chloroformové extrakce a DNA byla vysrážena pomocí ethanolu. Následně byl již linearizovaný vektor naštěpen pomocí BglII, defosforylován pomocí alkalické fosfatázy a opět přečištěn pomocí fenol/chloroformové extrakce a vysrážen pomocí ethanolu. Úspěšnost naštěpení byla ověřena agarózovou elektroforézou (obr. 7B).

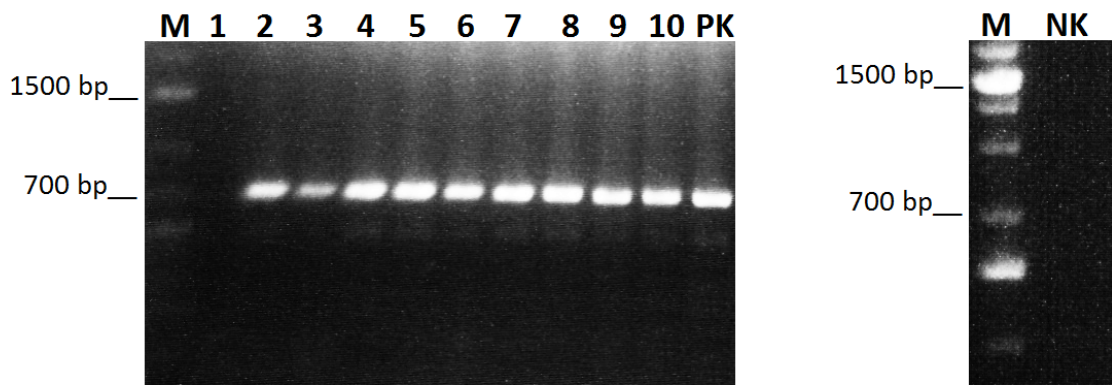
Takto připravený linearizovaný vektor pBSC byl použit pro tvorbu všech konstruktů pro účely DNA vakcinace.

5.1.1.2 Příprava plasmidu pBSC-CAP

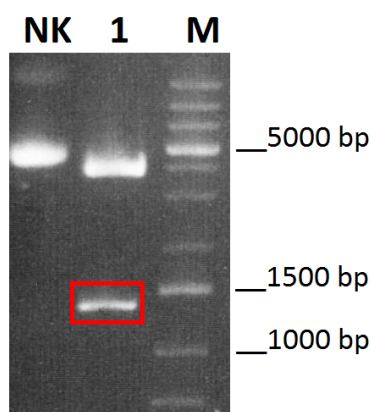
Plasmid pBSC-CAP byl vytvořen vložím DNA sekvenční PCV2 Cap proteinu do plasmidu pBSC, přičemž byly využity restrikční místa XhoI a BglII, které se nacházejí v pBSC (obr. 6). DNA sekvenční PCV2 Cap proteinu byla amplifikována pomocí PCR (obr. 8A), přičemž jako templát sloužil plasmid pKLON-CAP (získán od Dr. Pšikala) a byly použity primery CAP_XHOI_FW a CAP_BGLII_REV (viz 4.3). Vzniklé PCR produkty byly přečištěny pomocí High Pure PCR Product Purification kitu (Roche) a naštěpeny pomocí XhoI a BglII. Naštěpení bylo potvrzeno ligací naštěpených sekvencí (obr. 8B). Toto ověření již nebylo provedeno u dalších konstruktů, neboť byly použity stejné restrikční enzymy a velmi podobný byl i design primerů. Připravené inserty byly následně ligovány do předem připraveného linearizovaného vektoru pBSC. Ligační směsí byly následně transformovány elektrokompetentní bakterie *Escherichia coli* TOP 10. Narostlé bakteriální kolonie byly testovány na přítomnost pBSC-CAP pomocí PCR z bakteriálních kolonií (viz 4.11.11; obr. 9). Z pozitivních bakteriálních kolonií 4, 5 a 6 byl po kultivaci izolován plasmid. Přítomnost vložené DNA sekvenční byla otestována restrikčním štěpením (obr. 10) a sekvenací (vloženého insertu). Z bakteriální kolonie 4 byl následně vyizolován pomocí EndoFree Plasmid Maxi kitu (Qiagen) plasmid pBSC-CAP pro transfekci savčích buněk.



Obrázek 8: A) Amplifikace DNA sekvenční PCV2 Cap proteinu pomocí PCR. Velikost amplifikované sekvenční by měla být 726 bp. Byl využit teplotní gradient pro zjištění optimální teploty nasedání primerů, přičemž byla použita teplota 52 °C (1), 55°C (2) a 58 °C (3). NK=negativní kontrola (bez templátu), B) Analýza tvorby konkatamerů amplifikované sekvenční PCV2 Cap proteinu naštěpené pomocí BglII a XhoI (2), jako kontrola byla využita směs bez T4 DNA ligázy (1), M=marker molekulových vah



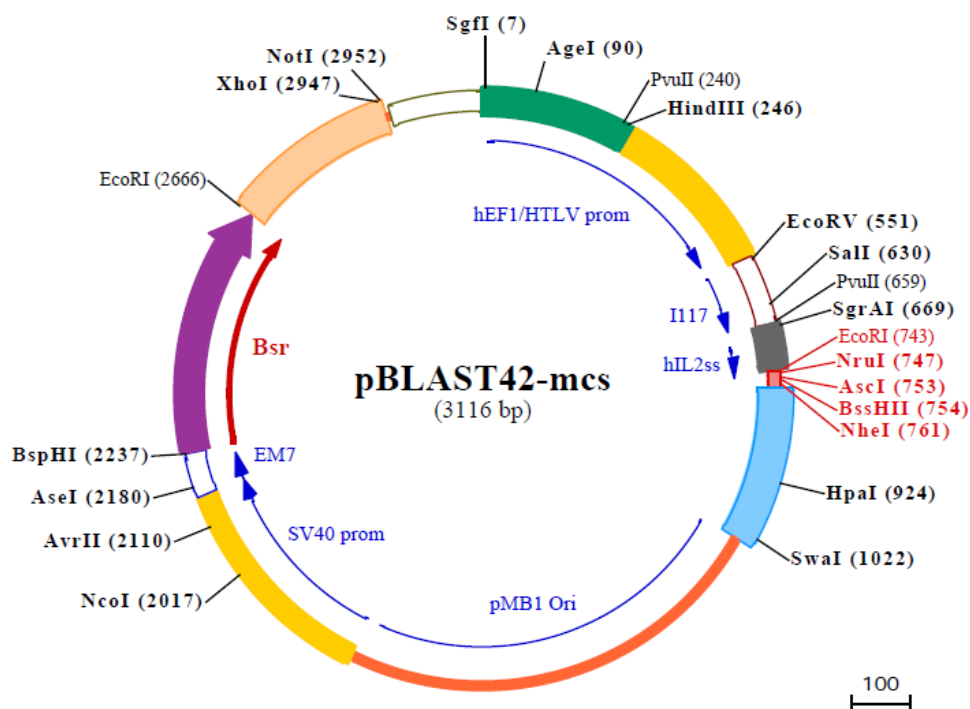
Obrázek 9: Detekce přítomnosti plasmidu pBSC-CAP pomocí colony PCR. Pro PCR použity stejné primery jako pro klonování konstruktu. Teplota nasedání primerů nastavena na 58 °C. Velikost amplifikované sekvence by proto měla být 726 bp. Celkem bylo testováno 10 vybraných bakteriálních monoklonií (1-10). PK=pozitivní kontrola (templát pKON-CAP), NK=negativní kontrola (bez templátu), M=marker molekulových vah



Obrázek 10: Restriční štěpení plasmidu pBSC-CAP pomocí BglII a SalI pro ověření úspěšnosti klonování. Po štěpení bylo možné detekovat DNA fragment (červený rámeček), jehož velikost by měla být 1371 bp. Jako negativní kontrola (NK) byl použit neštěpený plasmid. M=marker molekulových vah

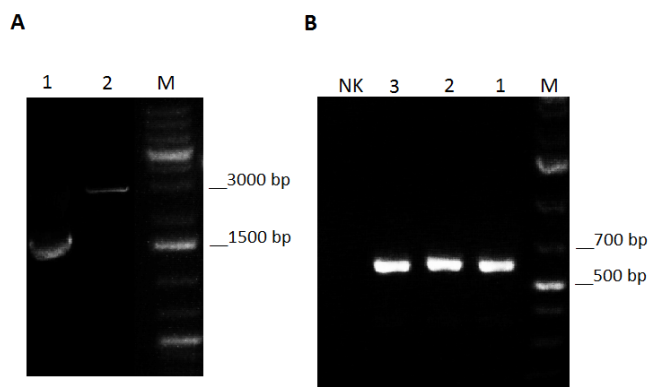
5.1.1.3 Příprava plasmidu pBSC-IL2ssΔN41Cap

Tento konstrukt byl vytvořen vložím fúzované sekvence kódující PCV2 Cap protein se signální sekvencí IL-2 do plasmidu pBSC. PCV2 Cap protein byl pro tento účel zkrácen o 41 N-terminálních aminokyselin, neboť tyto aminokyseliny vytvářejí nukleární lokalizační signal (NLS) (Liu et al., 2001). Pro přidání signální sekvence IL-2 k N-konci zkráceného Cap proteinu byl využit plasmid pBLAST42 (Invivogen; obr. 11), který obsahuje signální sekvenci IL-2 a také vhodná restriční místa, přes které je možné vložit za IL-2 signální sekvenci zvolenou DNA sekvenci a vytvořit tak produkt určený k cílení do sekreční dráhy.

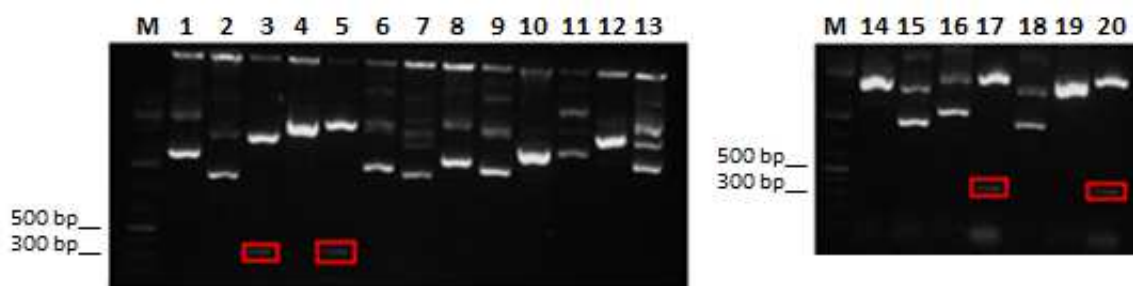


Obrázek 11: Mapa plasmidu pBLAST42-mcs. Restrikční místa NruI a NheI (červeně) byla využita pro vložení zkrácené sekvence Cap proteinu za DNA sekvenci kódující signální sekvenci interleukinu 2. Obrázek byl získán z příloženého manuálu (Invivogen).

Plasmid pBLAST42 byl vnesen pomocí elektroporace do elektrokompetentních bakterií *Escherichia coli* SCS110. Z transformovaných kolonií byl pomocí GenElute HP Plasmid Miniprep kitu (Sigma) vyizolován plasmid pBLAST42, který byl naštěpen pomocí NruI a NheI a defosforylován pomocí alkalické fosfatázy. Štěpení bylo ověřeno pomocí agarózové elektroforézy (obr. 12A). DNA Sekvence PCV2 Cap proteinu zkráceného o sekvenci kódující 41 N-koncových aminokyselin byla získána pomocí PCR (obr. 12B), přičemž jako templát sloužil plasmid pKLON-CAP (získán od Dr. Pšikala). Byly použity primery CAPdelece_NruI_FW a CAPdelece_NheI_REV (viz 4.3). PCR produkty byly poté naštěpeny pomocí NruI a NheI. Připravené inserty byly ligovány do linearizovaného plasmidu pBLAST42 a ligační směsí byly transformovány elektrokompetentní bakterie *Escherichia coli* SCS110. Úspěšnost klonování byla zjištěna pomocí minipreparace plasmidové DNA z narostlých bakteriálních monoklonií a následným restrikčním štěpením pomocí XbaI a NheI (obr. 13). Plasmidy izolované z bakteriálních kolonií 5, 17 a 20 byly následně sekvenovány (vložený insert). Plasmid pBLAST42-ΔN41Cap byl poté vyizolován z bakteriální kolonie 5.



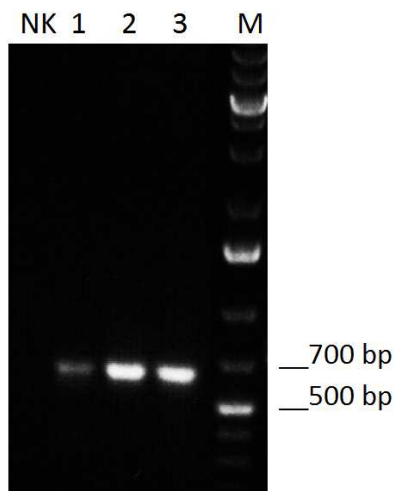
Obrázek 12: A) Linearizovaný plasmid pBLAST-42 pomocí enzymů NruI a NheI (2), jako kontrola použit neštěpený plasmid (1). M=marker molekulových vah; B) Amplifikace DNA sekvenace zkráceného PCV2 Cap proteinu pomocí PCR. Velikost amplifikované sekvenace by měla být 603 bp. Byl využit teplotní gradient pro zjištění optimální teploty nasedání primerů, přičemž byla použita teplota 52 °C (1), 55 °C (2) a 58 °C (3). NK=negativní kontrola (bez templátu), M=marker molekulových vah



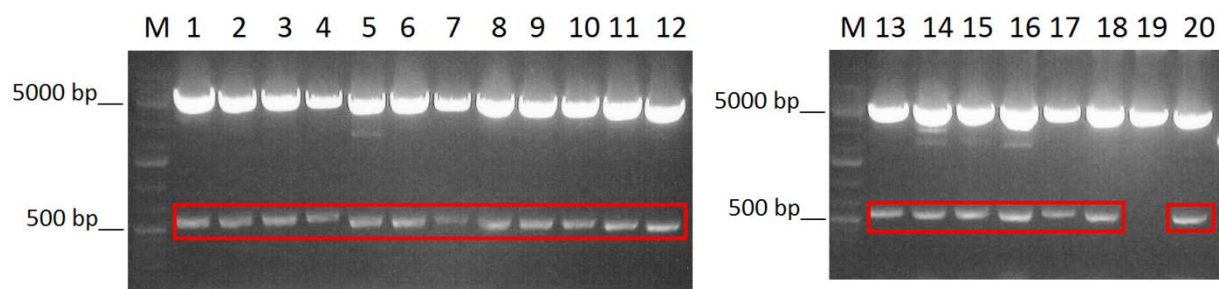
Obrázek 13: Restrikční štěpení plasmidů pro ověření přítomnosti plasmidu pBLAST42-ΔN41Cap v transformovaných koloniích (1-20). DNA fragmenty o velikosti zhruba 329 bp určující úspěšnost klonování jsou označeny v červeném rámečku. M=marker molekulových vah

Plasmid pBLAST42-ΔN41Cap byl poté využit jako templát pro amplifikaci DNA sekvenace kódující zkrácenou formu PCV2 Cap proteinu obsahující na N-konci signální sekvenci IL-2. Pro tuto amplifikaci byla zvolena metoda PCR (Obr. 14). Pro PCR byly využity primery IL2_XHOI_FW a CAP_BGLII_REV (viz 4.3). PCR produkty byly následně štěpeny pomocí restrikčních enzymů XhoI a BglII a vloženy za pomoci T4 DNA ligázy do linearizovaného vektoru pBSC. Ligační směsi byly následně transformovány elektrokompetentní bakterie *Escherichia coli* TOP 10. Úspěšnost klonování byla zjištěna pomocí minipreparace plasmidové DNA z narostlých bakteriálních monoclonií a následným restrikčním štěpením pomocí BglII a Bsp68I (obr. 15). Z pozitivních bakteriálních kolonií 1, 2 a 9 byly vyizolovány plasmidy, přičemž přítomnost vložené sekvenace byla ověřena sekvenací (vloženého insertu).

Z bakteriální kolonie 1 byl vyizolován pomocí EndoFree Plasmid Maxi kitu (Qiagen) plasmid pBSC-IL2ssΔN41Cap vhodný pro transfekci savčích buněk.



Obrázek 14. Amplifikace DNA sekvence kódující zkrácenou formu PCV2 Cap proteinu s N-terminální signální sekvencí IL-2. Velikost amplifikované sekvence by měla být 666 bp. Byl využit teplotní gradient pro zjištění optimální teploty nasedání primerů, přičemž byla použita teplota 49 °C (1), 52 °C (2) a 55 °C (3). NK=negativní kontrola, M=marker molekulových vah

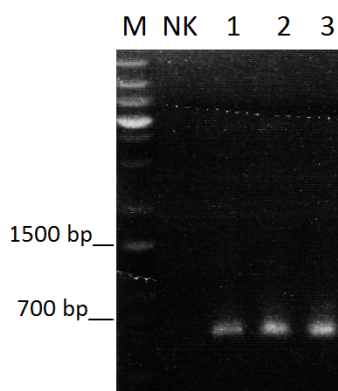


Obrázek 15: Restrikční štěpení plasmidů pro ověření přítomnosti plasmidu pBSC-IL2ssΔN41Cap v transformovaných bakteriálních koloniích (1-20). DNA fragmenty o velikosti 585 bp určující úspěšnost klonování jsou označeny v červeném rámečku. M=marker molekulových vah

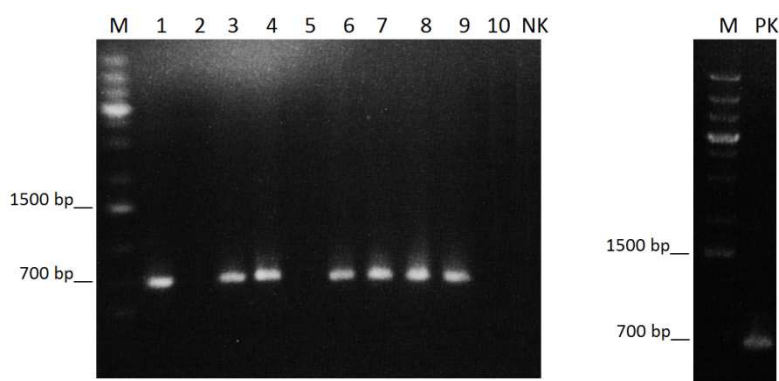
5.1.1.4 Příprava plasmidu pBSC-IL2ssΔN41Cap-HIS

Tento konstrukt je podobný konstruktu pBSC-IL2ssΔN41Cap, nicméně z důvodu usnadnění detekce sekretovaného PCV2 Cap protein byla na C-konec PCV2 Cap proteinu přidána hexahistidinová kotva (His-tag). Sekvence zkráceného PCV2 Cap proteinu (ΔN41) fúzaného s IL-2 signální sekvencí a obsahující C-koncovou sekvenci kódující His-tag byla získána pomocí PCR (obr. 16), přičemž jako templát sloužil plasmid pBLAST42-ΔN41Cap a byly využity primery IL-2_XHOI_FW a delCAPhis_BglII_REV (viz 4.3). Získané PCR produkty byly naštěpeny pomocí restrikčních enzymů XhoI a BglII. Takto připravené DNA sekvence byly ligovány s linearizovaným plasmidem pBSC a ligační směsí byly

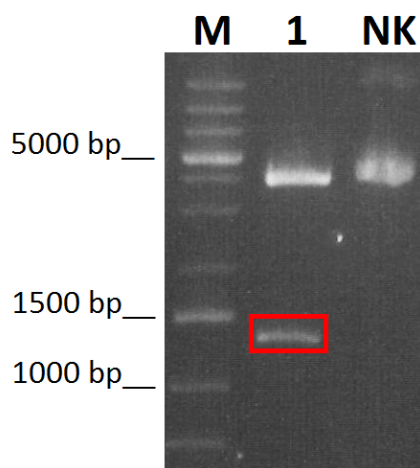
transformovány elektrokompetentní bakterie *Escherichia coli* TOP 10. Úspěšnost klonování byla testována pomocí colony PCR (viz 4.11.11; obr. 17). Z pozitivních bakteriálních kolonií 4, 5 a 6 byl po kultivaci izolován plasmid. Přítomnost vložené DNA sekvence byla dále otestována restrikčním štěpením (obr. 18) a sekvenací (vloženého insertu). Z bakteriální kolonie 4 byl následně vyizolován pomocí EndoFree Plasmid Maxi kitu (Qiagen) plasmid pBSC-CAP pro transfekci savčích buněk.



Obrázek 16. Amplifikace DNA sekvence kódující zkrácenou formu PCV2 Cap proteinu s N-terminální signální sekvencí IL-2 a C-koncovým His-tagem. Výsledný PCR produkt by měl mít velikost 672 bp. Byl využit teplotní gradient pro zjištění optimální teploty nasedání primerů, přičemž byla použita teplota 49 °C (1), 52 °C (2) a 55 °C (3). NK=negativní kontrola (bez templátu), M=marker molekulových vah



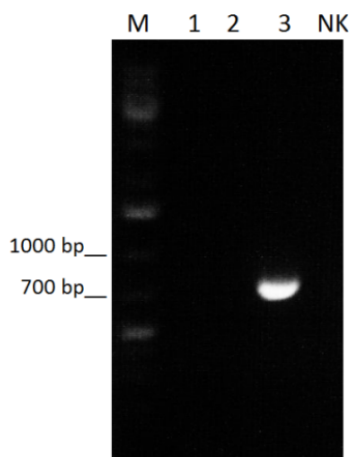
Obrázek 17: Detekce přítomnosti plasmidu pBSC-IL2ssΔN41Cap-HIS pomocí colony PCR. Pro PCR použity stejné primery jako pro klonování konstruktu. Teplota nasedání primerů nastavena na 55 °C. Výsledný PCR produkt by proto měl mít velikost 672 bp. Celkem bylo testováno 10 vybraných bakteriálních monoklonií (1-10). PK=pozitivní kontrola (templát pBLAST42-ΔN41Cap), NK=negativní kontrola (bez templátu), M=marker molekulových vah



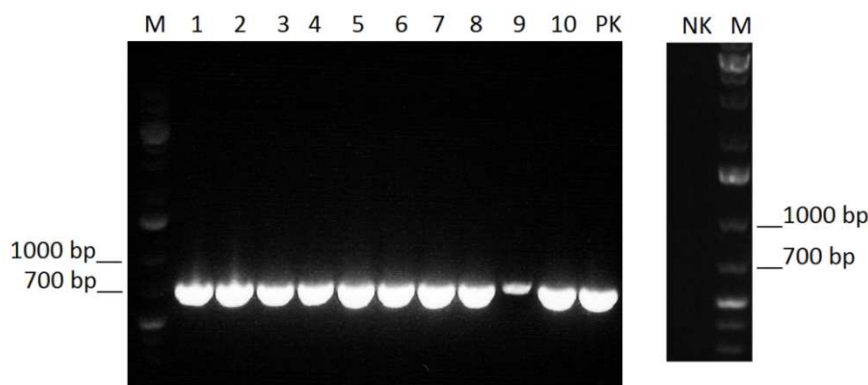
Obrázek 18: Restrikční štěpení plasmidu pBSC-IL2ssΔN41Cap-HIS pomocí BglII a SalI pro ověření úspěšnosti klonování. Po štěpení bylo možné detekovat DNA fragment (červený rámeček), jehož velikost by měla být 1329 bp. Jako negativní kontrola (NK) byl použit neštěpený plasmid. M=marker molekulových vah

5.1.1.4 Příprava plasmidu pBSC-TNF- α

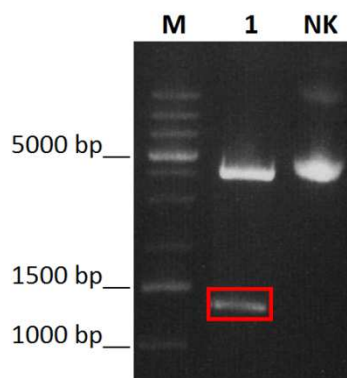
Plasmid pBSC-TNF- α byl vytvořen vložením DNA sekvence kódující tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- α) do plasmidu pBSC. Sekvence TNF- α byla amplifikována pomocí PCR (obr. 18), přičemž jako templát sloužil plasmid pUC57-TNF- α (Genescript). Použity byly primery TNFa_XHOI_FW a TNFa_BGLII_REV (viz 4.3). Vzniklé PCR produkty byly naštěpeny pomocí XhoI a BglII. Připravené inserty byly následně ligovány do předem připraveného linearizovaného vektoru pBSC. Ligační směsí byly poté transformovány elektrokompetentní bakterie *Escherichia coli* TOP 10. Vybrané bakteriální monokolonie byly testovány na přítomnost pBSC- TNF- α pomocí colony PCR (viz 4.11.11; obr. 19). Plasmid vyizolovaný z pozitivních bakteriálních kolonií 4, 5 a 7 byl sekvenován (vložený insert) a přítomnost vložené sekvence byla potvrzena také restrikčním štěpením (obr. 20). Z bakteriální kolonie 4 byl vyizolován pomocí EndoFree Plasmid Maxi kitu (Qiagen) plasmid pBSC-TNF- α vhodný pro transfekci savčích buněk.



Obrázek 18. Amplifikace TNF- α DNA sekvence. Výsledná velikost vzniklého PCR produktu by měla být 732 bp. Byl využit teplotní gradient pro zjištění optimální teploty nasedání primerů, přičemž byla použita teplota 50 °C (1), 53 °C (2) a 55 °C (3). NK=negativní kontrola (bez templátu), M=marker molekulových vah



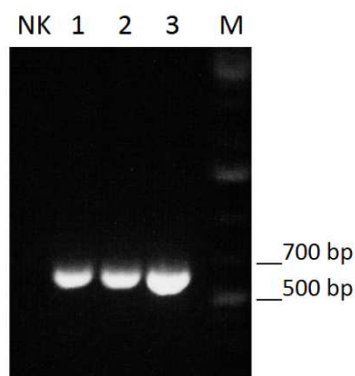
Obrázek 19: Detekce přítomnosti plasmidu pBSC-TNF- α v transformovaných bakteriích pomocí colony PCR. Pro PCR použity stejné primery jako pro klonování konstruktu. Teplota nasedání primerů nastavena na 55 °C. Výsledná velikost vzniklého PCR produktu by tak měla být 732 bp. Celkem bylo testováno 10 vybraných bakteriálních monoclonií (1-10). PK=pozitivní kontrola (pUC57-TNF- α), NK=negativní kontrola (bez templátu), M=marker molekulových vah



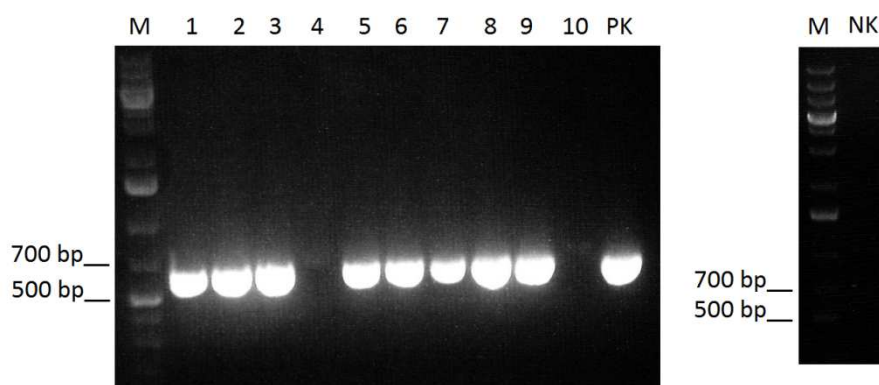
Obrázek 20: Restrikční štěpení plasmidu pBSC-TNF- α pomocí BglII a SalI pro ověření úspěšnosti klonování. Po štěpení bylo možné detekovat DNA fragment (červený rámeček), jehož velikost by měla být 1377 bp. Jako negativní kontrola (NK) byl použit neštěpený plasmid. M=marker molekulových vah

5.1.1.4 Příprava plasmidu pBSC- IFNA1

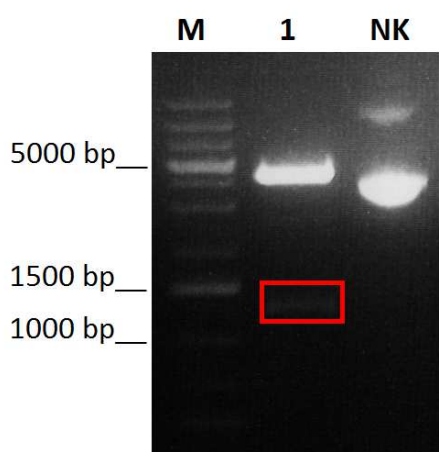
Tento plasmid byl vytvořen vložением DNA sekvenec kódující interferon alfa 1 (IFN- α 1) do plasmidu pBSC. Sekvence IFN- α 1 byla amplifikována pomocí PCR (obr. 21), přičemž byly použity primery IFNa1_XHOI_FW a IFNa1_BglII_REV (viz 4.3). Vzniklé PCR produkty byly naštěpeny pomocí XhoI a BglII. Takto připravené inserty byly následně ligovány do předem připraveného linearizovaného vektoru pBSC. Ligační směs byly transformovány elektrokompetentní bakterie *Escherichia coli* TOP 10. Úspěšnost klonování byla ověřena pomocí colony PCR (viz 4.11.11, obr. 22). Plasmid vyizolovaný z pozitivních bakteriálních kolonií 1, 2 a 3 byl sekvenován (vložený insert) a přítomnost vložené sekvenec byla potvrzena také restrikčním štěpením (obr. 23). Z bakteriální kolonie 3 byl pomocí EndoFree Plasmid Maxi kitu (Qiagen) vyizolován plasmid pBSC-IFNA1 vhodný pro transfekci savčích buněk.



Obrázek 21. Amplifikace IFN- α 1 DNA sekvenec pomocí PCR. Výsledná velikost PCR produktu by měla být 594 bp. Byl využit teplotní gradient pro zjištění optimální teploty nasedání primerů, přičemž byla použita teplota 52 °C (1), 55 °C (2) a 58 °C (3). NK=negativní kontrola (bez templátu), M=marker molekulových vah



Obrázek 22: Detekce přítomnosti plasmidu pBSC-IFNA1 v transformovaných bakteriích pomocí colony PCR. Pro PCR použity stejné primery jako pro klonování konstruktu. Teplota nasedání primerů nastavena na 58 °C. Výsledná velikost PCR produktu by tak měla být 594 bp. Celkem bylo testováno 10 vybraných bakteriálních monoklonií (1-10). PK=pozitivní kontrola (pUC57-IFNA1), NK=negativní kontrola (bez templátu), M=marker molekulových vah



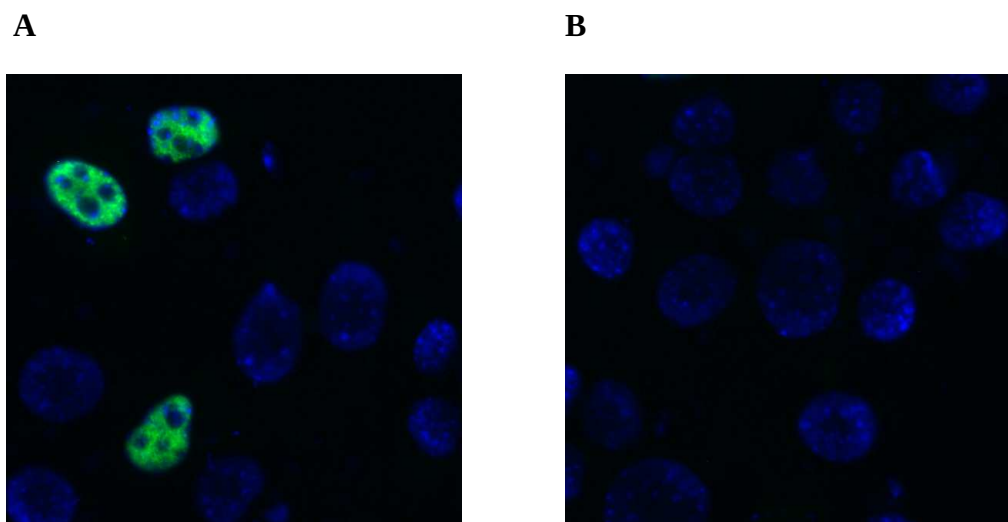
Obrázek 23: Restrikční štěpení plasmidu pBSC-IFNA1 pomocí BglII a SalI pro ověření úspěšnosti klonování. Po štěpení bylo možné detekovat DNA fragment (červený rámeček), jehož velikost by měla být 1239 bp. Jako negativní kontrola (NK) byl použit neštěpený plasmid. M=marker molekulových vah

5.1.2 Ověření exprese vložených genů *in vitro*

Expres vložení genů do plasmidu pBSC byla před vlastní imunizací ověřena pomocí transfekce myších buněčných kultur, přičemž produkované proteiny byly detekovány několika různými metodami.

5.1.2.1 Ověření exprese PCV2 Cap proteinu z plasmidu pBSC-CAP

Plasmidem pBSC-CAP byly pomocí turbofectu (Fermentas) transfekovány myší buňky WOP. Jako negativní kontrola byly použity buňky transfekované plasmidem pBSC. Po 24 hodinách byly buňky zafixovány pomocí paraformaldehydu a PCV2 Cap protein byl detekován pomocí nepřímé imunofluoresce. Jako primární protilátka (ředění 1:250) byla použita komerční myší protilátka proti PCV2 Cap proteinu (Biotech). Jako sekundární protilátka sloužila Oslí monoklonální protilátka (ředění 1:1000) proti myším imunoglobulinům konjugovaná s Alexa Fluor 488 (Life Technologies). Jádra buněk byla obarvena pomocí DAPI a poté byla lokalizace PCV2 Cap proteinu sledována pomocí fluorescenčního mikroskopu. PCV2 Cap protein byl detekován pouze v buňkách transfekovaných plasmidem pBSC-CAP, přičemž PCV2 Cap protein byl lokalizován v jádře (obr. 24A). Jaderná lokalizace PCV2 Cap proteinu byla popsána také v práci Liu et al. (2001). Příčinou jaderné lokalizace je přítomnost jaderného lokalizačního signálu (NLS) na N-konci PCV2 Cap proteinu. Naopak v buňkách transfekovaných plasmidem pBSC (obr. 24B) nebyl PCV2 Cap protein detekován.



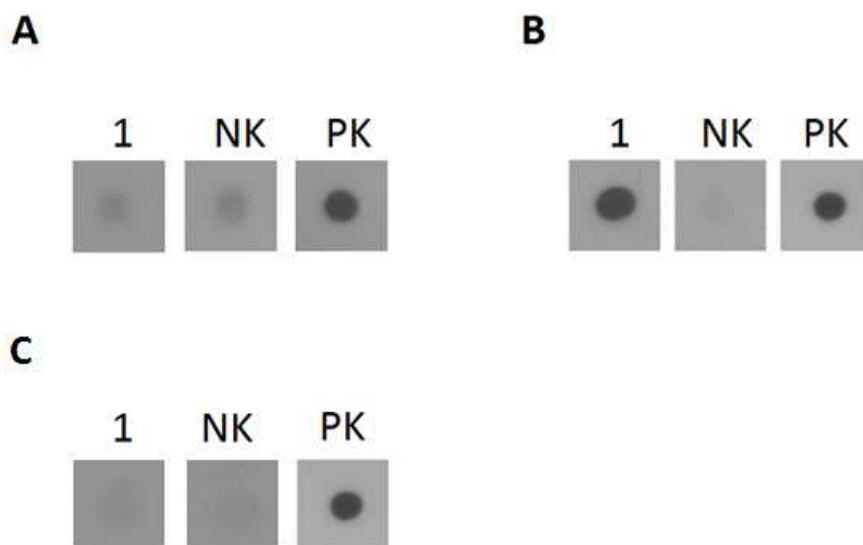
Obrázek 24: Detekce PCV2 Cap proteinu pomocí nepřímé imunofluorescence. Pro vizualizaci byla použita komerční primární protilátka proti PCV2 Cap proteinu, proti které byla cílena sekundární protilátka s konjugovaným fluoroforem Alexa Fluor 488 (zeleně). Jádra buněk byly obarveny pomocí DAPI (modře). A) Myší buňky WOP transfekované plasmidem pBSC-CAP. PCV2 Cap protein (zeleně) vykazuje jadernou lokalizaci. B) Negativní kontrola. Myší buňky WOP transfekované plasmidem pBSC, zde signál proteinu PCV2 Cap chybí.

5.1.2.2 Ověření exprese sekretované verze PCV2 Cap proteinu z plasmidu pBSC-IL2ssAN41Cap

Připravený plasmid pBSC-IL2ssAN41Cap byl použit pro transfekci buněčné linie WOP. Jako negativní kontrola byly použity buňky WOP transfekované plasmidem pBSC. Nicméně pomocí nepřímé imunofluorescence s použitím komerční monoklonální protilátky proti PCV2 Cap proteinu (Biotech) nebylo možné detekovat sekretovanou formu PCV2 Cap proteinu v transfekovaných buňkách (data neuvedena).

Sekretovaná verze PCV2 Cap proteinu zřejmě nemohla být detekována v buňkách, neboť dochází k rychlé sekreci a množství toho proteinu uvnitř buněk je tedy malé. Z toho důvodu bylo 24 hodin po transfekci buněk odebráno médium, které bylo použito pro detekci sekretované formy PCV2 Cap proteinu pomocí metody Dot blot. Jako negativní kontrola bylo použito médium odebrané z buněk transfekovaných plasmidem pBSC. Ani tímto přístupem ovšem nebylo možno pomocí komerční myší protilátky proti PCV2 Cap proteinu (Biotech) detekovat sekretovanou formu PCV2 Cap proteinu v médiu (Obr. 25A). Také použitím C6C10/B1 myší monoklonální protilátky cílené proti PCV2 Cap proteinu, nebylo možné detekovat sekretovanou verzi Cap proteinu (Obr. 25C). Nicméně pomocí C1C6/H9 myší monoklonální protilátky cílené proti PCV2 Cap proteinu bylo možné detekovat sekretovanou verzi PCV2 Cap proteinu (Obr. 25B). Abychom ověřili, zda po sekreci nedochází k degradaci

PCV2 Cap proteinu, byl tento konstrukt modifikován přidáním His-tagu na C-konec sekretované formy PCV2 Cap proteinu. Sekretovaný protein může být přes tuto kotvu purifikován a může být navíc použita proti této kotvě vhodná protilátka.



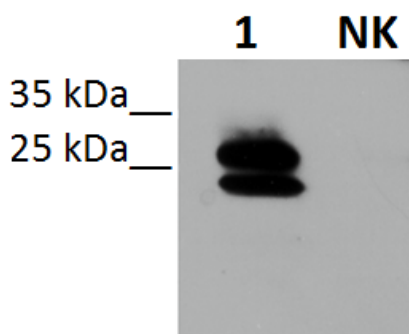
Obrázek 25: Detekce sekretované formy PCV2 Cap proteinu pomocí metody Dot blot. A) Detekce pomocí primární komerční myší protilátky proti PCV2 Cap proteinu (Biotech), přičemž bylo testováno médium odebráno 24 hodin po transfekci WOP buněk plasmidem pBSC-IL2ssΔN41Cap (1), NK=médium odebráno z buněk WOP transfekovaných plasmidem pBSC, PK=PCV2 virus; B) Detekce použitím C1C6/H9 myší monoklonální protilátky. Bylo testováno médium odebráno 24 hodin po transfekci WOP buněk plasmidem pBSC-IL2ssΔN41Cap (1), NK=médium odebráno z buněk WOP transfekovaných plasmidem pBSC, PK=PCV2 virus; C) Detekce použitím C6C10/B1 myší monoklonální protilátky, přičemž bylo testováno médium odebráno 24 hodin po transfekci buněk WOP plasmidem pBSC-IL2ssΔN41Cap (1), NK=médium odebráno z WOP buněk transfekovaných plasmidem pBSC, PK=PCV2 virus

5.1.2.3 Ověření exprese sekretované verze PCV2 Cap proteinu obsahující C-koncový

His-tag

Jak již bylo zmíněno, tento konstrukt byl připraven z důvodu obtížné detekce sekretované formy PCV2 Cap proteinu. Výhodou His-tagové kotvy je možnost purifikace proteinu z média a také použití protilátky vhodné na imunodetekci po SDS-PAAGE a Western blotu. Díky tomuto přístupu mohla být určena také stabilita proteinu po sekreci do média, neboť jednou z možných hypotéz byla rychlá degradace PCV2 Cap proteinu po sekreci. Pomocí nukleofekce (Amaxa) byly transfekovány buňky WOP plasmidem pBSC-IL2ssΔN41Cap-His , přičemž 24 hodin po transfekci bylo odebráno médium. Jako negativní kontrola sloužilo médium odebrané z buněk WOP, které byly transfekovány prázdným plasmidem pBSC. Poté byla sekretovaná forma PCV2 Cap proteinu purifikována pomocí kitu Dynabeads His-Tag Isolation and Pulldown (Invitrogen). Stejný postup purifikace byl

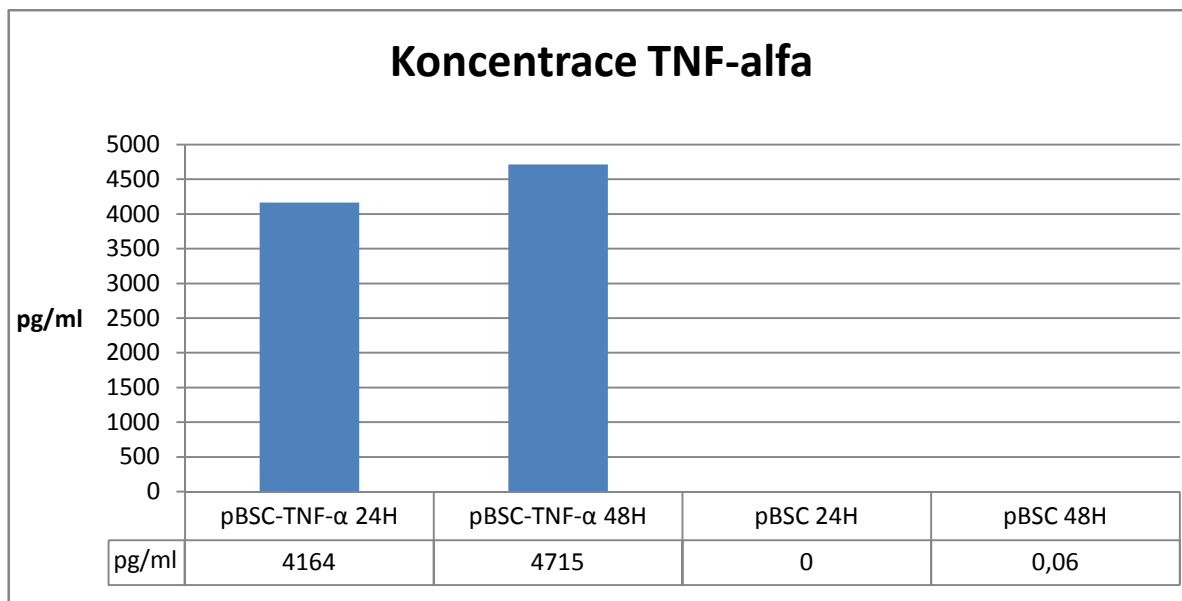
proveden také v případě negativní kontroly. Vzorky byly rozděleny pomocí SDS-PAAGE a přebíly na nitrocelulózovou membránu pomocí Western blotu. Následovala imunodetekce pomocí myší monoklonální protilátky cílené proti His-tagové kotvě (ředění 1:250, Penta). Pomocí tohoto přístupu bylo možné detekovat sekretovanou formu PCV2 Cap proteinu (obr. 26). Byly navíc detekovány dvě formy sekretovaného PCV2 Cap proteinu, přičemž pravděpodobným vysvětlením může být postranlační modifikace jedné z forem, neboť PCV2 Cap protein obsahuje několik potencionálních míst, která mohou být posttranslačně modifikovány například glykosylací (Liu et al., 2001). Přesná forma posttranslační modifikace nebyla ovšem dále studována.



Obrázek 26: Imunodetekce sekretované formy PCV2 Cap proteinu po SDS-PAAGE a Western blotu. Pro detekci byla použita primární protilátka cílená proti His-tagové kotvě a sekundární protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou. Teoretická velikost sekretované formy PCV2 Cap proteinu by měla být 23,21 kDa. Bylo použito médium odebrané z WOP buněk transfekovaných plasmidem pBSC-IL2ssΔN41Cap-His (1) a také médium z WOP buněk transfekovaných pomocí plasmidu pBSC (NK).

5.1.2.4 Ověření exprese TNF- α z plasmidu pBSC-TNF- α

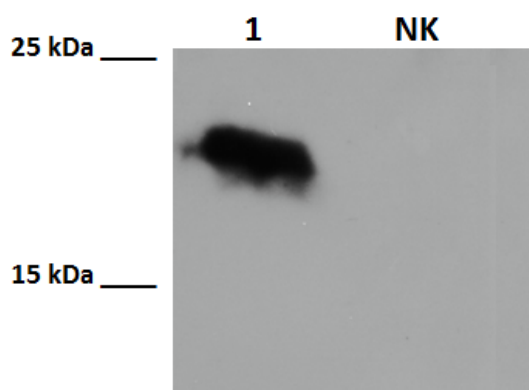
Plasmid pBSC-TNF- α byl použit pro transfekci myší buněčné linie 3T6, přičemž 24 hodin a 48 hodin po transfekci bylo odebráno médium z těchto buněk. Médium bylo stočeno a množství TNF-alfa bylo stanoveno ze supernatantu pomocí TNF alpha ELISA Kit (Life Technologies). Toto měření bylo provedeno Mgr. Zuzanou Zákostelskou, PhD. (Mikrobiologický Ústav AV ČR). Pomocí standardu TNF- α , který je součástí komerčního kitu, byla stanovena koncentrace TNF- α v testovaných supernatantech. Ze stanovených hodnot byl následně vytvořen graf (obr. 22), ze kterého je patrné, že pouze v supernatantech odebraných z buněk transfekovaných pomocí pBSC-TNF- α bylo možné detekovat znatelně vyšší koncentraci TNF- α . Jako negativní kontrola sloužil supernatant získaný odebráním média z buněk 3T6, které byly transfekovány plasmidem pBSC.



Obrázek 27: Stanovení koncentrace TNF-alfa ze supernatantů odebraných z buněk 3T6 transfekovaných plasmidem pBSC- TNF-alfa a plasmidem pBSC (NK).

5.1.2.4 Ověření exprese IFN- α 1 z plasmidu pBSC-IFNA1

Pro ověření produkce interferonu alfa1 byl použit podobný postup jako v případě detekce TNF- α . Nejprve byly pomocí nukleofekce (Amaza) transfekovány myší buňky WOP plasmidem pBSC- IFNA1, přičemž 24 hodin po transfekci bylo odebráno médium. Jako negativní kontrola sloužilo médium odebrané z WOP buněk transfekovaných pomocí plasmidu pBSC. Vzorky byly následně rozděleny pomocí SDS-PAAGE a přebíly na nitrocelulózovou membránu pomocí Western blotu. Následně byla provedena imunodetekce (obr. 28), přičemž jako primární protilátka byla použita králičí polyklonální protilátka proti interferonu alfa1 (ředění 1:200, BioVision). Jako sekundární protilátka byla použita koží monoklonální protilátka cílená proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou (ředění 1:1000, Life Technologies). Tímto přístupem byla ověřena exprese IFN- α 1 z plasmidu pBSC- IFNA1.



Obrázek 28: Imunodetekce IFN- α 1 (19 kDa) po SDS-PAAGE a Western Blotu. Byl použit supernatant získaný z WOP buněk transfekovaných plasmidem pBSC-IFNA1 (1). NK=supernatant získaný z buněk WOP transfekovaných plasmidem pBSC.

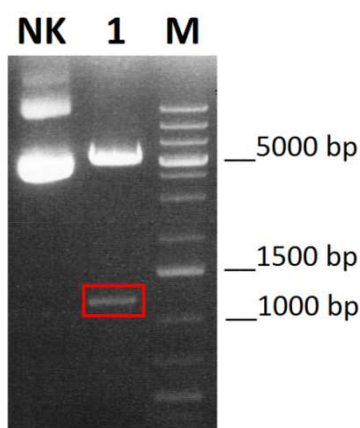
5.2 Příprava a izolace chimerických pentamer VP1 kapsidového proteinu myšího polyomaviru fúzovaného s PCV2 Cap proteinem obsahujícím aminokyselinové substituce v imunodominantním epitopu

Základním pilířem chimérických pentamer je VP1 kapsidový protein myšího polyomaviru k jehož C-konci byla přidána sekvence PCV2 Cap proteinu. Tento konstrukt byl exprimován v bakulovirovém expresním systému a takto připravené chimérické pentamery vykazovaly schopnost indukce protilátkové odpovědi, včetně protilátek schopných inhibovat infekci PCV2 *in vitro* (Fraiberk et al., nepublikované výsledky). Přestože chimérické pentamery vykazují schopnost indukce tvorby neutralizačních protilátek, není zcela jasné, jestli imunodominantní epitop popsáný v práci Tribble et al. (2012) může v případě těchto chimérických konstruktů odvádět protilátkovou odpověď od protektivních epitopů, neboť tento epitop je pravděpodobně v případě chimérických pentamer dostupný pro protilátkovou odpověď. Jedním z cílů této práce byla proto úprava chimérických pentamer, kde byla pomocí cílené mutagenese upravena aminokyselinová sekvence imunodominantního epitopu. Mezi kritické aminokyseliny podílející se na konformaci imunodominantního epitopu patří tyrosin na pozici 173, fenylalanine na pozici 174 a glutamine na pozici 175 (Tribble et al., 2011). Všechny tyto aminokyseliny byly substituovány alaninem. Pomocí systému Bac-to-Bac byl vytvořen rekombinantní bakulovirus, který byl využit k produkci chimérických pentamer. Tyto pentamery byly vyizolovány a připraveny pro imunizaci a vyhodnocení efektu AK změn v imunodominantním epitopu PCV2 Cap proteinu.

5.2.1 Příprava rekombinantního bakuloviru

5.2.1.1 Úprava plasmidu pFastBac1-VP1-CAP-HIS pomocí cílené DNA mutagenese

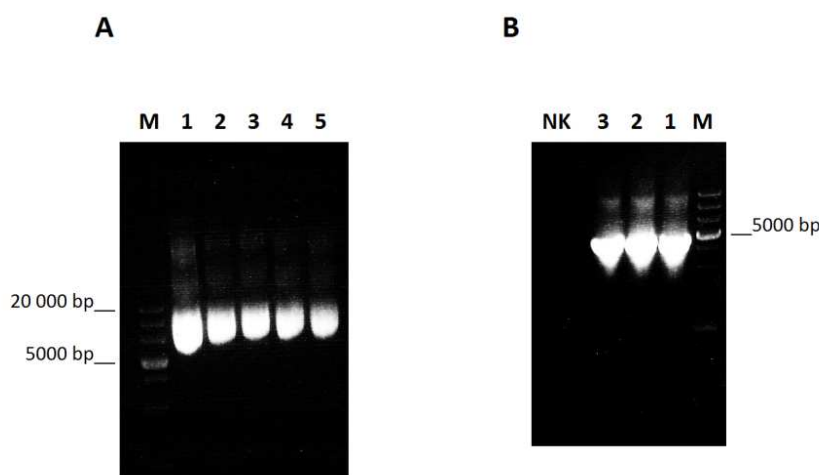
Plasmid pFastBac1-VP1-CAP-HIS vznikl vložím fúzované DNA sekvence VP1 proteinu s DNA sekvencí PCV2 Cap proteinu obsahující navíc C-koncovou DNA sekvenci kódující His-tag do plasmidu pFastBac1. Tento plasmid byl již dříve připraven v naší laboratoři Mgr. Martinem Fraiberkem. Plasmid pFastBac1-VP1-CAP-HIS sloužil jako templát pro mutagenezní PCR, přičemž cílená mutagenese DNA sekvence PCV2 Cap proteinu byla provedena pomocí komerčního kitu GENEART Site-Directed Mutagenesis System (Life Technologies). Nejprve byly navrženy mutagenezní primery CAPIM _ FW a CAPIM_ REV (viz 4.3). Tyto primery jsou komplementární k DNA sekvenci PCV2 Cap proteinu, nicméně střední část primerů obsahuje nekomplementární DNA sekvenci kódující alaninový triplet, přičemž tato nekomplementární DNA sekvence nahradila DNA sekvenci PCV2 Cap proteinu kódující tyrosin na pozici 173, fenylalanin na pozici 174 a glutamin na pozici 175. PCR produkty byly podrobeny rekombinační reakci a následně byly využity pro transformaci chemokompetentních buněk *Escherichia coli* DH5 α -T1. Byly vybrány 3 bakteriální monokolonie, ze kterých byl poté izolován plasmid označený jako pFastBac1-VP1-CAPIM-HIS, přičemž tento plasmid byl sekvenován (vložený insert) a restrikně štěpen pomocí BamHI (obr. 29). Plasmid pFastBac1-VP1-CAPIM-HIS izolovaný z bakteriální kolonie 1 byl následně použit pro transformaci bakteriálních buněk *E.coli* DH10Bac.



Obrázek 29: Restrikní štěpení plasmidu pFastBac1-VP1-CAPIM-HIS pomocí BamHI, přičemž by měl být vyštepěn fragment o velikosti zhruba 1150 bp (červený rámeček). Jako negativní kontrola byl použit neštěpený plasmid.

5.2.1.2 Transformace bakteriálních buněk *E.coli* DH10Bac a izolace rekombinantního bakmidu

Bakteriálních buňky *E.coli* DH10Bac byly pomocí elektroporace transformovány plasmidem pFastBac1-VP1-CAPIM-HIS. Bakterie byly vysety na vhodné selekční plotny obsahující navíc IPTG induktor a X-gal. Po dvou dnech kultivace bylo vybráno 5 pozitivních kolonií (bílé zbarvení), ze kterých byl vyizolován rekombinantní bakmid. Ten byl analyzován pomocí agaróзовé elektroforézy (obr. 30A). Izolované rekombinantní bakmidy z bakteriálních kolonií 1, 2 a 3 byly následně testovány na přítomnost vloženého insertu pomocí PCR (obr. 30B), přičemž byly použity primery pUC/M13_FW a pUC/M13_REV (viz 4.3). Výsledná velikost PCR produktu by měla být zhruba 4,2 kbp. Rekombinantní bakmid izolovaný z bakteriální kolonie 1 byl následně použit pro transfekci hmyzích buněk Sf9.

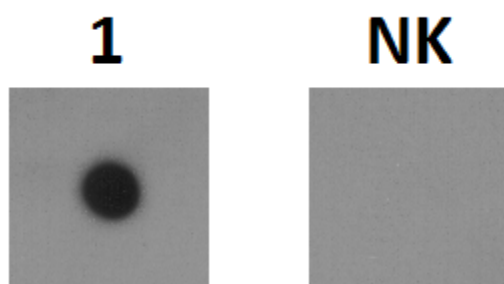


Obrázek 30: A) Analýza izolovaných rekombinantních bakmidů z bakteriálních kolonií 1-5 (1-5). B) Ověření vložení insertu do rekombinantního bakmidu pomocí PCR, přičemž jako templát byly použity rekombinantní bakmidy vyizolované z bakteriálních kolonií 1-3 (1-3). Výsledná velikost PCR produktu by měla být zhruba 4,2 kbp. Jako negativní kontrola byla použita PCR bez templátu (NK).

5.2.1.2 Příprava rekombinantního bakuloviru

Vhodně připravené hmyzí buňky Sf9 byly pomocí Cellfectinu (Invitrogen) transfekovány rekombinantním bakmidem, přičemž bylo použito 5 μ l bakmidové DNA. Jako kontrola byly použity netransfekované buňky Sf9, přičemž po 5 dnech bylo provedeno srovnání pomocí světelného mikroskopu. Hmyzí buňky Sf9 vykazovaly 5 dní po transfekci známky bakulovirové infekce, neboť byla pozorována zvětšená jádra, zvětšené buňky, změna tvaru buněk, zastavení buněčného růstu a počáteční známky buněčné lýze. Všechny tyto popsané znaky nebyly pozorovány u netransfekovaných buněk Sf9. Netransfekované buňky

Sf9 oproti transferovaným dosáhly v této fázi experimentu plné konfluence. Po 5 dnech bylo z transfekovaných buněk odebráno médium, které bylo centrifugováno 7 minut při 800 g. Po centrifugaci byl odebrán supernatant. Tento supernatant byl označen P1, neboť již obsahoval rekombinantní bakulovirus. P1 virové inokulum bylo dále použito pro infekci hmyzích buněk Sf9, aby byl zvýšen infekční titr virového inokula. Po 5 dnech po infekci bylo možné opět pozorovat známky infekce bakulovirem, přičemž bylo opět odebráno médium a po centrifugaci bylo získáno virové inokulum. Zbylé infikované buňky Sf9 byly lyzovány pomocí RIPA pufru a lyzát byl otestován na přítomnost exprimovaného proteinu pomocí metody Dot blot, přičemž na nitrocelulózovou membránu bylo nanášeno 1,5 µl připraveného lyzátu (obr. 31). Pro detekci byla použita myší protilátka cílená proti His-tagové kotvě (ředění 1:200, Penta), která byla vložena na C-konec PCV2 Cap proteinu. Jako sekundární protilátka byla využita kozí protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou (ředění 1:1000, Life Technologies).

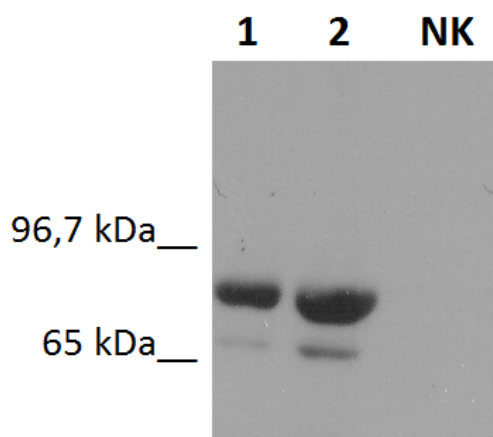


Obrázek 31: Ověření exprese chimérických pentamer pomocí Dot blotu. Pro detekci bylo na nitrocelulózovou membránu nanášeno 1,5 µl lyzátu Sf9 buněk infikovaných pomocí rekombinantního bakuloviru (1). Jako negativní kontrola byl použit lyzát z neinfikovaných buněk Sf9 (NK).

5.2.1.3 Ověření exprese rekombinantního proteinu a zjištění optimální doby exprese

Připravený rekombinantní bakulovirus byl využit pro infekci hmyzích buněk Sf9, přičemž buňky byly sklizeny 72 hodin a 96 hodin po infekci, pro zjištění optimální doby produkce rekombinantního proteinu. Navíc byla znovu ověřena exprese rekombinantního proteinu. Sklizené buňky byly lyzovány a proteiny byly rozděleny pomocí SDS-PAAGE. Následně byly proteiny přebírány na nitrocelulózovou membránu pomocí Western blotu. Pro detekci byla opět využita myší protilátka cílená proti His-tagové kotvě (ředění 1:200, Penta). Jako sekundární protilátka byla použita kozí protilátka cílená proti myším imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou (ředění 1:1000, Life Technologies). Protein VP1-CAPIM-His o velikosti 71,43 kDa bylo možné detekovat 3 den i 4 den po infekci (obr. 32). Minoritní pruh, který bylo možné detekovat, pravděpodobně představuje částečně

degradovaný protein. Pro následnou produkci a izolaci chimérických pentamer byla zvolena doba 96 hodin po infekci.



Obrázek 32: Imunodetekce proteinu VP1-CAPIM-His (71,43 kDa). Byly analyzovány lyzáty infikovaných Sf9 buněk připravených 3 dny po infekci (1) a 4 dny po infekci (2). NK=lyzát neinfikovaných Sf9 buněk

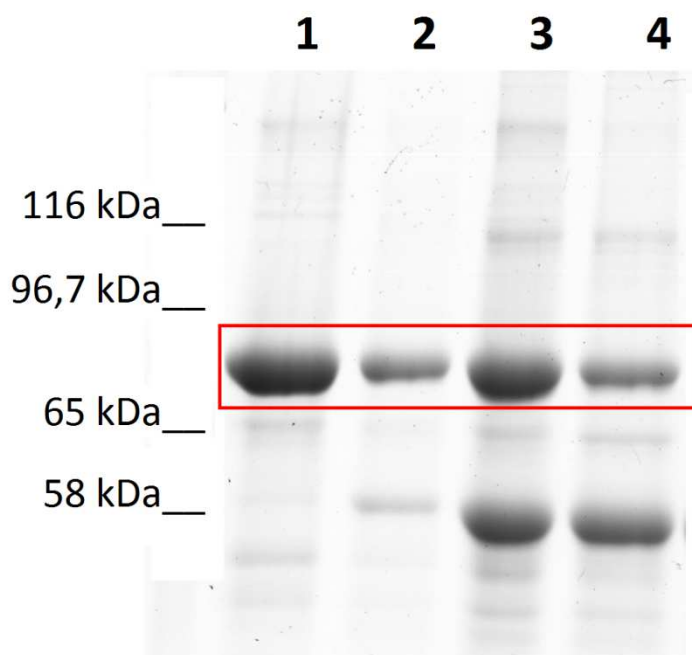
5.2.1.4 Izolace chimérických pentamer

Následně bylo rekombinantním bakulovirem infikováno osm Petriho misek (průměr 10 cm) obsahujících hmyzí buňky Sf9, přičemž čtyři dny po infekci byly buňky sklizeny a byla provedena izolace chimérických pentamer. Sklizené buňky Sf9 byly nejprve centrifugovány při 800 g po dobu pěti minut a buněčný pelet byl resuspendován v pufru B. Poté byl buněčný pelet sonikován, aby byly uvolněny buněčné proteiny. Po sonikaci byla směs opět stočena při 10 000 g po dobu 15 minut pro odstranění buněčné debris. Supernatant byl odebrán a centrifugován při 35 000 RPM na ultracentrifuze (centrifuga Optima L-90K, rotor SW41, Beckman) po dobu tří hodin a teplotě 4°C. Poté byl pelet resuspendován v pufru B. Chimerické pentamery byly následně izolovány pomocí izopyknické centrifugace v cesium chloridovém gradientu, přičemž centrifugace proběhla na ultracentrifuze (centrifuga Optima L-90K, rotor SW 55TI, Beckman) při 25 000 RPM po dobu 22 hodin a teplotě 18 °C. Následně byl cesium chloridový gradient rozebrán na osm frakcí pomocí rozebírače frakcí (Beckman). Pomocí refraktometru ABBE (Carl Zeiss Jena) byl určen refraktometrický index každé frakce (tab. 1). Poté byly podle refraktometrického indexu některé frakce spojeny, přičemž ve výsledku byly získány čtyři výsledné frakce (I-IV). Tyto frakce byly dialyzovány v prostředí pufru B, aby byl odstraněn cesium chlorid. Čistota jednotlivých izolátů byla stanovena pomocí SDS-PAAGE a následném obarvení gelů pomocí Coomassie Brilliant Blue G250 (obr. 33). Frakce I a II byly dále ověřeny na přítomnost chimérického proteinu VP1-

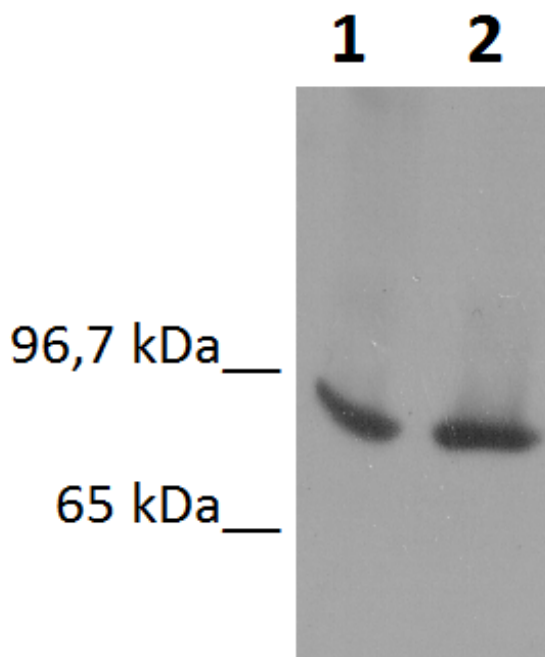
CAPIM-HIS. Proteiny v těchto frakcích byly rozděleny pomocí SDS-PAAGE, následně byly přebírány na nitrocelulózovou membránu pomocí Western blotu a byla provedena imunodetekce VP1-CAPIM-HIS (obr. 34). Pro imunodetekci byla použita jako primární protilátka myší protilátka cílená proti His-tagové kotvě (ředění 1:200, Penta). Jako sekundární protilátka byla použita kozí protilátka cílená proti myším imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou (ředění 1:1000, Life Technologies).

Číslo Frakce	Ref. Index	Výsledná frakce po spojení
1	1,369	I
2	1,368	I
3	1,366	II
4	1,364	III
5	1,362	IV
6	1,36	IV

Tabulka 1: Rozdělení jednotlivých frakcí získaných po centrifugaci v cesium chloridovém gradientu. Podle hodnoty refraktometrického indexu byly frakce spojeny do finálních 4 frakcí (I-IV).



Obrázek 33: Analýza jednotlivých frakcí pomocí SDS-PAAGE a následném obarvení gelů pomocí Coomassie Brilliant Blue G250. Teoretická velikost detekovaného proteinu je 71,43 kDa. Byly analyzovány frakce I-IV (1-4), přičemž detekovaný protein byl označen červeným rámečkem.



Obrázek 34: Imunodetekce proteinu VP1-CAPIM-HIS. Pro detekci byly použity vyizolované frakce I (1) a frakce II (2). Teoretická velikost proteinu by měla být 71,43 kDa.

5.2.1.4 Příprava chimérických pentametr na imunizaci

Pro imunizaci myší byla vybrána vyizolovaná frakce I, přičemž pomocí metody Bradfordové byla určena koncentrace proteinů, která činila 1,63 $\mu\text{g/ml}$. Poté byla frakce I vhodně naředěna pufrům B, aby bylo dosaženo optimálního množství proteinu na jednu vakcinační dávku. Jedna vakcinační dávka představovala 50 μg proteinu v konečném objemu 100 μl pufru B.

5.3 Imunizace myší a vyhodnocení protilátkové odpovědi vyvolané pomocí DNA vakcín a chimérických pentametr

Připravené DNA vakcíny i chimerické pentamery byly použity na imunizaci myší, přičemž následně byla detekována úroveň protilátkové odpovědi proti PCV2 Cap proteinu pomocí metody ELISA. V případě DNA vakcín byl vyhodnocen také koimunizační přístup, neboť byl analyzován efekt plasmidů kódujících imunostimulační cytokiny. Dále byla testována schopnost protilátek neutralizovat PCV2 infekci *in vitro*. Zejména v případě chimérických pentametr byl sledován efekt AK substitucí v imunodominantním epitopu na

ovlivnění produkce neutralizačních protilátek, neboť právě tento epitop podle práce Tribble et al. (2012) odvádí protilátkovou odpověď od protektivních neutralizačních epitopů.

5.3.1 Imunizace myší

5.3.1.1 Imunizace myší připravenými DNA vakcínami

Myši Balb/c byly imunizovány DNA vakcínami pomocí Gene gunu (Biorad), přičemž tyto imunizace byly provedeny RNDr. Michalem Šmahelem, Ph.D. z Ústavu hematologie a krevní transfúze. Jedna vakcinační dávka činila 4 µg DNA, přičemž myši byly imunizovány 3 dávkami a mezi každou dávkou byl interval 14 dnů. Myši imunizované plasmidem pBSC-CAP byly z důvodu nedostatku nábojů v případě třetí dávky imunizovány pouze 2 µg DNA. Z důvodů technické chyby byla vyřazena skupina myší koimunizovaná plasmidy pBSC-IL2ssΔ41NCAP-His a pBSC-IFNA1. Rozdělení imunizovaných skupin viz níže:

1. 3 myši imunizované plasmidem pBSC (4 µg/dávka)
2. 3 myši imunizované plasmidem pBSC-IL2ssΔN41Cap-HIS (2 µg/dávka) + plasmidem pBSC (2 µg/dávka)
3. 3 myši imunizované plasmidem pBSC-IL2ssΔN41Cap-HIS (2 µg/dávka) + plasmidem pBSC-IFNA1 (2 µg/dávka)
4. 3 myši imunizované plasmidem pBSC-Cap (2 µg/dávka; 3 dávka pouze 1 µg) + plasmidem pBSC (2 µg/dávka; 3 dávka pouze 1 µg)
5. 3 myši imunizované plasmidem pBSC-Cap (2 µg/dávka; 3 dávka pouze 1 µg) + plasmidem pBSC-TNF-α (2 µg/dávka; 3 dávka pouze 1 µg)
6. 3 myši imunizované plasmidem pBSC-Cap (2 µg/dávka; 3 dávka pouze 1 µg) + plasmidem pBSC-IFNA1 (2 µg/dávka; 3 dávka pouze 1 µg)

5.3.1.2 Imunizace myší chimérickými pentamerami

Myši Balb/c byly imunizovány intraperitoneálně připravenými chimérickými pentamery, přičemž opět byly použity 3 dávky. Interval mezi každou dávkou byl z časových důvodů zkrácen na 10 dnů. Pro imunizaci pomocí chimérických pentamerů byly použity celkem 3 myši Balb/c a 3 myši Balb/c imunizované pomocí PBS sloužily jako negativní kontrola. Imunizace byly provedeny Mgr. Jiřinou Suchanovou a RNDr. Alenou Drda Morávkovou, MBA, Ph.D.

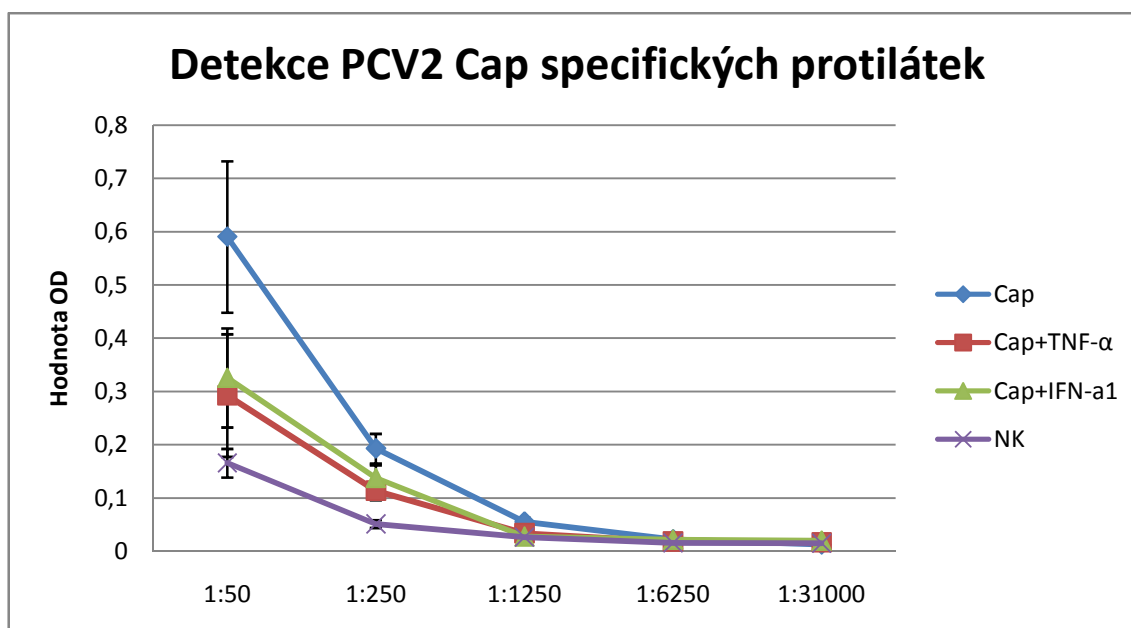
5.3.1.3 Získání sér z imunizovaných myší

Myši imunizované pomocí DNA vakcín a chimérických pentametr byly po 10 dnech po aplikaci poslední imunizační dávky usmrceny a byla odebrána krev. Odebrání krve bylo provedeno RNDr. Alenou Drda Morávkovou, MBA, Ph.D. Krev byla ponechána 30 minut při pokojové teplotě a následně byla stočena při 800 g po dobu 5 minut. Poté bylo odebráno sérum, které bylo dále analyzováno.

5.3.2 Analýza protilátkové odpovědi ze získaných sér

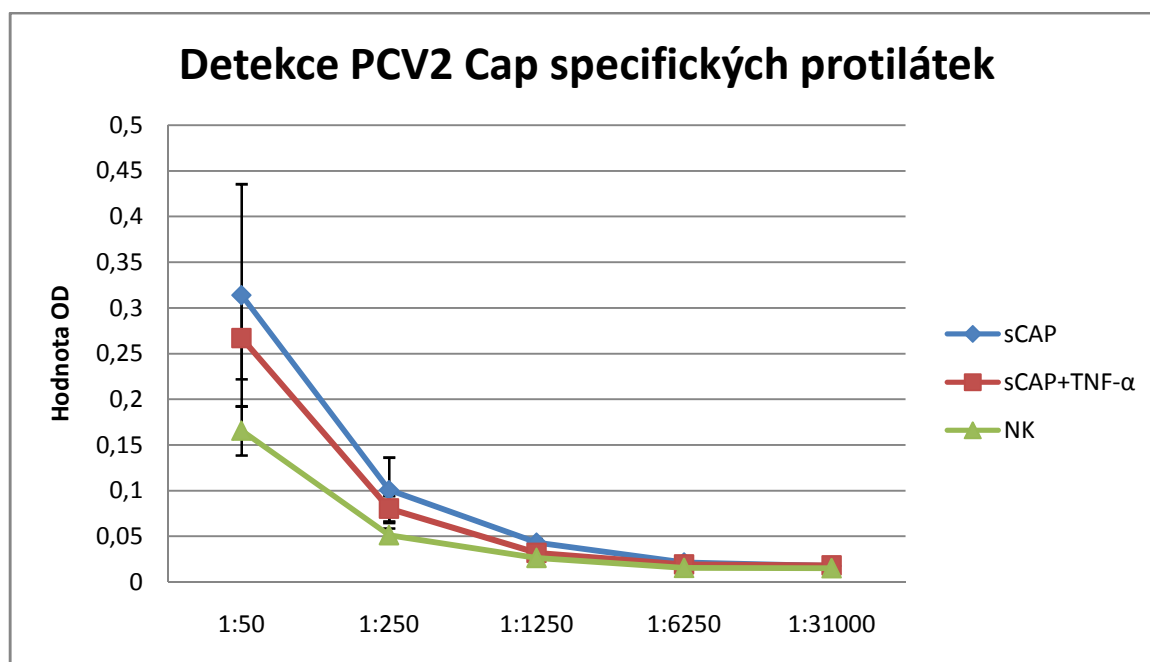
5.3.2.1 Analýza protilátkové odpovědi po DNA vakcinaci

Protilátková odpověď proti PCV2 Cap proteinu byla analyzována ze získaných sér pomocí metody ELISA. Pro detekci byl využit lyzát ledvinových epiteliálních buněk PK-15 infikovaných PCV2. Před vlastní detekcí byla zjištěna, pomocí komerční protilátky proti PCV2 Cap proteinu (Biotech), optimální koncentrace lyzátu pro nanesení na 96 jamkovou destičku, která činila 20 µg/ml. Zároveň byla potvrzena přítomnost PCV2 Cap proteinu v lyzátu, neboť byl použit jako negativní kontrola lyzát neinfikovaných PK-15 buněk (data neuvedena). Tímto přístupem byla nejprve analyzována séra získaná z myší imunizovaných plasmidem kódující PCV2 Cap protein (pBSC-CAP). Pro imunizaci byl použit samotný plasmid pBSC-CAP, popřípadě byl společně s tímto plasmidem použit plasmid kódující TNF- α nebo INF- α 1 s cílem zesílení imunitní odpovědi. Bylo použito vhodné ředění testovaných sér a z výsledků byl následně sestaven graf (obr. 35). Jako negativní kontrola byly použity séra z myší imunizovaných pouze plasmidem pBSC. Bylo zjištěno, že připravené DNA vakcíny jsou schopné vyvolat protilátkovou odpověď proti PCV2 Cap proteinu, nicméně množství protilátek je zřejmě nízké, neboť při vyšším ředění séra velice rychle klesla hodnota naměřené optické denzity. Dalším zajímavým zjištěním je, že plasmidy kódující TNF- α i IFN- α 1 vykazovaly spíše inhibiční efekt, neboť množství detekovaných protilátek bylo nižší u koimunizovaných myší, než u myší imunizovaných pouze plasmidem kódujícím PCV2 Cap protein.



Obrázek 35: Analýza protilátkové odpovědi pomocí metody ELISA. V grafu je znázorněna závislost optické density (osa y) na příslušném ředění séra (osa x). Pro detekci byly použity séra z myši imunizovaných plasmidem pBSC-CAP (modře), plasmidem pBSC-CAP spolu s plasmidem pBSC-TNF- α (červeně) a plasmidem pBSC-CAP spolu s plasmidem pBSC-IFNA1 (zeleně). Jako negativní kontrola byla použita séra z myši imunizovaných plasmidem pBSC (fialově).

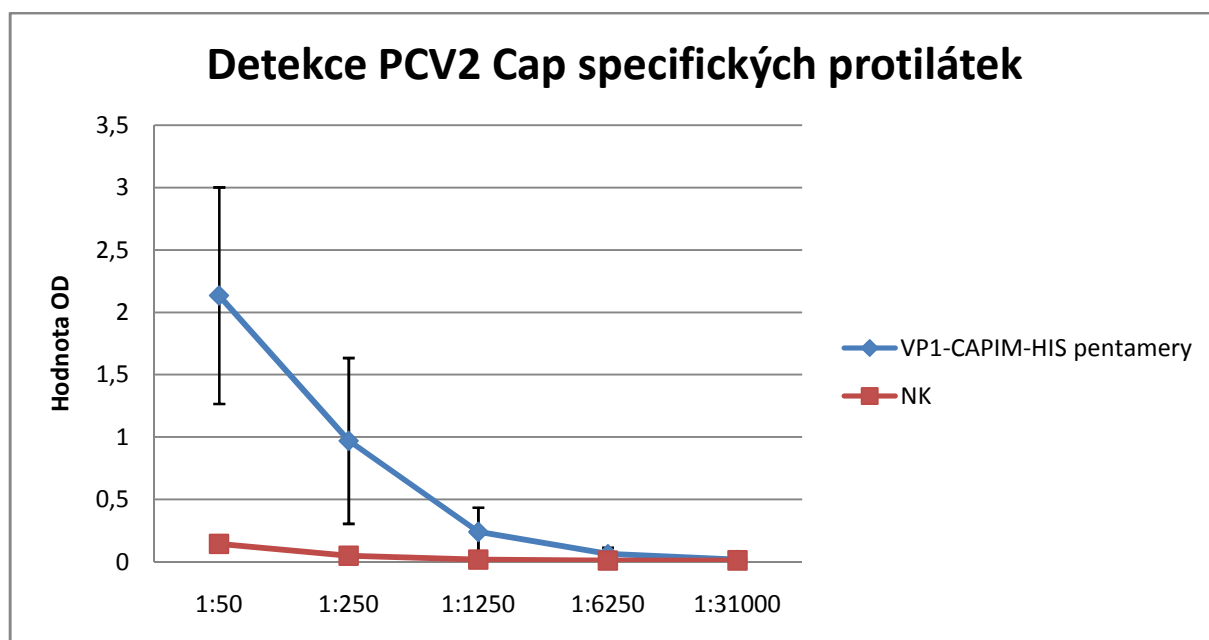
Dále byla analyzována stejným způsobem séra získaná z myši imunizovaných pomocí plasmidu pBSC-IL2ss Δ N41Cap-HIS, přičemž tato forma PCV2 Cap proteinu obsahuje signální sekvenci, která cílí PCV2 Cap protein do sekreční dráhy. Pro imunizaci byl použit samotný plasmid pBSC-IL2ss Δ N41Cap-HIS, popřípadě byl společně s tímto plasmidem použit plasmid kódující TNF- α . Z výsledků byl následně opět sestaven graf (obr. 35). Z naměřených hodnot je patrné, že sekretovaná forma PCV2 Cap proteinu indukuje nižší produkci PCV2 specifických protilátek, než v případě použití plasmidu nesoucí neupravenou sekvenci PCV2 Cap proteinu (pBSC-CAP). Nebyla tak potvrzena dřívější studie provedená Fan et al. (2008), kdy bylo zjištěno, že sekretovaná forma PCV2 Cap proteinu je v případě DNA vakcinace nejúčinnější v indukci protilátkové odpovědi. Koimunizace myši pomocí plasmidu pBSC-IL2ss Δ N41Cap-HIS spolu s plasmidem nesoucím TNF- α navíc, stejně jako v případě plasmidu pBSC-CAP, nevedla ke zvýšení protilátkové odpovědi. Jak již bylo zmíněno, skupina myši komunizovaných pomocí pBSC-IL2ss Δ N41Cap-HIS a pBSC-IFNA1 musela být vyřazena, neboť tyto myši byly omylem navíc imunizovány jednou dávkou zahrnující plasmid pBSC-CAP. Přesto z analyzovaných sér lze zřejmě usoudit, že ani IFN α 1 nezvyšoval protilátkovou odpověď (data neuvedena).



Obrázek 35: Analýza protilátkové odpovědi pomocí metody ELISA. V grafu je znázorněna závislost optické density (osa y) na příslušném ředění séra (osa x). Pro detekci byly použity séra z myši imunizovaných plasmidem pBSC-IL2ss Δ N41Cap-HIS (modře) a plasmidem pBSC-IL2ss Δ N41Cap-HIS spolu s plasmidem pBSC-TNF- α (červeně). Jako negativní kontrola byla použita séra z myši imunizovaných plasmidem pBSC (zeleně).

5.3.2.2 Analýza protilátkové odpovědi po vakcinaci chimérickými pentamerami

Stejným způsobem, jako v případě analýzy protilátkové odpovědi vyvolané pomocí DNA vakcín, byla testována také protilátková odpověď vyvolaná VP1-CAPIM-HIS chimérickými pentamerami. Jako negativní kontrola ovšem byla použita séra z myši imunizovaných PBS. Ze získaných hodnot byl opět vytvořen graf (Obr. 36.). Z grafu je patrné, že VP1-CAPIM-HIS chimérické pentamery indukují relativně silnou protilátkovou odpověď cílenou proti PCV2. Z důvodu vysoké protilátkové odpovědi naměřené u jedné myši imunizované VP1-CAPIM-HIS chimérickými pentamerami jsou navíc v grafu patrné značné odchylky. Důvod vysoké protilátkové odpovědi naměřené u této myši není ovšem znám. VP1-CAPIM-HIS chimérické pentamery jsou tak stejně jako testované DNA vakcíny schopné indukovat v myších protilátkovou odpověď proti PCV2, přičemž tato protilátková odpověď je mnohem silnější než v případě testovaných DNA vakcín.

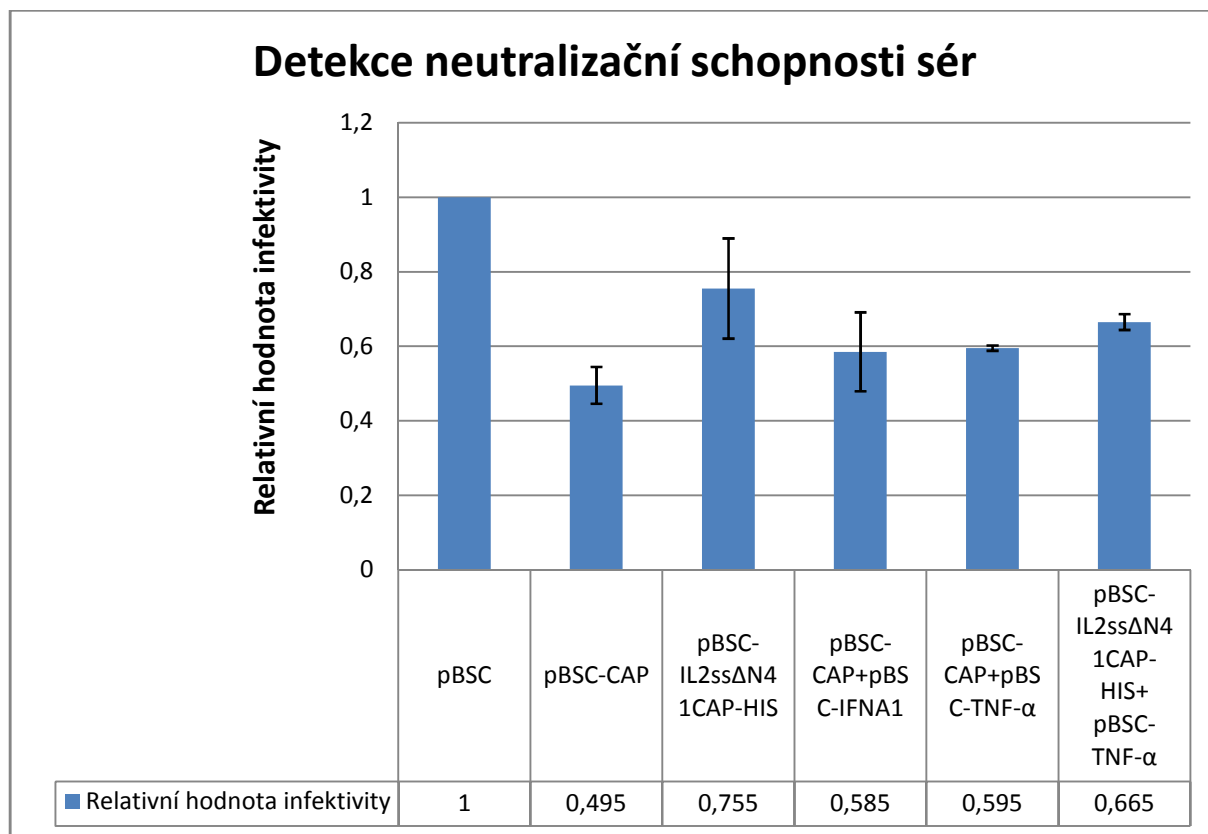


Obrázek 36: Analýza protilátkové odpovědi pomocí metody ELISA. V grafu je znázorněna závislost optické density (osa y) na příslušném ředění séra (osa x). Pro detekci byla použita séra z myši imunizovaných VP1-CAPIM-HIS pentamerami (modře). Jako negativní kontrola byla použita séra z myši imunizovaných PBS (červeně).

5.3.2.3 Detekce schopnosti protilátek neutralizovat PCV2 infekci *in vitro*

Dále byla testována schopnost protilátek inhibovat PCV2 infektivitu *in vitro*. Na 24 jamkovou destičku s mikroskopickými sklíčky byly vysety prasečí ledvinové buňky PK-15. Z důvodu vysoké spotřeby PCV2 virového inokula byla séra z každé imunizované skupiny spojena (3 myši) a pro neutralizační test bylo zvoleno ředění séra 1:40. Následně byl teplotně deaktivován komplement v získaných sérech a 25 μ l příslušného séra bylo smícháno se 75 μ l PCV2 virového inokula ($TCID_{50}=10^{4,7}$). Směs byla přidána k buňkám PK-15 a zhruba 36 hodin po infekci bylo množství infikovaných buněk stanoveno pomocí nepřímé imunofluorescence. Pro detekci byla použita myší protilátka cílená proti PCV2 Cap proteinu (ředění 1:500, Biotech) a jako sekundární protilátka byla použita kozí protilátka cílená proti myším imunoglobulinům konjugovaná s Alexa Fluor 488 (ředění 1:1000, Life Technologies). Pomocí fluorescenčního mikroskopu bylo následně stanoveno množství infikovaných buněk, přičemž bylo počítáno 10 polí při zvětšení 100 krát. Z naměřených hodnot byla určena relativní hodnota infekivity vzhledem ke standardní infekci, kdy bylo použito 75 μ l PCV2 virového inokula ($TCID_{50}=10^{4,7}$) s 25 μ l séra získaného z myši imunizovaných plasmidem pBSC (relativní hodnota infekivity=1). Vyhodnocená data byla zanesena do grafu (Obr. 36). Nejvyšší úroveň inhibice PCV2 infekivity (51,5 %) bylo v případě DNA vakcín naměřeno pro sérum získaného z myši imunizovaných pouze plasmidem pBSC-CAP. Toto

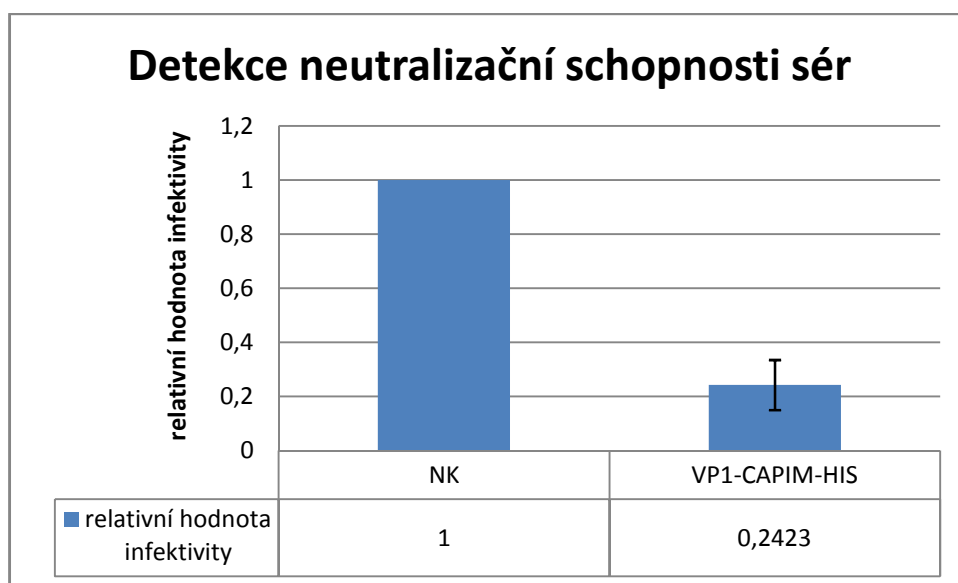
sérum obsahovalo také nejvyšší množství PCV2 Cap specifických protilátek. Naopak nejmenší množství PCV2 Cap specifických protilátek bylo detekováno v sérech získaných z myší, kde byla pro DNA vakcinaci použita sekretovaná verze PCV2 Cap proteinu (viz 5.3.2.1). Tato séra navíc vykazovala nejmenší schopnost inhibice PCV2 infekce. Lze tedy říci, že množství protilátek pozitivně koreluje s jejich inhibiční schopností. Použití plasmidů kódujících cytokiny TNF- α a IFN- α 1 nijak nevedlo ke zvýšení produkce neutralizačních protilátek. Ze získaných dat je tedy patrné, že plasmid nesoucí neupravenou sekvenci PCV2 Cap proteinu je v případě DNA vakcinace pomocí Gene gunu nejefektivnější v indukci protektivní protilátkové odpovědi a že koimunizace spolu s plasmidy kódující TNF- α a IFN- α 1 nijak nezvyšuje úroveň protektivní protilátkové odpovědi.



Obrázek 36: Detekce neutralizační schopnosti získaných sér po DNA vakcinaci. PCV2 virové inokulum bylo smícháno s jednotlivými séry a byla stanovena relativní hodnota infekivity. Jako standardní hodnota (relativní hodnota infekivity=1) bylo použito PCV2 virové inokulum smíchané se sérem z pBSC imunizovaných myší. Měření bylo provedeno celkem dvakrát.

Stejným způsobem byla analyzována také séra získaná z myší imunizovaných pomocí VP1-CAPIM-HIS pentamer. Jako negativní kontrola byla použita séra z myší imunizovaných pomocí PBS. Získaná data byla opět zanesena do grafu (Obr. 37). Z vyhodnocených dat je patrné, že VP1-CAPIM-HIS chimerické pentamery indukují efektivní protektivní

protilátkovou odpověď, neboť bylo dosaženo 74% inhibice PCV2 infekitivity *in vitro*. Opět lze tedy říci, že celkové množství protilátek zřejmě pozitivně koreluje se schopností inhibovat PCV2 infektitivitu *in vitro*, neboť VP1-CAPIM-HIS chimerické pentamery indukovaly nejvyšší produkci PCV2 specifických protilátek (viz 5.3.2.2), které navíc vykazovaly nejvyšší úroveň inhibice PCV2 infekce *in vitro*. Chimerické pentamery VP1-CAPIM-HIS tak v porovnání s testovanými DNA vakcínami vyvolávají mnohem účinnější protektivní protilátkovou odpověď proti PCV2.



Obrázek 37: Detekce neutralizační schopnosti získaných sér po vakcinaci VP1-CAPIM-HIS chimerickými pentamerami. PCV2 virové inokulum bylo smícháno s jednotlivými séry a byla stanovena relativní hodnota infekitivity. Jako standardní hodnota (relativní hodnota infekitivity=1) bylo použito PCV2 virové inokulum smíchané se sérem PBS imunizovaných myší. Měření bylo provedeno celkem dvakrát.

6 Diskuze

6.1 Příprava expresních plasmidů nesoucích různé varianty PCV2 Cap proteinu a plasmidů nesoucích imunostimulační cytokiny pro účely DNA vakcinace

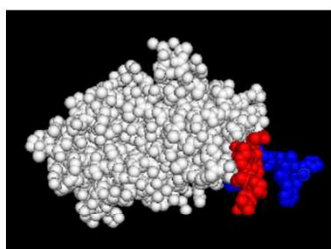
Tématem této práce byla analýza nových možností vakcinace proti PCV2. Z toho důvodu byly nejprve vytvořeny konstrukty určené pro DNA vakcinaci, neboť právě DNA vakcinace představuje jeden z možných přístupů vakcinace proti PCV2. Pro DNA vakcinaci byly vytvořeny konstrukty nesoucí 2 formy PCV2 Cap proteinu. Kromě neupravené DNA sekvence PCV2 Cap proteinu byl totiž vytvořen i konstrukt nesoucí sekretovanou formu PCV2 Cap proteinu. Tato forma PCV2 Cap proteinu byla vytvořena nahrazením 41 N-terminálních aminokyselin PCV2 Cap proteinu IL-2 signální sekvencí, přičemž od této formy byla očekávána indukce zejména protilátkové odpovědi. V případě DNA vakcinace bylo totiž zjištěno, že sekretovaná forma PCV2 Cap proteinu je nejefektivnější v indukci protilátkové odpovědi (Fan et al., 2008). Protilátková odpověď hraje důležitou roli v kontrole PCV2, neboť neutralizační protilátky jsou schopny zabránit rozvoji PCVAD (Fort et al., 2007). Také selata s vysokým titrem maternálních protilátek cílených proti PCV2 vykazují jistou úroveň protekce proti PCV2 (McKeown et al., 2005). Sekretovanou formu PCV2 Cap proteinu bylo nicméně velice obtížné detekovat v supernatantu. Při použití C6C10/B1 myši monoklonální protilátky cílené proti PCV2 Cap proteinu a pomocí komerční myši protilátky proti PCV2 Cap proteinu (Biotech) totiž nebyla sekretovaná forma PCV2 Cap proteinu detekována. Teprve použitím C1C6/H9 myši monoklonální protilátky cílené proti PCV2 Cap proteinu bylo pomocí Dot blotu možné detekovat sekretovanou formu. Jednou z hypotéz obtížné detekce by mohl být fakt, že sekretovaná forma PCV2 Cap proteinu nemusí být příliš stabilní a nelze vyloučit rychlou degradaci, ke které patrně může po sekreci do média za určitých podmínek docházet. Tento fakt nicméně nemohl být ověřen, neboť nevlastníme protilátku vhodnou pro detekci PCV2 Cap proteinu po rozdělení pomocí SDS-PAAGE a následném Western blotu. Z toho důvodu byl tento konstrukt modifikován přidáním His-tagu na C-konec sekretované formy PCV2 Cap proteinu. Přídavek His-tagové kotvy umožnil snadnější detekci sekretované formy PCV2 Cap proteinu a dále byla odhalena přítomnost dvou forem PCV2 Cap proteinu. Pravděpodobným vysvětlením je posttranslační modifikace jedné z forem, neboť v případě PCV2 Cap proteinu bylo popsáno mnoho potencionálních míst, která mohou být postranslačně modifikovány například glykosylací (Liu et al., 2001). Význam těchto modifikací není příliš znám, nicméně v případě DNA vakcinace bylo zjištěno, že N-glykosylace PCV2 Cap proteinu na pozici 143 pravděpodobně ovlivňuje polarizaci imunitní odpovědi. Po odstranění N-glykosylačního místa totiž došlo k posílení Th1 odpovědi (Gu et al., 2012a). Jedním z možných vysvětlení problematické detekce sekretované formy PCV2

Cap proteinu by mohl být také efekt delece 41 N-terminálních aminokyselin na celkovou konformaci proteinu. Podle strukturních dat PCV2 Cap proteinu publikovaných v práci Khayat et al. (2011) vytvořil Mgr. Martin Fraiberk pomocí programu PyMOL model PCV2 Cap proteinu (Obr. 38). Z modelu je patrné, že N i C-konec PCV2 Cap proteinu jsou zřejmě v blízkosti a nelze tedy vyloučit interakci těchto konců. Není tudíž vyloučeno, že po deleci 41 N-terminálních aminokyselin mohlo dojít ke změně uspořádání některých konformačních epitopů. PCV2 Cap protein zkrácený o 41 N-terminálních aminokyselin exprimovaný v bakteriích *Escherichia Coli* bylo ovšem možné detekovat za použití prasečího séra získaného z PCV2 pozitivních prasat. Některé epitopy tak jistě nejsou ovlivněny delecí N-koncových AK (Zhou et al., 2005). V oblasti 41 N-koncových aminokyselin PCV2 Cap proteinu bylo také popsáno antigenní místo rozeznávané protilátkami (Guo et al., 2011a). Nelze proto vyloučit, že sekretovaná verze PCV2 Cap proteinu nebyla detekována z důvodu cílení použitých protilátek proti epitopu v deletované oblasti. Z vytvořeného počítačového modelu PCV2 virionu (Obr. 38) je ovšem patrné, že 41 N-terminálních aminokyselin je zřejmě lokalizováno uvnitř kapsidy a N-konec není v případě intaktního virionu dostupný pro protilátkovou odpověď. Důležitost N-konce byla nicméně potvrzena v případě přípravy imunoreaktivního králíčího séra proti PCV2. V případě použití PCV2 Cap proteinu zkráceného pouze o 17 N-terminálních AK bylo totiž připraveno mnohem specifitější a vhodnější sérum pro detekci PCV2, než v případě použití PCV2 Cap proteinu zkráceného o 51 N-koncových AK (Chen et al., 2014). To jakým způsobem ovlivňuje zkrácení N-konce PCV2 Cap proteinu protektivní neutralizační epitopy a efekt delece N-konce na celkovou konformaci proteinu je ovšem nejasné.

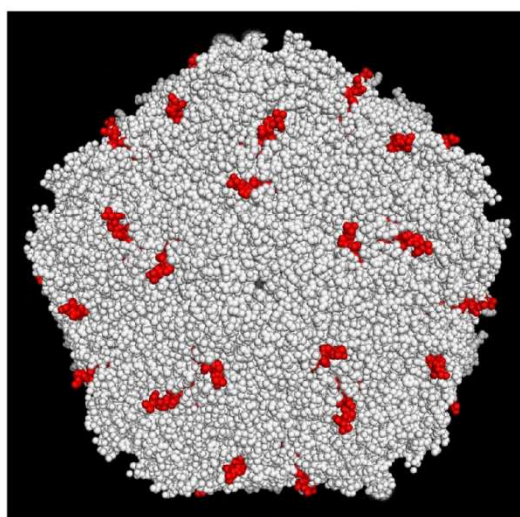
Pro účely DNA vakcinace byly také připraveny expresní plasmidy nesoucí IFN- α 1 a TNF- α . V případě DNA vakcín bylo totiž zjištěno, že použití dalšího plasmidu kódujícího imunostimulační cytokin může významně posílit imunitní odpověď. Tento koimunizační přístup byl v případě PCV2 potvrzen například použitím plasmidu kódujícího interleukin 15 (IL-15) (Dong et al., 2013). Z důvodu posílení imunitní odpovědi byl proto vybrán TNF- α . Tento cytokin hraje důležitou roli v indukci maturace dendritických buněk (DC). Maturované DC poté představují důležitý prvek v aktivaci adaptivní imunity, neboť maturované DC se podílejí na aktivaci T lymfocytů (Trevejo et al., 2001). Efekt TNF- α na maturaci DC je pravděpodobně dvojitý, neboť TNF- α kromě přímého vlivu na maturaci DC vykazuje i nepřímý efekt tím, že se podílí na aktivaci naivních T lymfocytů. Aktivované T lymfocyty následně mohou podpořit maturaci DC (Ding et al., 2011). Koimunizace s využitím plasmidu kódujícího TNF- α vedla ke značnému zesílení imunitní odpovědi v případě DNA vakcíny

proti viru slintavky a kulhavky (Su et al., 2008). Stejný stimulační efekt byl v případě DNA vakcíny proti viru slintavky a kulhavky popsán také pro interferon alfa (IFN- α) (Guo et al., 2004). Z toho důvodu byl jako druhý testovaný cytokin vybrán právě IFN- α 1, neboť interferony typu I obecně hrají důležitou roli v diferenciaci a maturaci DC, přičemž ovlivňují také polarizaci imunitní odpovědi směrem k Th1 (Parlato et al., 2001; Radvanyi et al., 1999). Interferony typu I navíc přímo ovlivňují také adaptivní odpověď, neboť zabraňují apoptické smrti aktivovaných T lymfocytů (Marrack et al., 1999). Koimunizací pomocí plasmidů kódujících TNF- α a IFN- α 1 by tak mohlo být vytvořeno vhodné cytokinové prostředí pro prvotní iniciaci imunitní odpovědi.

A



B



Obrázek 38: A) Model monomeru PCV2 Cap proteinu vytvořený pomocí programu PyMOL. Na modelu jsou červeně vyznačeny C-koncové aminokyseliny (216-233). N-koncové aminokyseliny (33-41) jsou označeny modře. B) Model virionu PCV2 vytvořený pomocí programu PyMOL. Červeně jsou opět vyznačeny C-koncové aminokyseliny (216-233). Modře je vyznačen N-konec (33-41), který je lokalizovaný uvnitř virionu.

6.2 Příprava a izolace chimerických pentamer VP1 kapsidového proteinu myšího polyomaviru fúzaného s PCV2 Cap proteinem obsahujícím aminokyselinové substituce v imunodominantním epitopu

Jedním z témat výzkumu v naší laboratoři je možnost využití umělých virových kapsid (VLPs) odvozených od VP1 kapsidového proteinu myšího polyomaviru, přičemž schopnost vyvolání silné protilátkové odpovědi poukazuje na možnost využití také v případě vakcinace

(Fric et al., 2008). Pro produkci VLPs lze využít zejména bakulovirový expresní systém, neboť byla popsána vysoká efektivita produkce (Forstová et al., 1995; Montross et al., 1991). VLPs mohou být navíc dále modifikovány například vložením cizorodých epitopů do povrchových smyček (Gedvilaite et al., 2000; Gleiter et al., 1999). Kromě VLPs bylo dále prokázáno, že také modifikované pentamery mohou účinně vyvolat protilátkovou odpověď proti vloženému epitopu. Protilátková odpověď vyvolaná pomocí pentamer je přitom srovnatelná s VLPs. Navíc byly tyto konstrukty testovány na prasatech, což poukazuje na možnost využití polyomavirových VLPs a chimérických pentamer pro veterinární vakcinaci (Neugebauer et al., 2006). Chimerické pentamery mohou být také připraveny přidáním zvoleného proteinu k C-konci VP1, neboť právě flexibilní C-konec zprostředkovává interakci jednotlivých pentamer a podílí se tak na struktuře virionu (Liddington et al., 1991). V případě vakcinace proti PCV2 bylo zjištěno, že chimerické VLPs myšího polyomaviru nesoucí epitopy PCV2 v povrchové DE smyčky jsou schopné po imunizaci myší indukovat protilátkovou odpověď cílenou proti vloženému epitopu. Vložení pouze jediného epitopu nemusí být ovšem optimální, neboť v ideálním případě musí být vybrán neutralizační epitop, přičemž je nutné, aby byla po vložení do povrchové smyčky zachována optimální konformace vybraného epitopu. Z toho důvodu byly připraveny a testovány také chimerické pentamery vzniklé přidáním PCV2 Cap proteinu k C-konci VP1. Tyto chimerické pentamery vykazovaly po imunizaci myší daleko vyšší úroveň indukce protilátkové odpovědi cílené proti PCV2 Cap proteinu a vyšší byla také produkce neutralizačních protilátek. Pravděpodobným vysvětlením vyšší efektivity chimérických pentamer je zachování optimální konformace neutralizačních epitopů, přičemž použití celého PCV2 Cap proteinu navíc zvýší i spektrum epitopů, proti kterým se může protilátková odpověď vytvořit. V případě vložení krátké AK sekvence odvozené od PCV2 Cap proteinu do DE povrchové smyčky je pravděpodobně vložena pouze část AK sekvence nutná pro optimální konformaci neutralizačního epitopu (Fraiberk et al., nepublikovaná data). Podle práce Lekcharoensukové et al. (2004) se na konformaci neutralizačních epitopů zřejmě podílejí AK sekvence, které jsou v rámci primární AK sekvence PCV2 Cap proteinu značně vzdáleny. Z hlediska indukce tvorby neutralizačních protilátek cílených proti PCV2 proto chimerické pentamery představují optimální řešení, neboť tyto pentamery nesou plnou sekvenci PCV2 Cap proteinu. Nicméně v případě vakcinace proti PCV2 bylo zjištěno, že monomerní forma Cap proteinu není vhodná z hlediska vakcinace, neboť protilátková odpověď se v tomto případě zaměří zejména proti jedinému imunodominantnímu epitopu, který není protektivní. Tento epitop je lokalizován na pozici 169-180, přičemž pomocí mutageneze, kdy byly jednotlivé AK substituovány na

alanin, bylo zjištěno, že tyrosin na pozici 173, fenylalanin na pozici 174, glutamin na pozici 175 a lysin na pozici 179 se podílejí na konformaci tohoto epitopu (Trible et al., 2011). Efekt toho epitopu v případě chimérických pentametr je doposud ovšem neobjasněn, nicméně lze předpokládat dostupnost tohoto epitopu pro protilátkovou odpověď. Tento epitop tak, podobně jako v případě monomeru PCV2 Cap proteinu, může odvádět protilátkovou odpověď od protektivních epitopů. Z toho důvodu byly chimerické pentamery připravené Mgr. Martinem Fraiberkem a vzniklé přidáním PCV2 Cap proteinu k C-konci VP1 kapsidového proteinu myšího polyomaviru dále modifikovány. Pomocí cílené mutagenese byl totiž upraven imunodominantní epitop, přičemž AK na pozici 173, 174 a 175 byly změněny na alanin s cílem narušení konformace imunodominantního epitopu. Takto připravené chimérické pentamery byly izolovány pomocí izopyknické centrifugace v cesium chloridovém gradientu a následně použity pro imunizace myší.

6.3 Vyhodnocení protilátkové odpovědi vyvolané pomocí DNA vakcín a chimérických pentametr

Připravené DNA vakcíny a chimerické pentamery byly využity pro imunizaci myší, přičemž následně byla testována schopnost těchto vakcín vyvolat protektivní protilátkovou odpověď cílenou proti PCV2. Celkové množství protilátek bylo stanoveno metodou ELISA a pomocí neutralizačních testů byla analyzována schopnost těchto protilátek inhibovat PCV2 infekci *in vitro*.

Nejprve byla testována schopnost připravených DNA vakcín vyvolat protilátkou odpověď cílenou proti PCV2, přičemž byly využity 2 formy PCV2 Cap proteinu. Přestože bylo již dříve popsáno, že v případě DNA vakcinace sekretovaná forma PCV2 Cap proteinu vyvolává mnohem vyšší tvorbu protilátek, než neupravená forma PCV2 Cap proteinu lokalizovaná převážně v buněčném jádře (Fan et al., 2008), tento fakt nebyl v této práci potvrzen. Myši imunizované plasmidem nesoucí sekretovanou formu PCV2 Cap proteinu totiž vykazovaly mnohem nižší množství protilátek cílených proti PCV2 ve srovnání s myšmi, které byly imunizované plasmidem nesoucí neupravenou formu PCV2 Cap proteinu. Nicméně v práci Fan et al. (2008) byly expresní plasmidy dopraveny do myší pomocí intramuskulární injekce a také byla detekována pouze jedna forma sekretovaného PCV2 Cap proteinu, zatímco v této práci byly detekovány 2 formy sekretovaného PCV2 Cap proteinu a pro dopravu expresních plasmidů byl použit Gen gun. Zdali má jiná metoda dopravy vliv na účinnost sekretované formy PCV2 Cap proteinu v indukci protilátkové odpovědi je ovšem nejasné. Jak již bylo zmíněno, pravděpodobným vysvětlením detekce dvou forem PCV2 Cap

proteinu by mohla být postranlační modifikace jedné z forem. V případě DNA vakcinace totiž bylo zjištěno, že N-glykosylace PCV2 Cap proteinu ovlivňuje polaritu imunitní odpovědi (Gu et al., 2012a). Kromě N-glykosylace byly predikovány také místa, která mohou být modifikována například myristoylací (Liu et al., 2001). Není tedy vyloučeno, že cílení PCV2 Cap proteinu do endoplasmatického retikula vedlo k posttranslační modifikaci PCV2 Cap proteinu a že tato modifikace mohla mít také vliv na protilátkovou odpověď. Dalším vysvětlením nižší efektivity sekretované verze PCV2 Cap proteinu v indukci protilátkové odpovědi by mohla být delece 41 N-koncových aminokyselin PCV2 Cap proteinu, neboť tyto AK mohou hrát roli v konformaci. V této studii tak bylo zjištěno, že v případě využití Gene gunu je pro DNA vakcinaci vhodnější využít neupravenou verzi PCV2 Cap proteinu, neboť pro tento konstrukt byla naměřena vyšší úroveň indukce PCV2 specifických protilátek.

Dále bylo zjištěno, že koimunizace s využitím plasmidů kódujících TNF- α nebo IFN- α nevedla ke zvýšení protilátkové odpovědi, přičemž v případě plasmidu kódujícího neupravenou formu PCV2 Cap proteinu došlo spíše ke snížení tvorby protilátek cílených proti Cap proteinu. Přestože byl imunostimulační efekt obou cytokinů popsán například v případě DNA vakcín proti viru slintavky a kulhavky, nelze opomenout fakt, že imunostimulačního efektu bylo dosaženo za použití intramuskulární injekce DNA (Guo et al., 2004; Su et al., 2008). Pro dopravu DNA byla ovšem v této studii využita biolistická metoda, přičemž obě metody dopravy vykazují rozdílný vliv na indukci imunitní odpovědi. Intramuskulární injekce DNA vakcín totiž indukuje spíše Th1 typ imunitní odpovědi (Raz et al., 1996), zatímco kožní imunizace použitím Gene gunu pravděpodobně ovlivňuje rozvoj Th2 imunitní odpovědi (Pertmer et al., 1996) nebo je imunitní odpověď na pomezí Th1/Th2 (Leitner et al., 1997). Nelze opomenout také časový faktor působení jednotlivých cytokinů. V případě použití plasmidu kódující faktor stimulující růst granulocytů a monocyty (GM-CSF) byl zjištěn imunostimulační účinek pouze v případě použití toho plasmidu 7 dnů před vlastní imunizací (Melkebeek et al., 2006). Tento časový faktor může hrát také rozdílnou roli mezi intramuskulární injekcí DNA a Gene gunem. Dynamika imunitní odpovědi totiž zřejmě silně závisí na metodě dopravy DNA. Odstranění imunizovaného místa 10 minut po provedení intramuskulární injekce totiž nijak neovlivnilo následnou imunitní odpověď, zatímco odstranění Gene gunem imunizované kůže do 24 hodin po imunizaci vedlo ke značné inhibici imunitní odpovědi (Torres et al., 1997). Důležitost načasování cytokinové signalizace je popsána také pro Interferony typu I. V případě stimulace T lymfocytů byl totiž navržen model, podle kterého vykazují Interferony typu I rozdílný vliv na T lymfocyty v závislosti na načasování dané signalizace. Pokud jsou totiž T lymfocyty nejdříve stimulovány Interferony

typu I a až poté je stimulován T buněčný receptor (TCR), dochází k potlačení proliferace a ke spuštění apoptózy. Pokud je ovšem sled signalizace opačný nastává naopak proliferace a spuštění antiapoptického programu (Crouse et al., 2015). Dále je nutné vzít v potaz také imunizační dávku cytokinů. V případě DNA vakcinace proti viru hepatitidy C (HCV) bylo totiž zjištěno, že pro optimální stimulaci imunitní odpovědi vyvolané pomocí DNA vakcíny je nutné použít optimální množství interferonu α (IFN- α). Vysoké dávky IFN- α totiž inhibovaly buněčnou i humorální odpověď vyvolanou DNA vakcinací (Gehring et al., 2005). V této práci bylo využito koimunizační schéma použité zejména v případě dopravy DNA vakcín pomocí intramuskulární injekce, neboť plasmidy kódující antigen a cytokiny byly použity společně a také dávka plasmidů byla stejná. Není tedy vyloučeno, že pro využití Gene genu je potřeba optimalizovat načasování i dávku plasmidů kódujících TNF- α a IFN- α 1 pro dosažení imunostimulačního efektu. Ani optimalizací ovšem nemusí být dosaženo imunostimulačního efektu, neboť oba cytokiny za určitých podmínek přirozeně inhibují imunitní odpověď (Hahm et al., 2005; Zganiacz et al., 2004).

Dále byla analyzována schopnost chimérických pentamer VP1-CAPIM-HIS indukovat protilátkovou odpověď proti PCV2. Již dříve bylo v naší laboratoři prokázáno, že chimerické pentamery vzniklé přidáním PCV2 Cap proteinu k C-konci VP1 kapsidového proteinu myšího polyomaviru jsou schopné indukovat efektivní protilátkovou odpověď proti PCV2 (Fraiberk et al., nepublikované výsledky). Tyto chimerické pentamery byly v této práci dále modifikovány, neboť byla upravena AK sekvence imunodominantního epitopu PCV2 Cap proteinu. Tento epitop totiž pravděpodobně odvádí protilátkovou odpověď od protektivních epitopů (Trible et al., 2011). Modifikované chimérické pentametry VP1-CAPIM-HIS byly proto testovány z cílem zvýšení protektivní protilátkové odpovědi. Množství protilátek cílených proti PCV2 bylo opět stanoveno metodou ELISA. Takto bylo zjištěno, že chimerické pentamery VP1-CAPIM-HIS obsahující modifikaci v imunodominantním epitopu PCV2 Cap proteinu vyvolávají zhruba stejnou produkci PCV2 specifických protilátek jako neupravené VP1-CAP-HIS chimerické pentamery (Fraiberk et al., nepublikované výsledky). Ve srovnání s testovanými DNA vakcínami ovšem chimerické pentamery VP1-CAPIM-HIS indukovaly daleko vyšší produkci PCV2 specifických protilátek. Byla tak potvrzena vysoká schopnost chimérických pentamer odvozených od VP1 kapsidového proteinu ve vyvolání silné protilátkové odpovědi, přestože nebylo použito žádné běžné adjuvans pro zesílení imunitní odpovědi. Tento fakt lze zřejmě vysvětlit tím, že VP1 kapsidový protein myšího polyomaviru je rozeznáván Toll-like receptorem 4 (TLR4) (Velupillai et al., 2012). Signalizace z TLR4 může vést k maturaci DC a také k produkci cytokinů, které dále mohou podpořit iniciaci

imunitní odpovědi (Kaisho et al., 2001). Kromě vlivu na maturaci DC a produkci cytokinů hraje TLR4 také roli v antigenní presentaci. Komplex ligand-TLR4 je totiž internalizován do pozdních endosomů a lysozomů, kde dochází k degradaci celého komplexu, přičemž TLR4 asociované antigeny mohou vytvářet komplexy s MHC glykoproteiny II. Třídy (MHCII) a jsou prezentovány na buněčném povrchu (Husebye et al., 2006). Lze tedy předpokládat, že chimerické pentamery mohou být rozeznány pomocí TLR4 na povrchu DC a internalizovány do MHCII kompartmentu, což by patrně vysvětlovalo vysokou účinnost těchto pentamerů v indukci protilátkové odpovědi.

Jelikož testované DNA vakcíny i chimerické pentamery indukovaly PCV2 specifickou protilátkovou odpověď, byla také analyzována schopnost těchto protilátek inhibovat PCV2 infekci *in vitro*. Z vyhodnocených dat je patrné, že množství PCV2 specifických protilátek pozitivně koreluje s mírou inhibice PCV2 infekce. Nejvyšší míra inhibice PCV2 infekce (76%) byla proto naměřena pro séra získaná z myší imunizovaných chimérickými pentamerami VP1-CAPIM-HIS. Mnohem zajímavějším zjištěním je ovšem fakt, že modifikace PCV2 Cap imunodominantního epitopu nevedla ke zvýšení protektivní protilátkové odpovědi cílené proti PCV2. V případě nemodifikovaných VP1-CAP-HIS pentamerů totiž byla naměřena prakticky totožná míra inhibice PCV2 infekce (Fraiberk et al., nepublikované výsledky). Vliv PCV2 Cap imunodominantního epitopu v případě připravených chimérických pentamerů je proto nejasný. V práci Tribble et al. (2011) byl ovšem efekt imunodominantního epitopu popsán přímo na prasečím modelu, zatímco v této práci byly připravené vakcíny testovány na myších. Jelikož přesný mechanismus, jakým je imunodominantní epitop lokalizovaný na pozici 169-180 PCV2 Cap proteinu schopen odvádět protektivní protilátkovou odpověď, není doposud znám, zřejmě nelze vyloučit rozdílné působení toho epitopu v myších. VP1-CAPIM-HIS chimerické pentamery budou nicméně také testovány přímo na prasatech, přičemž na prasečím modelu by mohl být dále objasněn efekt PCV2 Cap imunodominantního epitopu.

Souhrnně lze tedy říci, že připravené DNA vakcíny i chimerické pentamery VP1-CAPIM-HIS vykazovaly schopnost indukce protektivní protilátkové odpovědi cílené proti PCV2 v imunizovaných myších. Přestože chimerické pentamery VP1-CAPIM-HIS indukovaly daleko vyšší PCV2 specifickou protilátkovou odpověď než testované DNA vakcíny, možnost DNA vakcinace proti PCV2 nemusí být nereálná. Prvotní imunitní odpověď vyvolaná pomocí DNA vakcíny totiž může být posílena dávkou proteinové vakcíny. Kombinace připraveného expresního plasmidu pBSC-CAP a chimerických pentamerů VP1-CAPIM-HIS by tak z ekonomického hlediska mohla představovat zajímavou možnost

vakcinace proti PCV2. Mnohem pravděpodobnější je ovšem využití chimerických pentamer VP1-CAPIM-HIS, které budou dále testovány přímo na prasatech.

7 Souhrn

V této kapitole bude stručně shrnuta práce a výsledky týkající se jednotlivých cílů této diplomové práce. Prvním cílem této diplomové práce bylo:

1) Připravit expresní plasmidy kódující různé varianty PCV2 Cap proteinu a expresní plasmidy kódující imunostimulační cytokiny pro účely DNA vakcinace

Pro účely DNA vakcinace byl vytvořen plasmid pBSC-CAP kódující neupravenou formu PCV2 CAP proteinu a také plasmid pBSC-IL2ssΔ41NCAP-HIS kódující upravenou formu PCV2 CAP proteinu určenou pro sekreci z buňky. Dále byly vytvořeny expresní plasmidy kódující sekvence TNF- α a IFN- α 1. Exprese vložených genů byla ověřena *in vitro*.

Druhým cílem této diplomové práce bylo:

2) Připravit chimerické pentametry VP1 kapsidového proteinu myšího polyomaviru fúzaného s PCV2 Cap proteinem obsahujícím aminokyselinové substituce v imunodominantním epitopu

Pomocí cílené DNA mutagenese byla nejprve upravena AK sekvence PCV2 Cap imunodominantního epitopu. Využitím bakulovirového expresního systému byly poté vyprodukovány chimerické pentamery VP1-CAPIM-HIS a tyto chimerické pentamery byly vyizolovány pomocí izopyknické centrifugace v cesium chloridovém gradientu.

Třetím cílem této diplomové práce bylo:

3) Vyhodnotit protilátkovou odpověď vyvolanou pomocí DNA vakcín a chimérických pentametr

Připravené vakcíny byly použity pro imunizaci myší a následně bylo stanoveno množství PCV2 specifických protilátek pomocí metody ELISA. Bylo zjištěno, že připravené DNA vakcíny i chimerické vakcíny indukují PCV2 specifickou protilátkovou odpověď. V případě DNA vakcín bylo dále zjištěno, že koimunizace společně s plasmidem pBSC kódující TNF- α nebo IFN α -1 nevedla ke zvýšení protilátkové odpovědi proti PCV2. V porovnání s testovanými DNA vakcínami vykazovaly chimerické pentamery VP1-CAPIM-HIS schopnost indukovat mnohem vyšší PCV2 specifickou protilátkovou odpověď. Dále bylo zjištěno, že množství PCV2 specifických protilátek vyvolané připravenými vakcínami pravděpodobně pozitivně koreluje s mírou inhibice PCV2 infekce *in vitro*. Modifikace imunodominantního epitopu PCV2 Cap proteinu navíc v případě VP1-CAPIM-HIS modifikovaných pentametr pravděpodobně nevedla ke zvýšení PCV2 specifické protektivní protilátkové odpovědi.

8 Seznam použité literatury

- Allan, G.M., McNeilly, F., Kennedy, S., Daft, B., Clarke, E.G., Ellis, J.A., Haines, D.M., Meehan, B.M., Adair, B.M., 1998. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10, 3–10.
- Balmelli, C., Steiner, E., Moulin, H., Peduto, N., Herrmann, B., Summerfield, A., McCullough, K., 2011. Porcine circovirus type 2 DNA influences cytoskeleton rearrangements in plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *Immunology* 132, 57–65. doi:10.1111/j.1365-2567.2010.03339.x
- Beach, N.M., Meng, X.-J., 2012. Efficacy and future prospects of commercially available and experimental vaccines against porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Res.* 164, 33–42. doi:10.1016/j.virusres.2011.09.041
- Blunt, R., McOrist, S., McKillen, J., McNair, I., Jiang, T., Mellits, K., 2011. House fly vector for porcine circovirus 2b on commercial pig farms. *Vet. Microbiol.* 149, 452–455. doi:10.1016/j.vetmic.2010.11.019
- Brunborg, I.M., Moldal, T., Jonassen, C.M., 2004. Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR. *J. Virol. Methods* 122, 171–178. doi:10.1016/j.jviromet.2004.08.014
- Cai, L., Ni, J., Xia, Y., Zi, Z., Ning, K., Qiu, P., Li, X., Wang, B., Liu, Q., Hu, D., Yu, X., Zhou, Z., Zhai, X., Han, X., Tian, K., 2012. Identification of an emerging recombinant cluster in porcine circovirus type 2. *Virus Res.* 165, 95–102. doi:10.1016/j.virusres.2012.01.008
- Celer, V., Carasová, P., 2002. First evidence of porcine circovirus type 2 (PCV-2) infection of pigs in the Czech Republic by semi-nested PCR. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 49, 155–159.
- Cortey, M., Olvera, A., Grau-Roma, L., Segalés, J., 2011. Further comments on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and nomenclature. *Vet. Microbiol.* 149, 522–523. doi:10.1016/j.vetmic.2010.11.009
- Crisci, E., Ballester, M., Domínguez, J., Segalés, J., Montoya, M., 2010. Increased numbers of myeloid and lymphoid IL-10 producing cells in spleen of pigs with naturally occurring postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 136, 305–310. doi:10.1016/j.vetimm.2010.03.008
- Crouse, J., Kalinke, U., Oxenius, A., 2015. Regulation of antiviral T cell responses by type I interferons. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 231–242. doi:10.1038/nri3806
- Crowther, R.A., Berriman, J.A., Curran, W.L., Allan, G.M., Todd, D., 2003. Comparison of the structures of three circoviruses: chicken anemia virus, porcine circovirus type 2, and beak and feather disease virus. *J. Virol.* 77, 13036–13041.
- De Boissésón, C., Béven, V., Bigarré, L., Thiéry, R., Rose, N., Eveno, E., Madec, F., Jestin, A., 2004. Molecular characterization of Porcine circovirus type 2 isolates from post-weaning multisystemic wasting syndrome-affected and non-affected pigs. *J. Gen. Virol.* 85, 293–304.
- Ding, X., Yang, W., Shi, X., Du, P., Su, L., Qin, Z., Chen, J., Deng, H., 2011. TNF receptor 1 mediates dendritic cell maturation and CD8 T cell response through two distinct mechanisms. *J. Immunol.* 187, 1184–1191. doi:10.4049/jimmunol.1002902
- Dong, B., Feng, J., Lin, H., Li, L., Su, D., Tu, D., Zhu, W., Yang, Q., Ren, X., 2013. Immune responses of mice immunized by DNA plasmids encoding PCV2 ORF 2 gene, porcine IL-15 or the both. *Vaccine* 31, 5736–5744. doi:10.1016/j.vaccine.2013.09.035
- Dupont, K., Nielsen, E.O., Bækbo, P., Larsen, L.E., 2008. Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case–control study supports a shift in genotypes with time. *Veterinary Microbiology* 128, 56–64. doi:10.1016/j.vetmic.2007.09.016
- Fan, H., Xiao, S., Tong, T., Wang, S., Xie, L., Jiang, Y., Chen, H., Fang, L., 2008. Immunogenicity of porcine circovirus type 2 capsid protein targeting to different subcellular compartments. *Mol. Immunol.* 45, 653–660. doi:10.1016/j.molimm.2007.07.009

- Finsterbusch, T., Mankertz, A., 2009. Porcine circoviruses—Small but powerful. *Virus Research*, Virus Research - 25th Anniversary Issue 143, 177–183. doi:10.1016/j.virusres.2009.02.009
- Firth, C., Charleston, M.A., Duffy, S., Shapiro, B., Holmes, E.C., 2009. Insights into the evolutionary history of an emerging livestock pathogen: porcine circovirus 2. *J. Virol.* 83, 12813–12821. doi:10.1128/JVI.01719-09
- Forstová, J., Krauzewicz, N., Sandig, V., Elliott, J., Palková, Z., Strauss, M., Griffin, B.E., 1995. Polyoma virus pseudocapsids as efficient carriers of heterologous DNA into mammalian cells. *Hum. Gene Ther.* 6, 297–306. doi:10.1089/hum.1995.6.3-297
- Fort, M., Fernandes, L.T., Nofrarias, M., Díaz, I., Sibila, M., Pujols, J., Mateu, E., Segalés, J., 2009. Development of cell-mediated immunity to porcine circovirus type 2 (PCV2) in caesarean-derived, colostrum-deprived piglets. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 129, 101–107. doi:10.1016/j.vetimm.2008.12.024
- Fort, M., Olvera, A., Sibila, M., Segalés, J., Mateu, E., 2007. Detection of neutralizing antibodies in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs. *Vet. Microbiol.* 125, 244–255. doi:10.1016/j.vetmic.2007.06.004
- Fort, M., Sibila, M., Nofrarias, M., Pérez-Martín, E., Olvera, A., Mateu, E., Segalés, J., 2010. Porcine circovirus type 2 (PCV2) Cap and Rep proteins are involved in the development of cell-mediated immunity upon PCV2 infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 137, 226–234. doi:10.1016/j.vetimm.2010.05.013
- Fric, J., Marek, M., Hrusková, V., Holán, V., Forstová, J., 2008. Cellular and humoral immune responses to chimeric EGFP-pseudocapsids derived from the mouse polyomavirus after their intranasal administration. *Vaccine* 26, 3242–3251. doi:10.1016/j.vaccine.2008.04.006
- Fu, F., Lang, Y., Li, X., Chai, Z., Tong, G., Liu, S., Tian, H., Li, H., Wang, W., Chen, X., Li, X., 2013a. Evaluation of the enhancing ability of three adjuvants for DNA vaccination using the porcine circovirus type 2 ORF2 (capsid) gene in mice. *Virus Res.* 171, 247–251. doi:10.1016/j.virusres.2012.10.029
- Fu, F., Tian, H., Li, X., Lang, Y., Tong, G., Liu, S., Li, H., Wang, W., Li, X., Chen, X., 2013b. C-terminal heat shock protein 70 of *Mycobacterium tuberculosis* as a molecular adjuvant for DNA vaccination with the porcine circovirus type 2 ORF2 (capsid) gene in mice. *Vet. J.* 195, 244–247. doi:10.1016/j.tvjl.2012.06.005
- Gagnon, C.A., Tremblay, D., Tijssen, P., Venne, M.-H., Houde, A., Elahi, S.M., 2007. The emergence of porcine circovirus 2b genotype (PCV-2b) in swine in Canada. *Can. Vet. J.* 48, 811–819.
- Gao, Z., Dong, Q., Jiang, Y., Opriessnig, T., Wang, J., Quan, Y., Yang, Z., 2014. ORF4-protein deficient PCV2 mutants enhance virus-induced apoptosis and show differential expression of mRNAs in vitro. *Virus Res.* 183, 56–62. doi:10.1016/j.virusres.2014.01.024
- Gauger, P.C., Lager, K.M., Vincent, A.L., Opriessnig, T., Kehrli, M.E., Cheung, A.K., 2011. Postweaning multisystemic wasting syndrome produced in gnotobiotic pigs following exposure to various amounts of porcine circovirus type 2a or type 2b. *Vet. Microbiol.* 153, 229–239. doi:10.1016/j.vetmic.2011.05.038
- Ge, M., Yan, A., Luo, W., Hu, Y.-F., Li, R.-C., Jiang, D.-L., Yu, X.-L., 2013. Epitope screening of the PCV2 Cap protein by use of a random peptide-displayed library and polyclonal antibody. *Virus Res.* 177, 103–107. doi:10.1016/j.virusres.2013.06.018
- Gedvilaite, A., Frömmel, C., Sasnauskas, K., Micheel, B., Ozel, M., Behrsing, O., Staniulis, J., Jandrig, B., Scherneck, S., Ulrich, R., 2000. Formation of immunogenic virus-like particles by inserting epitopes into surface-exposed regions of hamster polyomavirus major capsid protein. *Virology* 273, 21–35. doi:10.1006/viro.2000.0392
- Gehring, S., Gregory, S.H., Kuzushita, N., Wands, J.R., 2005. Type 1 interferon augments DNA-based vaccination against hepatitis C virus core protein. *J. Med. Virol.* 75, 249–257. doi:10.1002/jmv.20264

- Gleiter, S., Stubenrauch, K., Lilie, H., 1999. Changing the surface of a virus shell fusion of an enzyme to polyoma VP1. *Protein Sci.* 8, 2562–2569. doi:10.1110/ps.8.12.2562
- Grau-Roma, L., Crisci, E., Sibila, M., López-Soria, S., Nofrarias, M., Cortey, M., Fraile, L., Olvera, A., Segalés, J., 2008. A proposal on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and their relation with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence. *Vet. Microbiol.* 128, 23–35. doi:10.1016/j.vetmic.2007.09.007
- Grau-Roma, L., Fraile, L., Segalés, J., 2011. Recent advances in the epidemiology, diagnosis and control of diseases caused by porcine circovirus type 2. *Vet. J.* 187, 23–32. doi:10.1016/j.tvjl.2010.01.018
- Grierson, S.S., King, D.P., Sandvik, T., Hicks, D., Spencer, Y., Drew, T.W., Banks, M., 2004. Detection and genetic typing of type 2 porcine circoviruses in archived pig tissues from the UK. *Arch. Virol.* 149, 1171–1183. doi:10.1007/s00705-003-0288-1
- Gu, J., Cao, R., Zhang, Y., Lian, X., Ishag, H., Chen, P., 2012a. Deletion of the single putative N-glycosylation site of the porcine circovirus type 2 Cap protein enhances specific immune responses by DNA immunisation in mice. *Vet. J.* 192, 385–389. doi:10.1016/j.tvjl.2011.08.005
- Gu, J., Zhang, Y., Lian, X., Sun, H., Wang, J., Liu, W., Meng, G., Li, P., Zhu, D., Jin, Y., Cao, R., 2012b. Functional analysis of the interferon-stimulated response element of porcine circovirus type 2 and its role during viral replication in vitro and in vivo. *Virol. J.* 9, 152. doi:10.1186/1743-422X-9-152
- Guo, H.-C., Liu, Z.-X., Sun, S.-Q., Leng, Q.-W., Li, D., Liu, X.-T., Xie, Q.-G., 2004. The effect of bovine IFN- α on the immune response in guinea pigs vaccinated with DNA vaccine of foot-and-mouth disease virus. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* 36, 701–706.
- Guo, L., Lu, Y., Huang, L., Wei, Y., Liu, C., 2011a. Identification of a new antigen epitope in the nuclear localization signal region of porcine circovirus type 2 capsid protein. *Intervirology* 54, 156–163. doi:10.1159/000319838
- Guo, L., Lu, Y., Wei, Y., Huang, L., Wu, H., Liu, C., 2011b. Porcine circovirus genotype 2a (PCV2a) and genotype 2b (PCV2b) recombinant mutants showed significantly enhanced viral replication and altered antigenicity in vitro. *Virology* 419, 57–63. doi:10.1016/j.virol.2011.08.004
- Hahm, B., Trifilo, M.J., Zuniga, E.I., Oldstone, M.B.A., 2005. Viruses evade the immune system through type I interferon-mediated STAT2-dependent, but STAT1-independent, signaling. *Immunity* 22, 247–257. doi:10.1016/j.immuni.2005.01.005
- Hamel, A.L., Lin, L.L., Nayar, G.P., 1998. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *J. Virol.* 72, 5262–5267.
- Harding, J.C.S., Ellis, J.A., McIntosh, K.A., Krakowka, S., 2010. Dual heterologous porcine circovirus genogroup 2a/2b infection induces severe disease in germ-free pigs. *Vet. Microbiol.* 145, 209–219. doi:10.1016/j.vetmic.2010.03.026
- Hasslung, F.C., Berg, M., Allan, G.M., Meehan, B.M., McNeilly, F., Fossum, C., 2003. Identification of a sequence from the genome of porcine circovirus type 2 with an inhibitory effect on IFN- α production by porcine PBMCs. *J. Gen. Virol.* 84, 2937–2945.
- He, J., Cao, J., Zhou, N., Jin, Y., Wu, J., Zhou, J., 2013. Identification and functional analysis of the novel ORF4 protein encoded by porcine circovirus type 2. *J. Virol.* 87, 1420–1429. doi:10.1128/JVI.01443-12
- Hesse, R., Kerrigan, M., Rowland, R.R.R., 2008. Evidence for recombination between PCV2a and PCV2b in the field. *Virus Res.* 132, 201–207. doi:10.1016/j.virusres.2007.10.013
- Hirai, T., Nunoya, T., Ihara, T., Saitoh, T., Shibuya, K., Nakamura, K., 2006. Infectivity of porcine circovirus 1 and circovirus 2 in primary porcine hepatocyte and kidney cell cultures. *J. Vet. Med. Sci.* 68, 179–182.

- Husebye, H., Halaas, Ø., Stenmark, H., Tunheim, G., Sandanger, Ø., Bogen, B., Brech, A., Latz, E., Espevik, T., 2006. Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity. *EMBO J.* 25, 683–692. doi:10.1038/sj.emboj.7600991
- Chang, H.-W., Jeng, C.-R., Lin, C.-M., Liu, J.J., Chang, C.-C., Tsai, Y.-C., Chia, M.-Y., Pang, V.F., 2007. The involvement of Fas/FasL interaction in porcine circovirus type 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus co-inoculation-associated lymphocyte apoptosis in vitro. *Vet. Microbiol.* 122, 72–82. doi:10.1016/j.vetmic.2007.01.013
- Chang, H.-W., Jeng, C.-R., Lin, T.-L., Liu, J.J., Chiou, M.-T., Tsai, Y.-C., Chia, M.-Y., Jan, T.-R., Pang, V.F., 2006a. Immunopathological effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) on swine alveolar macrophages by in vitro inoculation. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 110, 207–219. doi:10.1016/j.vetimm.2005.09.016
- Chang, H.-W., Pang, V.F., Chen, L.-J., Chia, M.-Y., Tsai, Y.-C., Jeng, C.-R., 2006b. Bacterial lipopolysaccharide induces porcine circovirus type 2 replication in swine alveolar macrophages. *Vet. Microbiol.* 115, 311–319. doi:10.1016/j.vetmic.2006.03.010
- Chen, F., Yang, X., Pang, D., Peng, Z., Dong, M., Liu, X., Ouyang, H., Ren, L., 2014. Expression, purification and antibody preparation using different constructs of PCV2 capsid protein. *Int. J. Biol. Macromol.* 67, 289–294. doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.03.043
- Chen, X., Ren, F., Hesketh, J., Shi, X., Li, J., Gan, F., Huang, K., 2012. Reactive oxygen species regulate the replication of porcine circovirus type 2 via NF- κ B pathway. *Virology* 426, 66–72. doi:10.1016/j.virol.2012.01.023
- Cheung, A.K., 2004. Detection of template strand switching during initiation and termination of DNA replication of porcine circovirus. *J. Virol.* 78, 4268–4277.
- Cheung, A.K., 2003a. Transcriptional analysis of porcine circovirus type 2. *Virology* 305, 168–180.
- Cheung, A.K., 2003b. The essential and nonessential transcription units for viral protein synthesis and DNA replication of porcine circovirus type 2. *Virology* 313, 452–459.
- Cheung, A.K., Greenlee, J.J., 2011. Identification of an amino acid domain encoded by the capsid gene of porcine circovirus type 2 that modulates intracellular viral protein distribution during replication. *Virus Res.* 155, 358–362. doi:10.1016/j.virusres.2010.09.021
- Cheung, A.K., Lager, K.M., Kohutyuk, O.I., Vincent, A.L., Henry, S.C., Baker, R.B., Rowland, R.R., Dunham, A.G., 2007. Detection of two porcine circovirus type 2 genotypic groups in United States swine herds. *Arch. Virol.* 152, 1035–1044. doi:10.1007/s00705-006-0909-6
- Kaisho, T., Takeuchi, O., Kawai, T., Hoshino, K., Akira, S., 2001. Endotoxin-Induced Maturation of MyD88-Deficient Dendritic Cells. *J Immunol* 166, 5688–5694. doi:10.4049/jimmunol.166.9.5688
- Kamstrup, S., Barfoed, A.M., Frimann, T.H., Ladekjaer-Mikkelsen, A.-S., Bøtner, A., 2004. Immunisation against PCV2 structural protein by DNA vaccination of mice. *Vaccine* 22, 1358–1361. doi:10.1016/j.vaccine.2004.01.032
- Karuppannan, A.K., Jong, M.H., Lee, S.-H., Zhu, Y., Selvaraj, M., Lau, J., Jia, Q., Kwang, J., 2009. Attenuation of porcine circovirus 2 in SPF piglets by abrogation of ORF3 function. *Virology* 383, 338–347. doi:10.1016/j.virol.2008.10.024
- Karuppannan, A.K., Liu, S., Jia, Q., Selvaraj, M., Kwang, J., 2010. Porcine circovirus type 2 ORF3 protein competes with p53 in binding to Pirh2 and mediates the deregulation of p53 homeostasis. *Virology* 398, 1–11. doi:10.1016/j.virol.2009.11.028
- Kekarainen, T., Montoya, M., Dominguez, J., Mateu, E., Segalés, J., 2008. Porcine circovirus type 2 (PCV2) viral components immunomodulate recall antigen responses. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 124, 41–49. doi:10.1016/j.vetimm.2008.01.031
- Kennedy, S., Moffett, D., McNeilly, F., Meehan, B., Ellis, J., Krakowka, S., Allan, G.M., 2000. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome by infection of

- conventional pigs with porcine circovirus type 2 alone or in combination with porcine parvovirus. *J. Comp. Pathol.* 122, 9–24. doi:10.1053/jcpa.1999.0337
- Khayat, R., Brunn, N., Speir, J.A., Hardham, J.M., Ankenbauer, R.G., Schneemann, A., Johnson, J.E., 2011. The 2.3-Angstrom Structure of Porcine Circovirus 2 ▽. *J Virol* 85, 7856–7862. doi:10.1128/JVI.00737-11
- Kiupel, M., Stevenson, G.W., Choi, J., Latimer, K.S., Kanitz, C.L., Mittal, S.K., 2001. Viral replication and lesions in BALB/c mice experimentally inoculated with porcine circovirus isolated from a pig with postweaning multisystemic wasting disease. *Vet. Pathol.* 38, 74–82.
- Krakowka, S., Ellis, J.A., McNeilly, F., Ringler, S., Rings, D.M., Allan, G., 2001. Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV-2). *Vet. Pathol.* 38, 31–42.
- Kutzler, M.A., Weiner, D.B., 2008. DNA vaccines: ready for prime time? *Nat. Rev. Genet.* 9, 776–788. doi:10.1038/nrg2432
- Larochelle, R., Magar, R., D’Allaire, S., 2003. Comparative serologic and virologic study of commercial swine herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can J Vet Res* 67, 114–120.
- Leitner, W.W., Seguin, M.C., Ballou, W.R., Seitz, J.P., Schultz, A.M., Sheehy, M.J., Lyon, J.A., 1997. Immune responses induced by intramuscular or gene gun injection of protective deoxyribonucleic acid vaccines that express the circumsporozoite protein from *Plasmodium berghei* malaria parasites. *J Immunol* 159, 6112–6119.
- Lekcharoensuk, P., Morozov, I., Paul, P.S., Thangthumniyom, N., Wajjawalku, W., Meng, X.J., 2004. Epitope mapping of the major capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) by using chimeric PCV1 and PCV2. *J. Virol.* 78, 8135–8145. doi:10.1128/JVI.78.15.8135-8145.2004
- Liddington, R.C., Yan, Y., Moulai, J., Sahli, R., Benjamin, T.L., Harrison, S.C., 1991. Structure of simian virus 40 at 3.8-A resolution. *Nature* 354, 278–284. doi:10.1038/354278a0
- Lin, C.-M., Jeng, C.-R., Chang, H.-W., Guo, I.-C., Huang, Y.-L., Tsai, Y.-C., Chia, M.-Y., Pang, V.F., 2008. Characterization of porcine circovirus type 2 (PCV2) infection in swine lymphocytes using mitogen-stimulated peripheral blood lymphocytes from healthy PCV2-carrier pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 124, 355–366. doi:10.1016/j.vetimm.2008.04.019
- Lin, C.-M., Jeng, C.-R., Hsiao, S.-H., Liu, J.-P., Chang, C.-C., Chiou, M.-T., Tsai, Y.-C., Chia, M.-Y., Pang, V.F., 2011. Immunopathological characterization of porcine circovirus type 2 infection-associated follicular changes in inguinal lymph nodes using high-throughput tissue microarray. *Vet. Microbiol.* 149, 72–84. doi:10.1016/j.vetmic.2010.10.018
- Liu, J., Bai, J., Zhang, L., Jiang, Z., Wang, X., Li, Y., Jiang, P., 2013. Hsp70 positively regulates porcine circovirus type 2 replication in vitro. *Virology* 447, 52–62. doi:10.1016/j.virol.2013.08.025
- Liu, J., Chen, I., Kwang, J., 2005. Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis. *J. Virol.* 79, 8262–8274. doi:10.1128/JVI.79.13.8262-8274.2005
- Liu, J., Huang, L., Wei, Y., Tang, Q., Liu, D., Wang, Y., Li, S., Guo, L., Wu, H., Liu, C., 2013. Amino acid mutations in the capsid protein produce novel porcine circovirus type 2 neutralizing epitopes. *Vet. Microbiol.* 165, 260–267. doi:10.1016/j.vetmic.2013.03.013
- Liu, J., Zhang, L., Zhu, X., Bai, J., Wang, L., Wang, X., Jiang, P., 2014. Heat shock protein 27 is involved in PCV2 infection in PK-15 cells. *Virus Res.* 189, 235–242. doi:10.1016/j.virusres.2014.05.024
- Liu, J., Zhu, Y., Chen, I., Lau, J., He, F., Lau, A., Wang, Z., Karuppanan, A.K., Kwang, J., 2007. The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 interacts with porcine ubiquitin E3 ligase Pirh2 and facilitates p53 expression in viral infection. *J. Virol.* 81, 9560–9567. doi:10.1128/JVI.00681-07

- Liu, Q., Tikoo, S.K., Babiuk, L.A., 2001. Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by porcine circovirus type 2. *Virology* 285, 91–99. doi:10.1006/viro.2001.0922
- López-Soria, S., Segalés, J., Rose, N., Viñas, M.J., Blanchard, P., Madec, F., Jestin, A., Casal, J., Domingo, M., 2005. An exploratory study on risk factors for postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in Spain. *Prev. Vet. Med.* 69, 97–107. doi:10.1016/j.prevetmed.2004.11.015
- Lv, Y., Dai, L., Han, H., Zhang, S., 2012. PCV2 induces apoptosis and modulates calcium homeostasis in piglet lymphocytes in vitro. *Res. Vet. Sci.* 93, 1525–1530. doi:10.1016/j.rvsc.2012.04.003
- Mandrioli, L., Sarli, G., Panarese, S., Baldoni, S., Marcato, P.S., 2004a. Apoptosis and proliferative activity in lymph node reaction in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 97, 25–37.
- Mankertz, A., Mueller, B., Steinfeldt, T., Schmitt, C., Finsterbusch, T., 2003. New reporter gene-based replication assay reveals exchangeability of replication factors of porcine circovirus types 1 and 2. *J. Virol.* 77, 9885–9893.
- Marcekova, Z., Psikal, I., Kosinova, E., Benada, O., Sebo, P., Bumba, L., 2009. Heterologous expression of full-length capsid protein of porcine circovirus 2 in *Escherichia coli* and its potential use for detection of antibodies. *J. Virol. Methods* 162, 133–141. doi:10.1016/j.jviromet.2009.07.028
- Marrack, P., Kappler, J., Mitchell, T., 1999. Type I Interferons Keep Activated T Cells Alive. *J Exp Med* 189, 521–530.
- Martin, H., Le Potier, M.-F., Maris, P., 2008. Virucidal efficacy of nine commercial disinfectants against porcine circovirus type 2. *Vet. J.* 177, 388–393. doi:10.1016/j.tvjl.2007.06.016
- McKeown, N.E., Opriessnig, T., Thomas, P., Guenette, D.K., Elvinger, F., Fenaux, M., Halbur, P.G., Meng, X.J., 2005. Effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) maternal antibodies on experimental infection of piglets with PCV2. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12, 1347–1351. doi:10.1128/CDLI.12.11.1347-1351.2005
- Meehan, B.M., McNeilly, F., Todd, D., Kennedy, S., Jewhurst, V.A., Ellis, J.A., Hassard, L.E., Clark, E.G., Haines, D.M., Allan, G.M., 1998. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *J. Gen. Virol.* 79 (Pt 9), 2171–2179.
- Meerts, P., Misinzo, G., Lefebvre, D., Nielsen, J., Bøtner, A., Kristensen, C.S., Nauwynck, H.J., 2006. Correlation between the presence of neutralizing antibodies against porcine circovirus 2 (PCV2) and protection against replication of the virus and development of PCV2-associated disease. *BMC Vet. Res.* 2, 6. doi:10.1186/1746-6148-2-6
- Meerts, P., Misinzo, G., McNeilly, F., Nauwynck, H.J., 2005a. Replication kinetics of different porcine circovirus 2 strains in PK-15 cells, fetal cardiomyocytes and macrophages. *Arch. Virol.* 150, 427–441. doi:10.1007/s00705-004-0444-2
- Meerts, P., Van Gucht, S., Cox, E., Vandebosch, A., Nauwynck, H.J., 2005b. Correlation between type of adaptive immune response against porcine circovirus type 2 and level of virus replication. *Viral Immunol.* 18, 333–341. doi:10.1089/vim.2005.18.333
- Meerts, P., Misinzo, G., Nauwynck, H.J., 2005c. Enhancement of porcine circovirus 2 replication in porcine cell lines by IFN-gamma before and after treatment and by IFN-alpha after treatment. *J. Interferon Cytokine Res.* 25, 684–693. doi:10.1089/jir.2005.25.684
- Melkebeek, V., Verdonck, F., Stuyven, E., Goddeeris, B., Cox, E., 2006. Plasmid-encoded GM-CSF induces priming of the F4(K88)-specific serum IgA response by FaeG DNA vaccination in pigs. *Vaccine* 24, 4592–4594. doi:10.1016/j.vaccine.2005.08.026
- Misinzo, G., Delputte, P.L., Lefebvre, D.J., Nauwynck, H.J., 2009. Porcine circovirus 2 infection of epithelial cells is clathrin-, caveolae- and dynamin-independent, actin and Rho-GTPase-mediated, and enhanced by cholesterol depletion. *Virus Res.* 139, 1–9. doi:10.1016/j.virusres.2008.09.005

- Misinzo, G., Delputte, P.L., Meerts, P., Lefebvre, D.J., Nauwynck, H.J., 2006. Porcine circovirus 2 uses heparan sulfate and chondroitin sulfate B glycosaminoglycans as receptors for its attachment to host cells. *J. Virol.* 80, 3487–3494. doi:10.1128/JVI.80.7.3487-3494.2006
- Misinzo, G., Delputte, P.L., Nauwynck, H.J., 2008. Inhibition of endosome-lysosome system acidification enhances porcine circovirus 2 infection of porcine epithelial cells. *J. Virol.* 82, 1128–1135. doi:10.1128/JVI.01229-07
- Misinzo, G., Meerts, P., Bublot, M., Mast, J., Weingartl, H.M., Nauwynck, H.J., 2005. Binding and entry characteristics of porcine circovirus 2 in cells of the porcine monocytic line 3D4/31. *J. Gen. Virol.* 86, 2057–2068. doi:10.1099/vir.0.80652-0
- Montross, L., Watkins, S., Moreland, R.B., Mamon, H., Caspar, D.L., Garcea, R.L., 1991. Nuclear assembly of polyomavirus capsids in insect cells expressing the major capsid protein VP1. *J. Virol.* 65, 4991–4998.
- Nabel, G.J., 2013. Designing tomorrow's vaccines. *N. Engl. J. Med.* 368, 551–560. doi:10.1056/NEJMr1204186
- Nawagitgul, P., Morozov, I., Bolin, S.R., Harms, P.A., Sorden, S.D., Paul, P.S., 2000. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *J. Gen. Virol.* 81, 2281–2287.
- Neugebauer, M., Walders, B., Brinkman, M., Ruehland, C., Schumacher, T., Bertling, W.M., Geuther, E., Reiser, C.O.A., Reichel, C., Strich, S., Hess, J., 2006. Development of a vaccine marker technology: display of B cell epitopes on the surface of recombinant polyomavirus-like pentamers and capsoids induces peptide-specific antibodies in piglets after vaccination. *Biotechnol J* 1, 1435–1446. doi:10.1002/biot.200600149
- O'Dea, M.A., Hughes, A.P., Davies, L.J., Muhling, J., Buddle, R., Wilcox, G.E., 2008. Thermal stability of porcine circovirus type 2 in cell culture. *J. Virol. Methods* 147, 61–66. doi:10.1016/j.jviromet.2007.07.029
- Olvera, A., Cortey, M., Segalés, J., 2007. Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. *Virology* 357, 175–185. doi:10.1016/j.virol.2006.07.047
- Opriessnig, T., Ramamoorthy, S., Madson, D.M., Patterson, A.R., Pal, N., Carman, S., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2008. Differences in virulence among porcine circovirus type 2 isolates are unrelated to cluster type 2a or 2b and prior infection provides heterologous protection. *J. Gen. Virol.* 89, 2482–2491. doi:10.1099/vir.0.2008/001081-0
- Opriessnig, T., Thacker, E.L., Yu, S., Fenaux, M., Meng, X.-J., Halbur, P.G., 2004. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. *Vet. Pathol.* 41, 624–640. doi:10.1354/vp.41-6-624
- Pallarés, F.J., Halbur, P.G., Opriessnig, T., Sorden, S.D., Villar, D., Janke, B.H., Yaeger, M.J., Larson, D.J., Schwartz, K.J., Yoon, K.J., Hoffman, L.J., 2002. Porcine circovirus type 2 (PCV-2) coinfections in US field cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *J. Vet. Diagn. Invest.* 14, 515–519.
- Parlato, S., Santini, S.M., Lapenta, C., Di Pucchio, T., Logozzi, M., Spada, M., Giammarioli, A.M., Malorni, W., Fais, S., Belardelli, F., 2001. Expression of CCR-7, MIP-3beta, and Th-1 chemokines in type I IFN-induced monocyte-derived dendritic cells: importance for the rapid acquisition of potent migratory and functional activities. *Blood* 98, 3022–3029.
- Pertmer, T.M., Roberts, T.R., Haynes, J.R., 1996. Influenza virus nucleoprotein-specific immunoglobulin G subclass and cytokine responses elicited by DNA vaccination are dependent on the route of vector DNA delivery. *J. Virol.* 70, 6119–6125.
- Radvanyi, L.G., Banerjee, A., Weir, M., Messner, H., 1999. Low levels of interferon-alpha induce CD86 (B7.2) expression and accelerates dendritic cell maturation from human peripheral blood mononuclear cells. *Scand. J. Immunol.* 50, 499–509.

- Ramamoorthy, S., Huang, F.F., Huang, Y.W., Meng, X.J., 2009. Interferon-mediated enhancement of in vitro replication of porcine circovirus type 2 is influenced by an interferon-stimulated response element in the PCV2 genome. *Virus Res.* 145, 236–243. doi:10.1016/j.virusres.2009.07.009
- Raz, E., Tighe, H., Sato, Y., Corr, M., Dudler, J.A., Roman, M., Swain, S.L., Spiegelberg, H.L., Carson, D.A., 1996. Preferential induction of a Th1 immune response and inhibition of specific IgE antibody formation by plasmid DNA immunization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 5141–5145.
- Resendes, A.R., Majó, N., Segalés, J., Mateu, E., Calsamiglia, M., Domingo, M., 2004. Apoptosis in lymphoid organs of pigs naturally infected by porcine circovirus type 2. *J. Gen. Virol.* 85, 2837–2844. doi:10.1099/vir.0.80221-0
- Rodríguez-Cariño, C., Duffy, C., Sánchez-Chardi, A., McNeilly, F., Allan, G.M., Segalés, J., 2011. Porcine circovirus type 2 morphogenesis in a clone derived from the I35 lymphoblastoid cell line. *J. Comp. Pathol.* 144, 91–102. doi:10.1016/j.jcpa.2010.07.001
- Rovira, A., Balasch, M., Segalés, J., García, L., Plana-Durán, J., Rosell, C., Ellerbrok, H., Mankertz, A., Domingo, M., 2002. Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2. *J. Virol.* 76, 3232–3239.
- Saha, D., Lefebvre, D.J., Ooms, K., Huang, L., Delputte, P.L., Van Doorselaere, J., Nauwynck, H.J., 2012. Single amino acid mutations in the capsid switch the neutralization phenotype of porcine circovirus 2. *J. Gen. Virol.* 93, 1548–1555. doi:10.1099/vir.0.042085-0
- Sanchez, R.E., Meerts, P., Nauwynck, H.J., Ellis, J.A., Pensaert, M.B., 2004. Characteristics of porcine circovirus-2 replication in lymphoid organs of pigs inoculated in late gestation or postnatally and possible relation to clinical and pathological outcome of infection. *J. Vet. Diagn. Invest.* 16, 175–185.
- Segalés, J., 2012. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Res.* 164, 10–19. doi:10.1016/j.virusres.2011.10.007
- Shang, S.-B., Jin, Y.-L., Jiang, X., Zhou, J.-Y., Zhang, X., Xing, G., He, J.L., Yan, Y., 2009. Fine mapping of antigenic epitopes on capsid proteins of porcine circovirus, and antigenic phenotype of porcine circovirus type 2. *Mol. Immunol.* 46, 327–334. doi:10.1016/j.molimm.2008.10.028
- Shen, H.-G., Zhou, J.-Y., Zhang, X., Huang, Z.-Y., He, J.-L., Yan, Y., 2009. Interference of porcine circovirus type 2 ORF2 immunogenicity by ORF1 and ORF3 mixed DNA immunizations in mice. *Virology* 393, 104–111. doi:10.1016/j.virol.2009.07.035
- Shibahara, T., Sato, K., Ishikawa, Y., Kadota, K., 2000. Porcine circovirus induces B lymphocyte depletion in pigs with wasting disease syndrome. *J. Vet. Med. Sci.* 62, 1125–1131.
- Steiner, E., Balmelli, C., Gerber, H., Summerfield, A., McCullough, K., 2009. Cellular adaptive immune response against porcine circovirus type 2 in subclinically infected pigs. *BMC Vet. Res.* 5, 45. doi:10.1186/1746-6148-5-45
- Steiner, E., Balmelli, C., Herrmann, B., Summerfield, A., McCullough, K., 2008. Porcine circovirus type 2 displays pluripotency in cell targeting. *Virology* 378, 311–322. doi:10.1016/j.virol.2008.06.009
- Su, B., Wang, J., Wang, X., Jin, H., Zhao, G., Ding, Z., Kang, Y., Wang, B., 2008. The effects of IL-6 and TNF- α as molecular adjuvants on immune responses to FMDV and maturation of dendritic cells by DNA vaccination. *Vaccine* 26, 5111–5122. doi:10.1016/j.vaccine.2008.03.089
- Timmusk, S., Fossum, C., Berg, M., 2006. Porcine circovirus type 2 replicase binds the capsid protein and an intermediate filament-like protein. *J. Gen. Virol.* 87, 3215–3223. doi:10.1099/vir.0.81785-0

- Tischer, I., Gelderblom, H., Vettermann, W., Koch, M.A., 1982. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature* 295, 64–66.
- Tischer, I., Peters, D., Rasch, R., Pociuli, S., 1987. Replication of porcine circovirus: induction by glucosamine and cell cycle dependence. *Arch. Virol.* 96, 39–57.
- Tischer, I., Rasch, R., Tochtermann, G., 1974. Characterization of papovavirus-and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralbl Bakteriolog Orig A* 226, 153–167.
- Torres, C.A., Iwasaki, A., Barber, B.H., Robinson, H.L., 1997. Differential dependence on target site tissue for gene gun and intramuscular DNA immunizations. *J Immunol* 158, 4529–4532.
- Trevejo, J.M., Marino, M.W., Philpott, N., Josien, R., Richards, E.C., Elkon, K.B., Falck-Pedersen, E., 2001. TNF- α -dependent maturation of local dendritic cells is critical for activating the adaptive immune response to virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 12162–12167. doi:10.1073/pnas.211423598
- Trible, B.R., Kerrigan, M., Crossland, N., Potter, M., Faaberg, K., Hesse, R., Rowland, R.R.R., 2011. Antibody recognition of porcine circovirus type 2 capsid protein epitopes after vaccination, infection, and disease. *Clin. Vaccine Immunol.* 18, 749–757. doi:10.1128/CVI.00418-10
- Trible, B.R., Suddith, A.W., Kerrigan, M.A., Cino-Ozuna, A.G., Hesse, R.A., Rowland, R.R.R., 2012. Recognition of the different structural forms of the capsid protein determines the outcome following infection with porcine circovirus type 2. *J. Virol.* 86, 13508–13514. doi:10.1128/JVI.01763-12
- Vega-Rocha, S., Byeon, I.-J.L., Gronenborn, B., Gronenborn, A.M., Campos-Olivas, R., 2007. Solution structure, divalent metal and DNA binding of the endonuclease domain from the replication initiation protein from porcine circovirus 2. *J. Mol. Biol.* 367, 473–487. doi:10.1016/j.jmb.2007.01.002
- Velupillai, P., Sung, C.K., Andrews, E., Moran, J., Beier, D., Kagan, J., Benjamin, T., 2012. Polymorphisms in toll-like receptor 4 underlie susceptibility to tumor induction by the mouse polyomavirus. *J. Virol.* 86, 11541–11547. doi:10.1128/JVI.01614-12
- Vincent, I.E., Balmelli, C., Meehan, B., Allan, G., Summerfield, A., McCullough, K.C., 2007. Silencing of natural interferon producing cell activation by porcine circovirus type 2 DNA. *Immunology* 120, 47–56. doi:10.1111/j.1365-2567.2006.02476.x
- Vincent, I.E., Carrasco, C.P., Guzylack-Piriou, L., Herrmann, B., McNeilly, F., Allan, G.M., Summerfield, A., McCullough, K.C., 2005. Subset-dependent modulation of dendritic cell activity by circovirus type 2. *Immunology* 115, 388–398. doi:10.1111/j.1365-2567.2005.02165.x
- Vincent, I.E., Carrasco, C.P., Herrmann, B., Meehan, B.M., Allan, G.M., Summerfield, A., McCullough, K.C., 2003. Dendritic cells harbor infectious porcine circovirus type 2 in the absence of apparent cell modulation or replication of the virus. *J. Virol.* 77, 13288–13300.
- Wang, X., Jiang, P., Li, Y., Jiang, W., Dong, X., 2007. Protection of pigs against post-weaning multisystemic wasting syndrome by a recombinant adenovirus expressing the capsid protein of porcine circovirus type 2. *Veterinary Microbiology* 121, 215–224. doi:10.1016/j.vetmic.2006.11.027
- Wei, L., Kwang, J., Wang, J., Shi, L., Yang, B., Li, Y., Liu, J., 2008. Porcine circovirus type 2 induces the activation of nuclear factor kappa B by IkappaB α degradation. *Virology* 378, 177–184. doi:10.1016/j.virol.2008.05.013
- Wei, L., Liu, J., 2009. Porcine circovirus type 2 replication is impaired by inhibition of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway. *Virology* 386, 203–209. doi:10.1016/j.virol.2009.01.010
- Wei, L., Zhu, S., Wang, J., Liu, J., 2012. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway during porcine circovirus type 2 infection facilitates cell survival and viral replication. *J. Virol.* 86, 13589–13597. doi:10.1128/JVI.01697-12

- Wei, L., Zhu, Z., Wang, J., Liu, J., 2009. JNK and p38 mitogen-activated protein kinase pathways contribute to porcine circovirus type 2 infection. *J. Virol.* 83, 6039–6047. doi:10.1128/JVI.00135-09
- Welch, J., Bienek, C., Gomperts, E., Simmonds, P., 2006. Resistance of porcine circovirus and chicken anemia virus to virus inactivation procedures used for blood products. *Transfusion* 46, 1951–1958. doi:10.1111/j.1537-2995.2006.01003.x
- Wikström, F.H., Meehan, B.M., Berg, M., Timmus, S., Elving, J., Fuxler, L., Magnusson, M., Allan, G.M., McNeilly, F., Fossum, C., 2007. Structure-dependent modulation of alpha interferon production by porcine circovirus 2 oligodeoxyribonucleotide and CpG DNAs in porcine peripheral blood mononuclear cells. *J. Virol.* 81, 4919–4927. doi:10.1128/JVI.02797-06
- Wu, P.-C., Chien, M.-S., Tseng, Y.-Y., Lin, J., Lin, W.-L., Yang, C.-Y., Huang, C., 2008. Expression of the porcine circovirus type 2 capsid protein subunits and application to an indirect ELISA. *Journal of Biotechnology* 133, 58–64. doi:10.1016/j.jbiotec.2007.09.015
- Yu, S., Vincent, A., Opriessnig, T., Carpenter, S., Kitikoon, P., Halbur, P.G., Thacker, E., 2007. Quantification of PCV2 capsid transcript in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in vitro. *Vet. Microbiol.* 123, 34–42. doi:10.1016/j.vetmic.2007.02.021
- Zganiacz, A., Santosuosso, M., Wang, J., Yang, T., Chen, L., Anzulovic, M., Alexander, S., Gicquel, B., Wan, Y., Bramson, J., Inman, M., Xing, Z., 2004. TNF-alpha is a critical negative regulator of type 1 immune activation during intracellular bacterial infection. *J. Clin. Invest.* 113, 401–413. doi:10.1172/JCI18991
- Zhou, J.-Y., Shang, S.-B., Gong, H., Chen, Q.-X., Wu, J.-X., Shen, H.-G., Chen, T.-F., Guo, J.-Q., 2005. In vitro expression, monoclonal antibody and bioactivity for capsid protein of porcine circovirus type II without nuclear localization signal. *J. Biotechnol.* 118, 201–211. doi:10.1016/j.jbiotec.2005.02.017
- Zhu, B., Xu, F., Li, J., Shuai, J., Li, X., Fang, W., 2012. Porcine circovirus type 2 explores the autophagic machinery for replication in PK-15 cells. *Virus Res.* 163, 476–485. doi:10.1016/j.virusres.2011.11.012