

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

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program Biologie
Studijní obor Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Dominik Musil

Experimentální systém pro produkci IL-15 na virových nosičích

Experimental system for production of IL-15 on viral carriers

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Hana Španielová, Ph.D.

Praha 2020

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.

Místo a datum:

Podpis:

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěl moc poděkovat paní doktorce Haně Španielové za neocenitelnou pomoc, podnětné rady, čas a poskytnutou příležitost k vypracování této práce na dané téma. Také bych chtěl velmi poděkovat paní Mgr. Alžbětě Hejtmánkové a Mgr. Janě Váňové za jejich podporu, pomoc a množství času, které mi věnovaly. Rovněž děkuji členům laboratoře za přátelské pracovní prostředí.

Dále bych chtěl poděkovat panu prof. Vladimíru Holáňovi a RNDr. Miladě Schierové, za poskytnutý materiál, RNDr. Martinu Fraiberkovi za poskytnuté rady a Bc. Danielu Žuchovi za vytvoření grafů.

Především však děkuji své rodině za podporu, pochopení a trpělivost během mého studia. Také děkuji Karolíně Anderové nejenom za podporu při zpracování práce.

Abstrakt:

Interleukin 15 má velký potenciál pro využití například v biologické léčbě nádorových onemocnění. Je zapojen do celé řady imunitních procesů, kde mezi nejdůležitější z nich patří ovlivnění a indukce proliferace NK buněk a T-lymfocytů. Při terapeutickém použití je jeho nevýhodou nízká stabilita a krátký poločas života v organismu. Z tohoto důvodu jsou zkoumány různé možnosti, jak ho stabilizovat a rozšířit jeho biologickou aktivitu.

V rámci této práce byl analyzován nový přístup, kdy byly využity virové nanostruktury odvozené od hlavního kapsidového proteinu myšího polyomaviru VP1 jako nosiče IL-15. VP1 proteiny tvořící nanonosiče mohou být relativně snadno modifikovány a jsou schopné umožnit průnik do nádorové tkáně.

V bakulovirovém expresním systému v buňkách SF9 byly spolu s kontrolními nanostrukturami produkovány dvě varianty lidského IL-15, z nichž jedna byla tvořena samotným IL-15 a druhá fúzním proteinem IL-15 a zkrácenou variantou VP1. Proteinové konstrukty byly charakterizovány elektronovou mikroskopií a biochemickými metodami. Celkový proteinový výtěžek fúzní varianty VP1 Δ C-IL15-HIS byl vyšší (dosahoval až 53 mg/L kompletního média) než samotného IL-15 (8,5 mg/L).

Při testování biologické aktivity připravených proteinových konstruktů nicméně nebyla u žádného z nich prokázána indukce proliferace *in vitro* u buněk Jurkat a buněk CTLL-2 a to ani s použitím IL-15 produkovaného v buňkách SF9. Výsledky této práce naznačují, že bakulovirový expresní systém není vhodný pro produkci funkčních variant IL-15.

Klíčová slova: Interleukin 15, VLPs, myší polyomavirus, kapsidový protein VP1, nanostruktury, bakulovirový expresní systém

Abstract:

Interleukin 15 has great application potential such as in the biological treatment of cancer. It is involved in a variety of immunological processes, the most important of these involve influencing and induction of NK cells and T-lymphocytes proliferation. However, its therapeutic usages are limited by a low stability and short half-life. For this reason, there are various approaches of stabilization and expansion of its biological activity being explored.

In this work, we analysed and developed a new approach, which uses viral nanostructures derived from major capsid VP1 protein of mouse polyomavirus as a carrier of IL-15. Moreover, VP1 proteins can be relatively easily modified and they are also capable to penetrate into the tumour cells.

There were prepared two variants of IL-15 together with control nanostructures in the baculovirus expression system, one was composed of IL-15 and the other of the IL-15 fusion protein and truncated variant of VP1. Protein constructs were characterized by electron microscopy and biochemical methods. The total protein yield of VP1 Δ C-IL15-HIS fusion variant was higher (up to 53 mg/L of complete medium) than IL-15 alone (8,5 mg/L).

However, testing of the biological activity of the prepared proteins *in vitro* did not show any induction of proliferation on Jurkat and CTLL-2 cells even when using IL-15 produced in SF9 cells. The results of this work suggest that the baculovirus expression system is not suitable to produce functional variants of IL-15.

Key words: Interleukin 15, VLPs, mouse polyomavirus, capsid protein VP1, nanostructures, baculovirus expression system

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Literární přehled.....	3
2.1	Interleukin 15 a protinádorová terapie.....	4
2.2	Charakteristika IL-15 a jeho signalizace	4
2.3	Další vlastnosti IL-15	8
2.4	Možnosti zlepšení vlastností IL-15.....	9
2.5	Myší polyomavirus	15
2.6	Životní cyklus MPyV	15
2.7	Virová kapsida a VP1 protein.....	15
2.8	Polyomavirové VLPs.....	16
2.9	Využití VLPs	17
2.10	VLPs a IL-15	19
3	Cíle práce	20
4	Materiál a metody	22
4.1	Materiál.....	23
4.1.1	Seznam chemikálií	23
4.1.2	Laboratorní přístroje.....	24
4.1.3	Složení běžně užívaných roztoků.....	25
4.1.4	Kultivační média	26
4.1.5	Protilátky	27
4.1.6	Antibiotika.....	27
4.1.7	Enzymy.....	28
4.1.8	Buněčné kultury a virová inokula	28
4.1.9	Komerční soupravy	28
4.1.10	Standardy pro určení molekulových hmotností	29
4.1.11	Použité plazmidy	29
4.1.12	Vektory.....	30
4.1.13	Primery.....	30
4.1.14	Použitý software	30
4.1.15	Ostatní materiál	30
4.2	Metody.....	31
4.2.1	Sterilizace	31
4.2.2	Příprava plazmidů a práce s bakteriálními kulturami.....	31
4.2.3	Metody využití pro práci s DNA	34

4.2.4	Příprava rekombinantního bakuloviru.....	35
4.2.5	Izolace proteinů a virových částic	37
4.2.6	Charakterizace proteinů.....	38
5	Výsledky	41
5.1	Experimentální schéma práce	42
5.2	Příprava a modifikace jednotlivých plazmidů metodami genového inženýrství.....	44
5.3	Příprava recBac DNA a produkce proteinů v bakulovirovém expresním systému ...	45
5.3.1	Izolace recBac DNA z DH10Bac buněk	45
5.3.2	Ověření úspěšné rekombinace v recBac DNA PCR reakcí.....	46
5.3.3	Transfekce recBac DNA do buněk SF9 a izolace celkové DNA.....	47
5.3.4	Plaková titrace	48
5.3.5	Imunofluorescence recBacV infikovaných SF9 buněk	48
5.3.6	Infekce buněk SF9.....	50
5.4	Izolace proteinů	52
5.4.1	Izolace proteinů VP1-HIS, VP1 Δ C-HIS a VP1 Δ	52
5.4.2	Izolace proteinů VP1 Δ C-IL15-HIS	52
5.4.3	Izolace proteinu IL15-HIS	53
5.5	Charakterizace částic	54
5.5.1	Elektroforetická separace proteinů v polyakrylamidovém gelu.....	54
5.5.2	Imunodetekce proteinů na membráně	56
5.5.3	Vizualizace VLPs a VNS elektronovou mikroskopií.....	59
5.6	Testování vlastností připravených konstruktů	60
5.6.1	Proliferační zkouška na buňkách Jurkat	60
5.6.2	Proliferační zkouška na buňkách CTLL-2	62
6	Diskuze	64
7	Souhrn	74
	Seznam použité literatury:.....	77

Seznam zkratek:

APC	buňka prezentující antigen (z angl. antigen presenting cells)
APS	peroxodisíran amonný
BSM	bezsérové médium
DAPI	4',6-diamin-2-fenylindol fluorescenční barva
DC	dendritická buňka (z angl. dendritic cells)
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
FBS	fetální sérum z telete
HIS	histidinová kotva
IL-2	interleukin 2
IL-15	interleukin 15
IL-15 DC	maturované a specifické dendritické buňky připravení působením IL-15
IL15-HIS	proteinový konstrukt tvořený interleukinem 15 a histidinovou kotvou
IL-15R	receptor pro interleukin 15
IL-15 LSP	dlouhý signální peptid IL-15 (z angl. IL-15 long signal peptide)
IL-15 SSP	krátký signální peptid IL-15 (z angl. IL-15 short signal peptide)
JAK	Janusova kináza
MPyV	myší polyomavirus
MW	molekulová hmotnost
NK	negativní kontrola
PBS	solný roztok pufovaný fosfátem
pFB	plazmid konstrukt pFastBac 1
PK	pozitivní kontrola
PSA	prostatický specifický antigen
RD	IL-15R α sushi doména, Kermer et al. (2012)
recBac DNA	rekombinantní bakmidová DNA
recBacV	rekombinantní bakulovirus
RLI	receptor-linker IL-15, Bessard et al. (2009)
SDS	dodecylsírán sodný
TAE	tris-acetátový pufr
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamin
VLPs	částice podobné virům (z angl. virus like particles)
VNS	virové nanostruktury
VP1-HIS	proteinový konstrukt tvořený VP1 proteinem a histidinovou kotvou
VP1 Δ C-HIS	proteinový konstrukt tvořený zkráceným VP1 proteinem a histidinovou kotvou
VP1 Δ C	proteinový konstrukt tvořený zkráceným VP1 proteinem
VP1-IL15-HIS	proteinový konstrukt tvořený VP1 proteinem, interleukinem 15 a histidinovou kotvou
VP1 Δ C-IL15-HIS	proteinový konstrukt tvořený zkráceným VP1 proteinem, interleukinem 15 a histidinovou kotvou
wt	přirozený virus (z angl. wild type virus)

1 Úvod

Malé nebuněčné částice, původci mnoha různých onemocnění nejenom u člověka, ale i u jiných druhů, to všechno jsou viry. Většinou asociují negativní jevy, jakými například jsou nákaza, nebezpečí, škodlivost, onemocnění a podobně. Nicméně, při vhodné manipulaci lze využít virové částice i v náš prospěch. Příkladem může být užití virů při přípravě vakcín. Nebo při genové terapii mohou být viry použity jako virové vektory třeba pro přenos esenciálních genů do poškozených buněk či tkání (Schiedner et al., 1998). Současně se pod souhrnným označením viroterapie využívají vlastnosti onkolytických virů schopných eliminovat nádorové buňky (Guo et al., 2008). Dalším velmi zajímavým přístupem je využití virů jako tzv. přepravních částic pro transport různých látek. V tomto případě látka určená k transportu může být ukotvena na povrch virových částic anebo, pokud bude odstraněna virová genetická informace, může dojít k zabalení dané látky do virové partikule. Virové částice tedy mohou být využity jako nosiče různých terapeutických látek (Steinmetz, 2013) či vakcín (Kawano et al., 2014; Tegerstedt et al., 2005). Lze předpokládat, že při vhodném zvolení přepravované látky lze upravené virové částice využít při léčbě různých, například nádorových, onemocnění.

Nádorová onemocnění neboli rakovina jsou zhoubná onemocnění postihující všelijaké typy buněk a tkání u různých živočichů, nejenom člověka. Předpokládá se, že rakovinou onemocní každá třetí osoba žijící na území České republiky (“Česká republika a rakovina v číslech» Linkos.cz,”). Rakovina je typicky charakterizovaná vysokým počtem autonomně se replikujících buněk, které se mohou rozšířit po celém těle a způsobit závažné zdravotní komplikace až smrt. Mezi nejběžnější přístupy léčby nádorových onemocnění patří chemoterapie, chirurgický zákrok a radioterapie. Kromě těchto nejvyužívanějších léčebných přístupů existují také další přístupy, například imunoterapie. Tento biologický způsob léčby moduluje imunitní systém k deaktivaci či k aktivaci a posílení specifických buněk a složek imunitního systému v boji a působení proti nádorovým útvarům. Existuje široké spektrum látek nazývaných imunomodulátory využívaných v imunoterapii a k aktivaci specifických efektorových buněk, kterými jsou NK buňky a T-lymfocyty. Těmito látkami mohou být různé typy monoklonálních protilátek, inhibitory proteinů, antisense oligonukleotidy nebo cytokiny.

Má diplomová práce, ve které jsem se zaměřil na konstrukci virových nosičů nesoucí interleukin 15, se zabývá aktuální a intenzivně studovanou problematikou optimální kombinace látek využitelných v léčbě nejenom nádorových onemocnění.

2 Literární přehled

2.1 Interleukin 15 a protinádorová terapie

Nejčastěji využívanými látkami v aktivní nespecifické protinádorové imunoterapii jsou spolu s protilátkami cytokiny. Jedná se o malé molekuly, které jsou součástí jak vrozené, tak i adaptivní imunity, působící jako regulátory imunitní odpovědi. Cytokiny se obvykle vyznačují svými pleiotropními účinky a vysokým stupněm redundance účinku, tedy schopností zastávat široké spektrum funkcí v různých typech tkání (Tagaya et al., 1996). Kromě toho většinou působí v kaskádě a spouští indukci dalších složek imunitní odpovědi. Jako cytokiny, které je možné rozdělit do více podskupin, lze považovat například některé interleukiny, chemokiny, interferony či růstové faktory.

Jedním z nejslibnějších cytokinů a molekul vůbec použitelných v protinádorové imunoterapii je interleukin 15 (IL-15; Cheever, 2008). Tento 14-15 kDa (Grabstein et al., 1994) velký signální protein, který se podílí na aktivaci a kontrole jak vrozené, tak i antigenně specifické imunity, prokázal své pozitivní schopnosti při regresi nádorů a léčbě metastáz (Klebanoff et al., 2004; Tang et al., 2008). Mezi jeho významné vlastnosti patří stimulace a ovlivnění produkce NK buněk (Huntington et al., 2009; Ogasawara et al., 1998; Ohteki et al., 1997; Stoklasek et al., 2006) a T-lymfocytů (Bamford et al., 1994; Berard et al., 2003; Lodolce et al., 1998; Marks-Konczalik et al., 2000; Schluns et al., 2002; Stoklasek et al., 2006; Zhang et al., 1998), tedy dvou typů buněk nezbytných pro účinnou biologickou léčbu nádorů. NK buňky jsou důležité v imunitní odpovědi proti rakovině, zejména při eliminaci metastazujících buněk a malých nádorů (Stojanovic a Cerwenka, 2011). Kromě toho mají na svém povrchu receptor pro IL-15 (IL-15R) a mohou jím tedy být přímo aktivovány (Kobayashi et al., 2005). IL-15 navíc dokáže prodloužit jejich přežívání a cytotoxicitu vůči nádorům. Původně byly NK buňky popsány jako imunitní buňky schopné ničit nádorové buňky bez předchozí senzibilizace (Kiessling et al., 1975; Stojanovic a Cerwenka, 2011). Mohou rozeznat a díky svým významným cytotoxickým vlastnostem eliminovat i infikované buňky, zatímco T-lymfocyty zprostředkovávají důležité regulační a efektorové funkce, včetně produkce lymfokinů a cytotoxické destrukce buněk nesoucích antigen (Bamford et al., 1994). Dalšími vlastnostmi NK buněk je také schopnost produkce a sekrece různých cytokinů. Díky těmto dvěma hlavním typům aktivovaných buněk je IL-15 slibnou molekulou v protinádorové terapii.

2.2 Charakteristika IL-15 a jeho signalizace

Tento „zázračný“ protein objevený v roce 1994 byl původně charakterizován pouze jako růstový faktor T-lymfocytů (Burton et al., 1994; Grabstein et al., 1994). Nicméně od té

doby byly popsány i jeho další funkce a procesy, které může ovlivňovat. Díky své struktuře a vlastnostem, stejně jako schopnosti aktivovat adaptivní i vrozenou imunitní odpověď, je IL-15 slibným kandidátem pro léčbu různých infekčních, autoimunitních a nádorových onemocnění.

Gen pro IL-15, který se nachází na lidském chromosomu v pozici 4q31, je velký 34 kbp (Anderson et al., 1995; Krause et al., 1996). Navíc tento gen kóduje dvě mRNA izoformy, které se liší v délce svých signálních peptidů, tedy dlouhé (IL-15 LSP, z angl. IL-15 long signal peptide) a krátké signální peptidy IL-15 (IL-15 SSP, z angl. IL-15 short signal peptide). Obě izoformy shodně produkují stejný protein, jediným jejich rozdílem je intracelulární směřování. Sekretovaný nebo membránově vázaný IL-15 LSP, který se může vázat na povrch různých buněk, se nachází v Golgiho aparátu, endoplazmatickém retikulu či endozómu, zatímco IL-15 SSP se vyskytuje převážně v cytoplazmě a jádře (Tagaya et al., 1997).

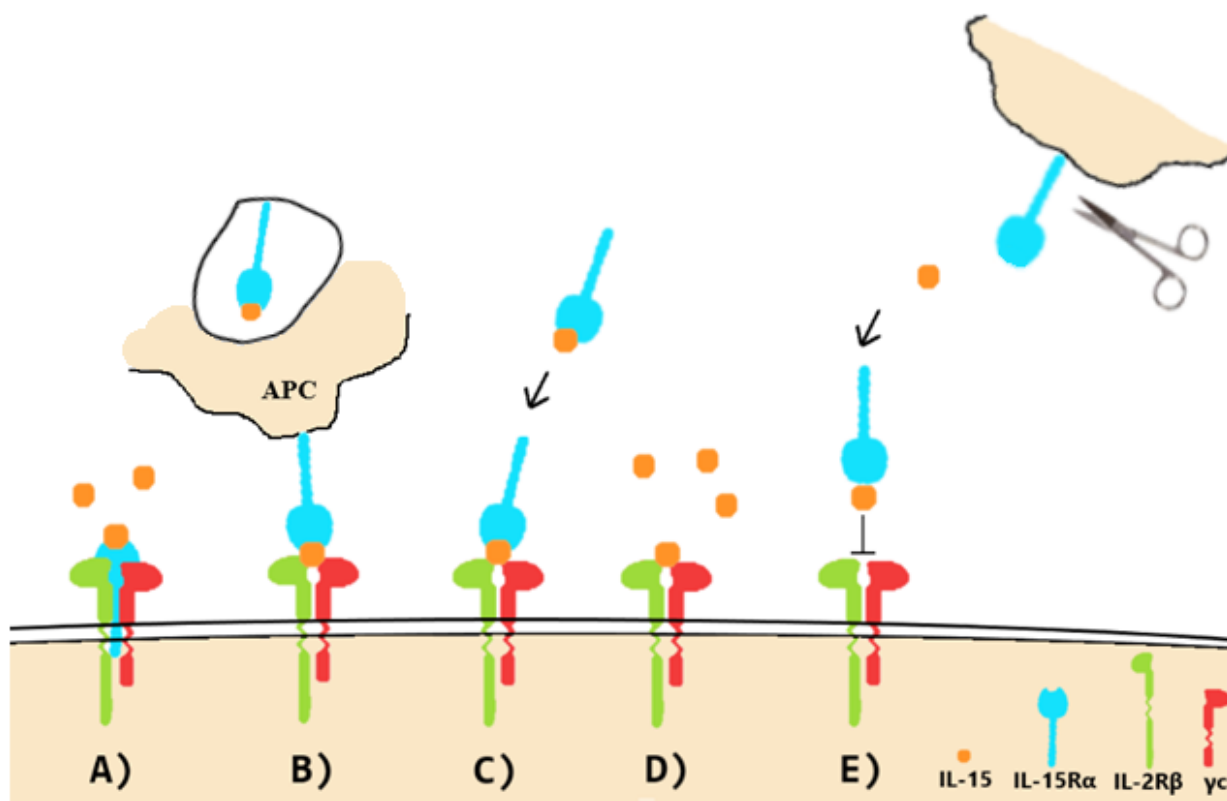
IL-15 je na základě svých téměř shodných biologických aktivit a strukturních podobností řazen do receptorové „rodiny interleukinu 2 (IL-2)“, ke kterému je připodobňován. Oba interleukiny nicméně nesdílí žádnou sekvenční homologii (Grabstein et al., 1994). IL-2 a IL-15 jsou hemopoetické růstové faktory, které obsahují čtyři α -helikální úseky ve svém polypeptidovém řetězci. Oba tyto interleukiny mají navíc téměř shodné receptorové podjednotky (Bamford et al., 1994).

Receptor pro IL-15 se skládá z IL-2R β , γ c a IL-15R α receptorové podjednotky, která je velmi unikátní a specifická pouze pro IL-15. Signální podjednotky IL-2R β a γ c obsahuje také receptor pro IL-2 (Anderson et al., 1995; Giri et al., 1995; Grabstein et al., 1994), zatímco podjednotka IL-15R α je v něm nahrazena receptorovou podjednotkou IL-2R α . Obě podjednotky, IL-15R α a IL-2R α obsahují krátké cytoplazmatické oblasti spolu s extracelulárními částmi, které zahrnují Pro/Thr oblast a motiv vázající protein, tzv. Sushi doménu (Giri et al., 1995). Ta je také známá jako GP-I motiv nebo SCR oblast (z angl. short consensus repeat). IL-15R α receptorová podjednotka obsahuje Sushi doménu pouze jedenkrát, zatímco IL-2R α podjednotka dvakrát. Bez této Sushi domény nedochází k vazbě IL-15 na IL-15R α (Dubois et al., 1999; Mortier et al., 2006).

Společným rysem receptorů „rodiny IL-2“ jsou překrývající se či zastupitelné funkce, které vyplývají právě ze shodných receptorových podjednotek a tím i dráhy intracelulární signalizace (Anderson et al., 1995). Oba interleukiny, IL-15 a IL-2, jsou schopny aktivovat NK buňky a T-lymfocyty, nicméně IL-15 v mnohem větší míře. IL-15 je na rozdíl od IL-2 produkován také monocyty (Bamford et al., 1996; Carson et al., 1995), dendritickými

buňkami (DC, z angl. dendritic cells; Mattei et al., 2001) a stromálními buňkami kostní dřeně (Cui et al., 2014), zatímco IL-2 je produkován výhradně aktivovanými T-lymfocyty (Marks-Konczalik et al., 2000). Dalším rozdílem je jejich odlišná schopnost ovlivňovat produkci T-regulačních a CD4 buněk. Na rozdíl od IL-2, který udržuje toleranci periferních T-buněk jejich apoptózou, IL-15 funguje jako růstový faktor a inhibuje apoptózu T-buněk (Akbar et al., 1996; Marks-Konczalik et al., 2000).

IL-15 se může vyskytovat ve více formách, nejčastěji jako solubilní nebo vázaný v komplexu. Solubilní IL-15 se vyskytuje jako samostatný protein a signální dráhy aktivuje mechanismem tzv. cis-prezentace (Perdreau et al., 2010), kdy se váže na kompletní receptor složený z podjednotek IL-15R α , IL-2R β a γ c (obr. 1A, str. 7). Předpokládá se, že tento mechanismus je typický zejména pro buňky, které jsou schopny autokrinní a parakrinní signalizace. Jako vázaný v komplexu IL-15 interaguje se samostatnou vysokoafinitní podjednotkou IL-15R α . Tu lze často nalézt na povrchu buněk prezentujících antigen (APC, z angl. antigen presenting cell) a spolu s IL-15 zde tvoří IL-15/IL-15R α komplex. IL-15/IL-15R α na APC interaguje s receptorem složeným z IL-2R β a γ c (obr. 1B, str. 7), který mají na svém povrchu také NK buňky. Tento mechanismus se nazývá trans-prezentace a má velký význam v ovlivnění produkce a aktivace NK buněk (Burkett et al., 2004). Existuje i solubilní komplex IL-15/IL-15R α , obecně označovaný jako tzv. IL-15R α agonista, který může rovněž interagovat s receptorem složeným z IL-2R β a γ c (obr. 1C, str. 7). Na tento receptor se může vázat i samotný IL-15, nicméně s mnohem nižší vazebnou afinitou než v komplexu s IL-15R α (obr. 1D, str. 7; Giri et al., 1994). Mortier et al. (2004) objevili, že IL-15R α může být štěpena matrixovými metaloproteinázami. Tento tzv. IL-15R α antagonist může interagovat se solubilním IL-15 a blokovat jeho signalizační aktivitu (obr. 1E, str. 7; Kim et al., 1998; Mortier et al., 2004). Mechanismy působení IL-15 však nejsou plně prozkoumány a sami autoři se mnohdy neshodují.



Obr. 1 – Mechanismy působení IL-15. Solubilní IL-15 se váže na receptor složený z IL-15R α , IL-2R β a γ c podjednotek a mechanismem tzv. cis-prezentace spouští signalizaci (A). IL-15 a IL-15R α spolu interagují v endoplazmatickém retikulu za vzniku komplexu IL-15/IL-15R α , který je vystaven na povrchu zejména APC buněk. Zde mechanismem tzv. trans-prezentace stimuluje sousední buňky prostřednictvím vazby na receptor složený z podjednotek IL-2R β a γ c (B). Solubilní komplex IL-15/IL-15R α může jako tzv. agonista rovněž stimulovat okolní buňky prostřednictvím vazby na receptor složený z IL-2R β a γ c (C). Solubilní IL-15 může interagovat s IL-2R β a γ c receptorovými podjednotkami, nicméně s mnohem nižší vazebnou afinitou (D). IL-15R α může být odštěpena metaloproteinázami a po interakci s IL-15 se může chovat jako tzv. antagonist a blokovat signalizaci (E). Vytvořeno dle Burkett et al., 2004; Giri et al., 1994; Kim et al., 1998; Mortier et al., 2004; Perdreau et al., 2010.

Solubilní IL-15 má krátký poločas života (Bergamaschi et al., 2009, 2008; Berger et al., 2009; Stoklasek et al., 2006), zatímco jeho vazbou na IL-15R α dochází ke stabilizaci a tedy i k prodloužení poločasu života IL-15 (Eparaud et al., 2008). Nicméně podle Berger et al. (2019) je i přesto pro využití v imunoterapii nádorů vhodnější solubilní IL-15 v porovnání s IL-15 vázaným v komplexu. Berger et al. připravili nádorové buňky produkující buď solubilní IL-15 anebo komplex IL-15/IL-15R α za účelem stanovení potenciálu IL-15 v léčbě leukémie. Zatímco vyprodukovaný komplex IL-15/IL-15R α v myším modelu leukémie ovlivnil aktivaci a produkci převážně NK buněk, vyprodukovaný solubilní IL-15 způsobil aktivaci nejenom CD8 a CD4 T-lymfocytů, ale i dlouhotrvající imunitu a delší přežívání myši trpících leukémií (Berger et al., 2019). Množství NK buněk aktivovaných solubilním IL-15 bylo v porovnání s aktivovanými T-lymfocyty minimální, protože pravděpodobně nedošlo k trans-prezentaci, která je zřejmě hlavním mechanismem pro expanzi a aktivaci NK buněk.

Autoři navíc uvádějí, že výsledkem působení obou forem IL-15 byla produkce rozdílných cytokinů, a to konkrétně MIG, IP-10, G-CSF, MCP-1 a IFN- γ .

Signalizační dráha pro IL-15 probíhá tak, že po navázání IL-15 na receptor proběhne konformační změna, jež způsobí fosforylaci a aktivaci Janusovy kinázy (JAK), konkrétně JAK1/3 (Johnston et al., 1995). Tyto důležité tyrozinové kinázy následně způsobí fosforylaci STAT proteinů (z angl. signal transducer and activator of transcription), které fungují převážně jako transkripční faktory či přenašeče signálů do dalších drah. Fosforylované STAT3/5 proteiny vytvoří dimery a proběhne jejich translokace do jádra, kde iniciují expresi příslušných genů (Imada a Leonard, 2000; Johnston et al., 1995). Výsledkem tedy může být aktivace NK buněk či T-lymfocytů. Aktivace JAK/STAT signální dráhy také ovlivní další signální dráhy, kterými jsou například PI3K/Akt/mTOR nebo RAS/RAF/MAPK dráha (Gu et al., 2000; Marçais et al., 2014). Ty následně způsobí indukci Bcl-2 a c-Myc, fosforylace Lck a Syk kináz a aktivaci NF- κ B transkripčního faktoru (Carson et al., 1997; McDonald et al., 1998; Miyazaki et al., 1995).

2.3 Další vlastnosti IL-15

Hlavním cílem IL-15 v terapii nádorů je aktivovat buňky imunitního systému. Nejenže indukuje proliferaci NK a T-buněk (Marks-Konczalik et al., 2000; Zhang et al., 1998), ale například i LAK buněk. Tyto buňky podobné NK buňkám mají schopnost eliminovat nádorové buňky (Burton et al., 1994). Dalším příkladem jsou dendritické buňky. IL-15 je možné použít pro aktivaci DC u nádorů (Anguille et al., 2013) a makrofágů (Ohteki et al., 1997). Střevní intraepiteliální lymfocyty brání vstupu různých patogenů do organismu a jsou rovněž aktivovány IL-15. IL-15 je navíc produkován i různými tkáněmi, jako jsou ledviny, játra, srdce, placenta, fibroblasty, epiteliální buňky a monocyty (Ohteki et al., 1997).

IL-15 také funguje jako kostimulační faktor IL-12 a usnadňuje produkci IFN- γ , TNF- α (Carson et al., 1994), oxidu dusnatého a zvýšenou regulaci MHC glykoproteinů II. třídy a CD40 (Ohteki et al., 1997). IFN- γ , který je rovněž produkován NK a T-buňkami (Trinchieri a Perussia, 1985), je aktivačním faktorem monocytů pro prakticky všechny antimikrobiální a antiparazitické aktivity (James a Nacy, 1993). Také funguje jako dohled nad nádory (Lieberman a Hunter, 2002; Shankaran et al., 2001).

IL-15 rovněž reguluje produkci CD8 T-lymfocytů (Burkett et al., 2003; Schluns et al., 2002) a vede k homeostatické proliferaci s cílem udržet paměťové buňky po dostatečně dlouhou dobu (Becker et al., 2002). Bulfone-Paus et al. prokázali, že IL-15 zabraňuje apoptóze (Bulfone-Paus et al., 1997). Na základě pokusů se *S. choleraesuis* Nishimura et al.

zjistili, že IL-15 má protektivní účinky v mikrobiálních infekcích (Nishimura et al., 2000).

Na druhou stranu, přes velmi širokou škálu pozitivních vlastností, má IL-15 svá vlastní omezení a nevýhody. Jedním z hlavních problémů IL-15 je jeho nízká stabilita v případě přidání samotného IL-15 do organismu a již zmíněný krátký poločas života (Bergamaschi et al., 2009, 2008; Berger et al., 2009; Stoklasek et al., 2006). Ten se odhaduje na pouhých 50 min (Bergamaschi et al., 2009). Tato doba zdá se být nedostatečná pro účinnou aktivaci imunitních reakcí. Nicméně pokud dojde k navýšení množství solubilního IL-15 v organismu kvůli prodloužení jeho poločasu, IL-15 se může stát toxickým (Berger et al., 2009; Waldmann et al., 2011). Další nevýhodou je tedy jeho přechodná toxicita. Kromě toho výsledným stavem spojeným s vysokým množstvím IL-15 mohou být nežádoucí vedlejší efekty jako jsou vyrážka, zažívací problémy, úbytek hmotnosti, neutropenie, anemie a lymfocytopenie nebo rozmazané vidění (Berger et al., 2009; Conlon et al., 2019). Zároveň IL-15 či jeho vyšší dávka může způsobit anebo zhoršit průběh různých onemocnění. Těmito onemocněními jsou roztroušená skleróza (Losy et al., 2002), celiakie (Mention et al., 2003), revmatoidní artritida či neurologická onemocnění (McInnes et al., 1997). Fehniger et al. navíc experimentálně prokázali vznik leukémie *in vivo* na myším modelu při dlouhodobé nadprodukci IL-15 (Fehniger et al., 2001). Všechny tyto faktory limitují jeho terapeutické využití v protinádorové terapii. Na druhou stranu existuje několik přístupů, které se snaží tyto limitující faktory eliminovat.

2.4 Možnosti zlepšení vlastností IL-15

V současné době existuje několik možností a přístupů, pomocí kterých je možné posílit účinek IL-15, prodloužit jeho poločas a zlepšit jeho stabilitu.

Jednou z možností, jak generovat protinádorovou imunitu, je vakcinace založená na produkci maturovaných DC buněk s přispěním IL-15. Působením IL-15 na DC buňky je možné připravit vysoce maturované a specifické DC (IL-15 DC), které mohou být využity například v léčbě nádorových onemocnění a které lépe ovlivňují okolní NK buňky a T-lymfocyty. Jednou z možností jejich přípravy je kultivace DC spolu s GM-CSF a IL-15 (Anguille et al., 2009). Bylo prokázáno, že tyto maturované DC ovlivnily zvýšení T-buněk a zlepšily jejich schopnost stimulovat produkci IFN- γ . To vše vedlo k lepším cytotoxickým efektům vůči akutním leukemickým buňkám (Van Acker et al., 2018). Van Acker et al. ale nezmiňují vliv na NK buňky.

Jiným způsobem přípravy IL-15 DC je pomocí elektroporace (Van den Bergh et al., 2015). IL-15 a IL-15R α mRNA elektroporovaná do DC buněk vedla k vysoké povrchové

expresi IL-15 s následnou trans-prezentací na okolní buňky. Nejenže došlo k aktivaci NK buněk a produkci IFN- γ , ale došlo také navíc k eliminaci nádorů vlivem NK/DC kultur.

Hong et al. (2016) vytvořili nanonosiče nesoucí komplex IL-15/IL-15R α , tyto nosiče byly následně inkubovány s DC. Tímto přístupem dosáhli Hong et al. vysoké exprese funkčního IL-15 na povrchu DC. IL-15 DC byly více aktivované v porovnání s normálními DC, a kromě delšího přežívání prokázaly i vyšší aktivitu (Hong et al., 2016). Tourkova et al. (2002) navíc vytvořili nanočástice pokryté avidinem a IL-15/IL-15R α , což vedlo k vyšší stimulaci CD8 T-lymfocytů. Nicméně nebyla pozorována produkce IFN- γ (Tourkova et al., 2002).

Zajímavým přístupem je rovněž podání IL-15 v kombinaci s anti-CD40 protilátkou (Zhang et al., 2009). Tato protilátka nejenomže stimuluje NK buňky (Turner et al., 2001), ale zároveň i zvyšuje expresi IL-15R α na povrchu DC a tudíž lepší trans-prezentaci a aktivaci NK a CD8 T-buněk. Kombinace těchto dvou molekul, testována na myším modelu *in vivo* na nádorech ledvin a melanomech, byla účinnější než v případě podání těchto dvou molekul jednotlivě (Zhang et al., 2009).

Araki et al. (2004) vytvořili plazmidový vektor obsahující IL-15, který byl vpraven přímo do buněk adenokarcinomu tlustého střeva. Tímto způsobem bylo dosaženo zvýšené produkce IL-15 přímo v nádorových buňkách, což vedlo ke specifické a dlouhotrvající CD8 T-buněčné imunitě (Araki et al., 2004).

Orengo et al. (2003) modifikovali lidskou buněčnou linii N592 malobuněčného karcinomu plic MHC glykoproteinů I. třídy, která produkovala IL-15. Výsledkem byla redukce růstu nádorů vlivem aktivace imunitních reakcí (Orengo et al., 2003).

Jiným zajímavým přístupem bylo vytvoření konstruktů vMyx-IL-15R α -tdTr (Tosic et al., 2014). Tento proteinový konstrukt je složen z králičího poxviru, IL-15R α a fluorescenčního reportérového proteinu odvozeného z proteinu rajčat. Autoři nejenže využili schopnosti králičího poxviru infikovat myši a lidské nádorové buňky, čímž dosáhli účinného průniku do nádorové tkáně, ale zároveň je tento proteinový konstrukt schopný stimulovat produkci plně funkčního komplexu IL-15/IL-15R α . To má za následek dramatické zvýšení NK buněk v nádorech a delší přežívání buněk, stejně jako aktivaci a expanzi T-lymfocytů (Tosic et al., 2014). Tento proteinový komplex byl testován *in vivo* na B16 buňkách myšího modelu a na RAG-1 deficientní myši. Co se týče samotného virového konstruktů, autoři se domnívají, že sám o sobě může přispět ke zvýšené imunitní odpovědi. Zároveň předpokládají, že IL-15R α , zejména v souvislosti s virovou infekcí, by měl poskytovat nezbytnou podporu imunitním buňkám při řízení jejich funkční protinádorové aktivity (Tosic et al., 2014).

Dalším často užívaným přístupem je příprava fúzního proteinu či proteinového celku skládajícího se IL-15/IL-15R α , často doplněného o další proteinovou či peptidovou složku, která posílí anebo zvýší celkové vlastnosti daného celku. Existuje několik typů těchto proteinů.

Jedním z těchto typů je samotný komplex IL-15/IL-15R α , který je stabilnější a má delší poločas života než solubilní IL-15 (Bergamaschi et al., 2008; Epardaud et al., 2008; Rubinstein et al., 2006). Takto stabilizovaný IL-15 je možné aplikovat přímo do organismu. Nicméně bylo pozorováno, že IL-15/IL-15R α může způsobit vedlejší nepříznivé efekty, jako je například úbytek váhy, poškození jater, hypotermie anebo dokonce smrt (Guo et al., 2015).

K IL-15/IL-15R α mohou být připojeny další části. Velmi často se využívají fragmenty různých protilátek, které zvyšují nejenom stabilitu, ale i bioaktivitu. Konkrétním příkladem je IL-15/IL-15R α spojený s lidským Fc fragmentem IgG1 (Dubois et al., 2008; Wu a Xu, 2010). Tento Fc fragment se využívá k prodloužení poločasu mnoha proteinů. Komplex IL-15/IL-15R α -Fc má vyšší bioaktivitu, expanzi a aktivaci CD8 T-lymfocytů a NK buněk a o dvě hodiny delší poločas života v porovnání se solubilním IL-15 (Dubois et al., 2008; Wu and Xu, 2010). Navíc byla prokázána i vyšší účinnost NK buněk.

Druhým příkladem je IL-15 fúzovaný s L19 fragmentem lidské protilátky, který se specificky váže do fibronektinové EBD domény asociované s nádory (Kaspar et al., 2007). L19-IL-15 prokázal protinádorový efekt na myších metastázích stejně jako velmi dobrý bezpečnostní profil. Navíc již po čtyřadvaceti hodinách po injikaci byl detekován v nádorových buňkách (Kaspar et al., 2007).

Třetím příkladem je PFC-1 konstrukt (Chen et al., 2015). Ten je tvořen IL-15 fúzovaným s IL-15R α , Fc fragmentem a RGD peptidem. Tento peptid obsahující Arg, Gly a Asp má vysokou vazebnou aktivitu pro zacílení vůči nádoru. PFC-1 konstrukt, úspěšně testovaný *in vivo* na B16F10 myší buněčné linii melanomu, prokázal účinnou expresi a silný protinádorový efekt se zvýšenou cytotoxickou T-buněčnou aktivitou a NK buňkami. Zároveň je tento komplex schopný mobilizovat více NK buněk a blokovat metastázování, to vše bez přechodné toxicity (Chen et al., 2015).

Čtvrtým příkladem je spojení IL-15 a sushi domény IL-15R α s dalším proteinem, konkrétně apolipoproteinem A-I (Ochoa et al., 2013). Tento trojitý fúzní protein složený z IL-15, IL-15R α sushi domény a apolipoproteinu A-I byl úspěšně testován *in vivo* na myších u nádorů plic a tlustého střeva. Navíc ovlivnil expanzi a aktivaci NK a CD8 T-lymfocytů. Nicméně i zde při podání dávky vyšší jak 2,5 μ g byly prokázány toxické účinky na organismus (Ochoa et al., 2013).

Dalším příkladem je IL-15R α sushi doména spojená s IL-15 přes disulfidické můstky pro zvýšení aktivity komplexu skrz trans-prezentaci, kde je celý komplex spojený s Fc podjednotkou IgG pro prodloužení poločasu života (Hu et al., 2018). Tento komplex, nazvaný P22339, způsobil významnou indukci NK, CD8 a CD4 T-lymfocytů, což vedlo k výrazné inhibici růstu nádoru. Tyto vlastnosti byly testovány *in vivo* na myším B16F10 modelu, krysách a opicích, kde bylo zjištěno, že u krys došlo k prodloužení poločasu P22339 na 13,7 hodin při aplikaci 188 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a u opic o více než osm hodin při aplikaci 45 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Hu et al., 2018).

Jiným příkladem je fúzní protein receptor-linker-IL-15 (RLI), tedy IL-15 spojen s N-koncem IL-15R α sushi domény skrz 20 aminokyselin dlouhý linker (Bessard et al., 2009; Mortier et al., 2006). Tento RLI je až 500-krát biologicky účinnější než samotný IL-15, poločas života jsou až tři hodiny a prokázal až 50% redukci v růstu nádoru. U testovaných zvířat navíc byla vyvinuta pouze rakovina raného stádia (Bessard et al., 2009). V tomto stádiu se nádor typicky ještě nerozrostl hluboko do okolních tkání a rovněž není pozorováno šíření do lymfatických uzlin či jiných částí těla (“Stages of Cancer,” 2010). RLI byl nicméně testován pouze u nádoru plic a tlustého střeva.

Kermer et al. (2012) vytvořili fúzní protein scFv_RD_IL-15 složený z rozšířené IL-15R α sushi domény (RD), IL-15 a scFv36 protilátkou lokalizovanou na N-konci RD. Ta je namířená přímo proti stromálním buňkám nádoru FAP, čímž by měl být umožněn dokonalý průnik do nádorové tkáně. IL-15 a rozšířená RD o protilátkovou část napodobuje trans-prezentaci v místě nádoru, čímž byl zvýšen stimulační, a tedy i protinádorový účinek IL-15. Tento scFv_RD_IL-15 protein dosáhl ve své cílové formě nejenom silnější proliferace a cytotoxicity NK, ale i CD8 T-buněk. *In vivo* analýza na myším modelu plicního nádoru odhalila vynikající protinádorový účinek bez jakýchkoliv známek toxicity (Kermer et al., 2012).

Dalším příkladem je dsNKG2D-IL-15 složený ze dvou lidských NKG2D domén fúzovanými přes N-konec lidského IL-15 (Chen et al., 2017). NKG2D, který rozeznává ligandy produkované nádorovými buňkami, je transmembránový proteinový receptor vyskytující se na povrchu NK buněk a T-lymfocytů a je schopný jejich aktivace. Tento proteinový komplex se úspěšně vázal na nádory díky NKG2D doménám a efektivně stimuloval NK buňky trans-prezentací. Navíc také omezil růst B16-MICA nádorových buněk a aktivoval také CD8 T-buňky. *In vitro* byla pozorována účinnější aktivace NK buněk než v případě samotného IL-15, *in vivo* na myším modelu byla pozorována účinná inhibice nádoru. Kromě toho u myšího modelu nebyla prokázána žádná toxicita či zánětlivé poškození

způsobené dsNKG2D-IL-15 (Chen et al., 2017).

Posledním a jedním z nejslibnějších příkladů je fúzní protein ALT-803 (Han et al., 2011; Kim et al., 2016; Mathios et al., 2016; Wong et al., 2011; Xu et al., 2013). Pod tímto označením se skrývá superagonistický komplex IL-15/IL-15R α -sushi-Fc s modifikovaným IL-15. Ten obsahuje bodovou modifikaci asparaginu za kyselinu asparagovou v pozici 72, která mimo jiné způsobuje vyšší afinitu komplexu k receptorovým podjednotkám, čímž zlepšuje vazbu a poločas života. Ten může být až pětadvacet hodin (Xu et al., 2013). Navíc je zde až pětkrát vyšší biologická aktivita IL-15 a významný nárůst vysoce efektivních NK a T-lymfocytů, stejně jako paměťových buněk a IFN- γ (Han et al., 2011; Xu et al., 2013). Kromě toho tento komplex způsobil eliminaci nádorů *in vivo* na myším modelu (C57BL/6) během relativně krátké doby. Mathios et al. (2016) navíc prokázali trvalý protinádorový efekt. V současné době probíhá několik klinických studií. K datu sepsání této práce bylo na stránkách clinicaltrials.gov (“Home - ClinicalTrials.gov,”) registrováno celkem devatenáct klinických studií, z nichž sedm bylo v první fázi testů a jedenáct ve druhé fázi testů. Nejčastěji byly studie prováděny u osob s nádory plic (NCT02523469), vaječníků (NCT03054909) či nádory hlavy a krku (NCT01946789). Romee et al. (2018) ve své studii prokázali, že ALT-803 podporuje expanzi a aktivaci NK a CD8 T-buněk *in vivo*, nicméně NK buněk ve větší míře. Přestože při injekci mělo několik osob vyrážku v místě vpichu a trpělo horečkou či zimnicí, ALT-803 vykazoval dobrý bezpečnostní profil (Romee et al., 2018). Podobný bezpečnostní status byl prokázán i v další studii (Wrangle et al., 2018).

Postupný vývoj a vylepšování proteinových celků lze tedy shrnout následovně: pro zvýšení poločasu života solubilního IL-15 a pro získání vyšší bioaktivity byl IL-15 spojen se svou IL-15R α podjednotkou. V důsledku tohoto spojení došlo také k expanzi a aktivaci NK buněk a T-lymfocytů. Z důvodu dalšího zvýšení bioaktivity došlo k navázání Fc fragmentu protilátek za vzniku IL-15/IL-15R α -Fc. Po zjištění vazebných vlastností sushi domény byla IL-15R α podjednotka nahrazena touto sushi doménou, čímž došlo k dalšímu zvýšení vazebné afinity. Z uvedeného vyplývá, že IL-15R α není nutný pro signalizaci směrem k NK buňkám, ale je nutný pouze pro trans-prezentaci IL-15. S cílem dosáhnout maximální bioaktivity, expanze a aktivace buněk byla IL-15/IL-15R α -sushi-Fc připojena na další proteinové/peptidové části (např. RLI). V současné době jsou zkoumány možnosti připojení IL-15/IL-15R α -sushi-Fc k proteinovým či peptidovým částem, které umožňují úspěšný průnik do nádorové tkáně.

Z těchto důvodů byl v rámci mé diplomové práce použit přístup využívající virové nanostruktury (VNS) pro zvýšení bioaktivity IL-15. Konkrétně se jednalo o fúzní spojení

IL-15 s hlavním kapsidovým proteinem VP1 myšího polyomaviru (MPyV). Předpokládáme, že vazba IL-15 na majoritní kapsidový protein VP1 MPyV přispěje ke zvýšení stability a prodloužení poločasu života IL-15 a umožní aktivaci a proliferaci příslušných buněk. Hlavní kapsidový protein MPyV a od něj odvozené virům podobné částice (VLPs, z angl. virus-like particles) jsou schopné interakce s velkým množstvím různých buněk a tkání, a zajistit tak prezentaci IL-15 na povrchu buněk. Pro případné využití v imunoterapii nádorů existuje možnost VP1 geneticky modifikovat tak, aby VP1 nanostruktury přednostně interagovaly s nádorovými receptory.

2.5 Myší polyomavirus

Myší polyomavirus (MPyV) je přibližně 45 nm velký neobalený virus z čeledi *Polyomaviridae*, který byl poprvé objeven v roce 1953 (Gross, 1953). Je schopný u čerstvě narozených myší způsobit různé typy nádorů, za které jsou zodpovědné virové onkoproteiny, tzv. T-antigeny. Kapsidu viru tvoří hlavní kapsidový protein VP1 a minoritní kapsidové proteiny VP2 a VP3. Genom MPyV, tvořený dvojřetězcovou DNA, lze funkčně i strukturně rozdělit do tří oblastí: regulační oblast odděluje část kódující geny exprimované v časně fázi infekce a plnicí regulační funkci, a část kódující kapsidové proteiny přepisované v pozdní fázi cyklu. Přestože je MPyV relativně dobře popsán, všechny detaily týkající se jeho životního cyklu nejsou zcela objasněny.

2.6 Životní cyklus MPyV

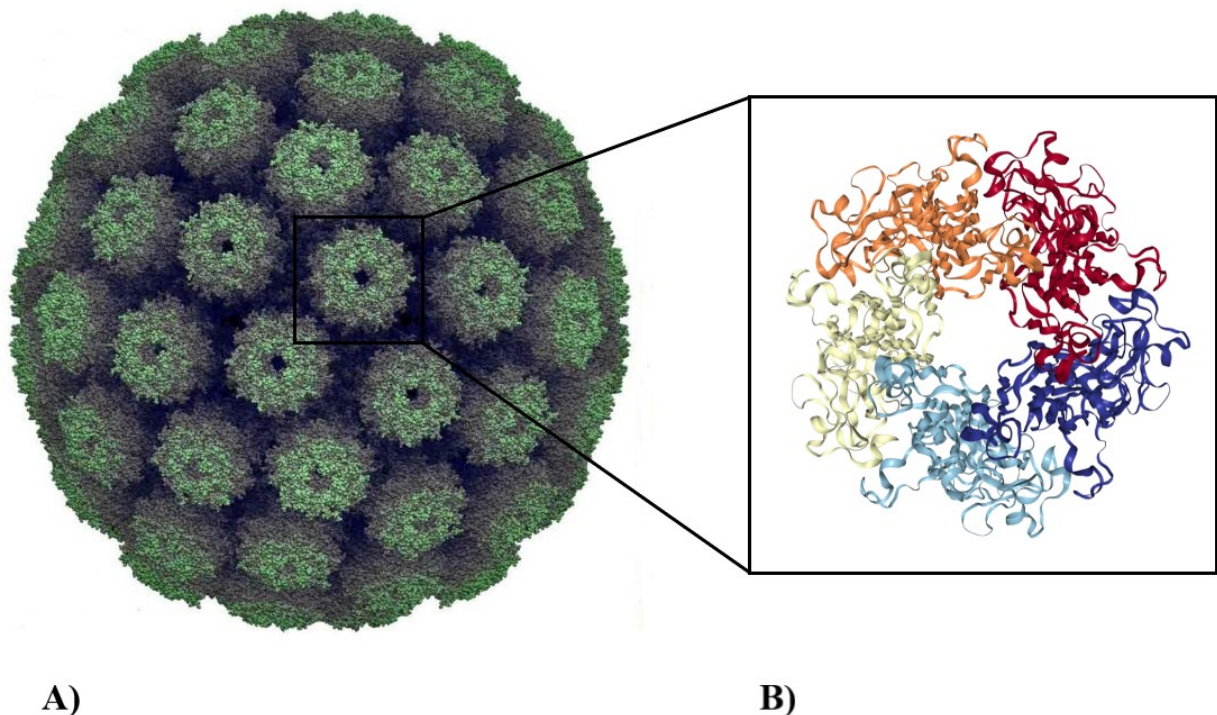
Po přichycení viru pomocí VP1 na gangliosidové receptory na povrch hostitelské buňky (Bolen et al., 1981; Tsai et al., 2003) a následné endocytózy ve váčcích často obsahujících caveolin, je MPyV lokalizován přes časný endozóm do endoplazmatického retikula a odtud po translokaci do cytosolu dále do jádra s aktivním využitím systémového transportu po cytoskeletu (Döhner a Sodeik, 2005). Po vstupu polyomavirového nukleocore do jádra dochází k transkripci časných genů buněčnou RNA polymerázou II a následné translaci za vzniku T-antigenů. Ty jsou zodpovědné nejenom za správný průběh a regulaci replikace, ale i za již zmíněnou tumorogenezi (Hyde-DeRuyscher a Carmichael, 1988; Liu a Carmichael, 1993; Schüchner a Wintersberger, 1999). Dostatečné množství T-antigenů iniciuje replikaci viru (Liu a Carmichael, 1993), po které následuje transkripce pozdních genů. Po translaci v cytoplazmě putují kapsidové proteiny do jádra, protože morfogeneze virových částic probíhá v jádře infikované buňky (Moreland et al., 1991). Virový minichromosom tvořený buněčnými histony a nově syntetizovanou dsDNA je uzavřený do vznikající virové kapsidy. Po lýzy hostitelské buňky se nahromaděné viriony dostávají ven (DeCaprio et al., 2013).

2.7 Virová kapsida a VP1 protein

Strukturní proteiny VP1, VP2 a VP3 tvoří virovou kapsidu MPyV. Ta má ikosaedrální uspořádání s triangulační symetrií mřížky T=7 (Rayment et al., 1982), tedy vysoce pravidelné uspořádání. Při tvorbě virové kapsidy mají majoritní roli VP1 proteiny, kterých je zde celkem 360 molekul. Ty jsou uspořádány do 72 pentamerů VP1, které tvoří vlastní virovou kapsidu (obr. 2, str. 16; Rayment et al., 1982). Obvykle každý pentamer obsahuje jeden minoritní protein VP2 nebo VP3. VP1 proteiny jsou schopné samsopřádání

do kapsid bez přítomnosti minoritních proteinů. Ke stabilitě kapsidy přispívají vápenaté ionty (Brady et al., 1977) a disulfidické můstky mezi cysteiny jednotlivých VP1 proteinů (Liddington et al., 1991).

Hlavní strukturální protein VP1, dlouhý 384 aminokyselin, lze formálně rozdělit do tří částí. Centrální část VP1 je tvořena α -helixy a β -listy, zatímco N-koncová část orientovaná dovnitř kapsidy obsahuje jaderný lokalizační signál a DNA vazebnou doménu (Chang et al., 1993). C-koncová část, která vyniká svojí flexibilitou, umožňuje interakci s dalšími VP1 monomery.



Obr. 2 – Struktura kapsidy virové částice MPyV. Virová kapsida MPyV (A), která je téměř identická s VLPs MPyV. Kapsida je tvořena z pentamerů VP1 proteinu (B). Převzato a upraveno dle Stehle a Harrison, 1996.

2.8 Polyomavirové VLPs

VLPs jsou obvykle tvarem i velikostí podobné klasickým virovým částicím s tím rozdílem, že VLPs jsou zbaveny své virové genetické informace a nejsou tedy schopné se replikovat v hostitelských buňkách. Polyomavirové VLPs mohou vstupovat do buněk různých tkání (Richterová et al., 2001) stejným způsobem jako infekční virové částice.

Polyomavirové VLPs mohou nabývat různých tvarů a velikostí. Bylo prokázáno, že kromě ikosahedrálních částic složených ze 360 molekul, může VP1 protein tvořit různé tubulární sestavy či kapsidy menších tvarů (Baker et al., 1983; Mattern et al., 1967). Byly objeveny nejenom 32nm částice složené ze 120 molekul VP1, ale i 26nm částice s T=1

symetrií složené z 60 molekul VP1 (Mattern et al., 1967; Salunke et al., 1989). VP1 protein je schopen uspořádat se do kapsid nezávisle na ostatních proteinech nebo DNA (Montross et al., 1991). VLPs mohou tedy obsahovat i minoritní VP2 a VP3 proteiny, nicméně jejich přítomnost zde není nutná (An et al., 1999). Uspořádání částic lze docílit i v podmínkách *in vitro* a závisí na pH, iontové síle a množství vápenatých iontů (Salunke et al., 1989).

Přestože existence prázdných virových kapsid byla objevena při izolacích viru (Aposhian et al., 1975), VLPs bývají nejčastěji produkovány v různých expresních systémech. Zde dochází k produkci velkého množství částic, která je z ekonomického hlediska velmi výhodná. Příkladem mohou být savčí, kvasinkové, bakteriální anebo bakulovirové expresní systémy. V této diplomové práci jsme využili bakulovirový expresní systém, protože nám umožní vysoký výtěžek proteinů v relativně čistém stavu (Li et al., 2003). Tento výtěžek, v přepočtu na vstupní materiál obsahující cca 3×10^7 buněk, může dosahovat až několika miligramů proteinů VLPs MPyV produkovaných v SF9 bakulovirovém expresním systému (Suchanová et al., 2015).

VLPs jsou imunogenní a kromě stimulace maturace DC buněk a indukce kostimulačních molekul mohou indukovat i neutralizující protilátky (Buonaguro et al., 2002; Herbst-Kralovetz et al., 2010; Kang et al., 2009). Navíc po interakci VLPs s lidskými dendritickými buňkami byla pozorována expanze a stimulace cytotoxických T-lymfocytů (Gedvilaite et al., 2006).

2.9 Využití VLPs

Polyomavirové VLPs lze využít pro různé diagnostické či terapeutické účely. Byly využity pro přenos cizorodé genetické informace, přenos proteinů či antigenů pro stimulaci imunitního systému (Suchanová et al., 2015). Přpravovaný materiál může být buď zabalen dovnitř částice, anebo může být ukotven na jejím povrchu.

Pro přenos cizorodé genetické informace nejčastěji dochází k jejímu zabalení do virové kapsidy. Takto přepravovaná genetická informace je lépe chráněna před degradací, a navíc může dojít k jejímu lepšímu doručení na určité místo. Konkrétním případem může být přenos sebevražedných genů pomocí JCPyV pseudočástic (Chao et al., 2018). Autoři vytvořili VLPs odvozené od JCPyV, který je schopný infikovat gliové buňky, za účelem přepravy s následným využitím sebevražedných genů thymidinkinázy proti nádorovým onemocněním mozku. Bylo prokázáno, že tyto VLPs byly schopné ochránit a dopravit sebevražedné geny do cílových lidských gliových buněk U-87 MG implantovaných do myšího modelu, navíc bylo zabráněno dalšímu růstu nádoru (Chao et al., 2018).

Polyomavirové VLPs jsou často také využívány jako nosiče antigenů pro stimulaci tvorby protilátek. Fraiberk et al. upravili MPyV VLPs jako vakcínu proti prasečímu cirkoviru (Fraiberk et al., 2017). Autoři vytvořili a charakterizovali několik polyomavirových struktur, kde byly kapsidové proteiny MPyV fúzované s kapsidovými proteiny prasečího cirkoviru nebo jeho epitopy. Jiným příkladem mohou být polyomavirové chimérické VLPs, které na svém povrchu měly ukotvený HBsAg antigen (Pleckaityte et al., 2015). Vzniklé částice stimulovaly tvorbu neutralizačních protilátek proti HBV.

Tegerstedt et al. vytvořili myší polyomavirové VLPs složené z kapsidového VP1 proteinu a fúzovaného VP2 s Her2 doménou (Tegerstedt et al., 2005). Ta patří mezi nádorové antigeny, tzv. antigeny asociované s nádory. Vytvořený proteinový konstrukt zamezil růstu nádoru u myši a způsobil i expanzi a produkci T-buněk. I jiné studie prokázaly, že VLPs nesoucí nádorové antigeny fúzované s kapsidovými proteiny úspěšně zabránily růstu nádorů v různých myších modelech (Greenstone et al., 1998; Schäfer et al., 1999; Tegerstedt et al., 2005).

Dalším příkladem je využití MPyV VLPs jako nosiče prostatického specifického antigenu (PSA) využitého v imunoterapii myšího modelového systému (Eriksson et al., 2011). PSA je serinová proteáza produkovaná epitelovými buňkami prostaty, která může zároveň sloužit jako marker pro diagnostiku karcinomu prostaty. Autoři zkoumali možnost použití těchto VLPs složených z VP1 proteinů a PSA, který byl spojený alaninovým linkerem na C-konci s VP2/VP3, v experimentálním modelu k imunizaci myši a jejich ochraně před růstem nádoru. Vzniklý konstrukt byl schopen pozitivně ovlivnit produkci CD8 a CD4 T-buněk, také bylo zamezeno dalšímu růstu nádorů (Eriksson et al., 2011).

Využití VLPs není specifické pouze pro polyomaviry, ale jsou typické i pro jiné skupiny virů. Velmi zajímavé je využití VLPs odvozených od papilomavirů. Historicky byly polyomaviry a papilomaviry řazeny do čeledi papovavirů kvůli podobnosti jejich strukturních a genomových vlastností. Majoritní kapsidový protein papilomavirů se nazývá L1 a minoritní L2. Experimentálně jsou L1 a L2 využívány pro fúze s jinými proteiny podobně jako VP1 anebo VP2 a VP3. Konkrétním příkladem je vytvoření fúzního L1 nebo L2 proteinu spojeného přes C-konec s regulačním E7 proteinem (Greenstone et al., 1998; Müller et al., 1997; Schäfer et al., 1999), tyto VLPs mohou indukovat neutralizační protilátky a cytotoxické T-buňky v mnohem vyšší míře než pseudočástice tvořené samotnými strukturními proteiny a zamezit vzniku nádorů. E7 je virový regulační protein, jehož hlavním cílem je deregulace buněčného cyklu inaktivací a vyvázáním tumor supresorového pRb proteinu, který kontroluje přechod z G1 do S fáze. VLPs připravené Greenstone et al. obsahovaly L1 i L2 proteiny, které

byly odvozené buď od lidského papilomaviru 16 nebo bovinního papilomaviru typu 1, kde L2 byl právě spojen s E7 proteinem. Tyto VLPs byly plně funkční a došlo k úspěšné indukci protinádorové imunity (Greenstone et al., 1998).

Jiným příkladem jsou VLPs, které byly připraveny spojením L1 proteinu zkráceného o svůj C-konec s E7 proteinem. Schäfer et al. (1999) prokázali, že takto připravené proteiny nejenže byly schopné se sestavit do VLPs, ale byly také schopné indukovat cytotoxické T-buňky. Autoři dané částice testovali na C57B1/6 myších, kde byla pozorována aktivace neutralizující protilátek stejně jako protinádorová ochrana. Obdobné výsledky u stejného konstruktů má i Müller et al. (1997). L1 protein, u kterého byl také C-konec nahrazen za E7 protein, byl schopný vytvořit virovou kapsidu, a tedy i VLPs s vyšší účinností než samotný přirozený (wt) virus. Chimérické VLPs byly schopné se navázat a penetrovat do buněk, i zde byla pozorována schopnost vyvolat neutralizační protilátky.

2.10 VLPs a IL-15

Dlouholeté zkušenosti s produkcí a úpravami MPyV VLPs v naší laboratoři (Váňová et al., 2020; Žáčková Suchanová, 2018; Zackova Suchanova et al., 2017) vedly k zadání této diplomové práce, která si klade za cíl ověřit schopnost VP1 nanostruktur stabilizovat IL-15 pro účinnou stimulaci protinádorové aktivity NK buněk.

Pro přípravu nanostruktur složených z kapsidového proteinu VP1 fúzovaného s IL-15 jsme se rozhodli z následujících důvodů: (i) vlastnosti a výhody IL-15 v protinádorové léčbě byly již popsány (viz kapitola 2, str. 3), (ii) pentamerní struktury VP1 jsou vysoce stabilní, mají jasně dané strukturní uspořádání a nepředpokládáme tedy, že by konstrukty s navázaným IL-15 nevznikaly, (iii) schopnost interakce VP1 s vysokým počtem různých buněk a tkání, které na svém povrchu mají kyselinu sialovou – receptor pro MPyV (Fried et al., 1981) – by měla zajistit prezentaci IL-15 a to v ideálním případě i na povrchu nádorových buněk.

Na základě předchozích zkušeností (Fraiberk et al., 2017) nepředpokládáme vznik plnohodnotných VLPs nesoucích IL-15, ale pouze pentamerních struktur, neboť volná C-terminální část VP1 (cca 60 aminokyselin) je nutná pro vzájemnou interakci pentamerů v rámci kapsidy (Stehle et al., 1996). Vznik chimérických VLPs byl popsán pouze po připojení krátkých peptidů (např. imunodominantních CD8 T-buněčných epitopů odvozených od ovalbuminu) na C-koncovou část VP1 (Bickert et al., 2007). VP1 zkrácený o 35 aminokyselin z C-konce je stále schopen tvořit částice, často však nezvyklého tvaru (tzv. tic-tac; Hrušková, nepublikované výsledky) a zkrácení VP1 proteinu o 60 aminokyselin zamezí vzniku VLPs a zajistí vznik pouze pentamerních struktur (Fraiberk et al., 2017).

3 Cíle práce

Na základě hypotézy, že IL-15 navázaný na virovém nosiči bude mít příznivý dopad na stimulaci protinádorové aktivity NK a T-buněk, je hlavním cílem mé diplomové práce vytvořit pomocí bakulovirového expresního systému VP1 nanostruktury s IL-15 a ověřit jejich stabilitu, biologickou aktivitu a schopnost indukovat proliferaci buněk citlivých k IL-15. Dlouhodobým cílem projektu, kterého je tato práce součástí, je vytvoření účinného nástroje založeného na polyomavirových strukturách pro stimulaci protinádorové imunitní odpovědi.

Pro plnění tohoto cíle byly stanoveny dílčí kroky:

- z rekombinantního plazmidu obsahujícího VP1 a IL-15 geny vytvořit několik variant vektorů pro konstrukci rekombinantních bakulovirů;
- pomocí bakulovirového expresního systému vyprodukovat kontrolní VP1 nanostruktury tvořené plnodélkovým VP1 s histidinovou kotvou nebo o 60 aminokyselin zkrácenou variantu VP1 (VP1 Δ C) s/bez histidinové kotvy, kontrolní IL-15 (s histidinovou kotvou) a dvě varianty fúzního proteinu s histidinovou kotvou: plnodélkového VP1 s IL-15 a VP1 Δ C s IL-15;
- charakterizovat všechny vytvořené konstrukty pomocí biochemických metod a elektronové mikroskopie
- prozkoumat efekt virových nanostruktur nesoucích IL-15 na jeho schopnost indukovat proliferaci buněk citlivých k IL-15

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

4.1.1 Seznam chemikálií

Agaróza (Amresco, USA)
Akrylamid (Serva, Německo)
Bisakrylamid (Serva, Německo)
Bromfenolová modř (Lachema, ČR)
Chlorid cesný (Roth, Německo)
Chlorid draselný (Lachema, ČR)
Chlorid hořečnatý (Lachema, ČR)
Chlorid sodný (Lachner, ČR)
Chloroform (Lachema, ČR)
Coomassie Brilliant Blue-R250 (Fluka, Německo)
4',6-diamin-2-fenylindol fluorescenční barva (DAPI; Sigma, Německo)
Dihydrogenfosforečnan draselný (Lachema, ČR)
DNA Loading Dye pufr (Thermo Fisher Scientific, USA)
dNTP mix (Thermo Scientific, USA)
Deoxycholát sodný (Fluka, Německo)
DreamTaq pufr (Fermentas, USA)
Dodecylsíran sodný (SDS; Sigma, Německo)
Ethanol (Lachema, ČR)
Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA; Fluka, Německo)
Fenol (Lachema, ČR)
Glycin (Serva, Německo)
Glycerol (Lachema, ČR)
Glukóza (Serva, Německo)
HEPES (Sigma, Německo)
Hovězí sérový albumin (Roth, Německo)
Hydrogenfosforečnan sodný (Lachema, ČR)
Hydroxid sodný (Penta, ČR)
IPTG (Fermentas, USA)
Imidazol (Sigma, Německo)
ImperialTM Protein Stain (Thermo Scientific, USA)
Izoamylalkohol (Lachema, ČR)
Izopropanol (Lachema, ČR)
Kyselina chloristá (Lachema, ČR)
Kyselina chlorovodíková (Lachema, ČR)
Kyselina fosfowolframová (Fluka, Německo)
Kyselina octová (Lachema, ČR)
Kyselina p-kumarová (Sigma, Německo)
Luminol (Sigma, Německo)
Midori green advance DNA stain barva (Nippon Genetics co. Ltd, Německo)
 β -Merkaptoethanol (Bio Rad, Německo)
Methanol (Lachema, ČR)
NP-40 (Sigma, Německo)
Octan sodný (Penta, ČR)
Octan draselný (Penta, ČR)
Parafinový olej (Carl Roth, Německo)
Peroxid vodíku (Sigma, Německo)
Peroxodisíran amonný (APS; Sigma, Německo)
10x koncentrované pufrы pro restrikční štěpení (Fermentas, USA)
10x koncentrovaný ThermoPol[®] reakční pufr (BioLabs, USA)
Sacharóza (Lachner, ČR)

Seaplaque® agaróza (Bioproducts, USA)
Síran hořečnatý (Lachema, ČR)
Sušené mléko (Sigma, Německo)
Sypro® Ruby protein blot stain barva (Invitrogen, USA)
10x koncentrovaný T4 DNA ligační pufr (Fermentas, USA)
TE pufr (Qiagen, Německo)
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin (TEMED; Merck, USA)
Tris (Serva, Německo)
Triton X-100 (Sigma, Německo)
X-Gal (Thermo Scientific, USA)
Želatina (Sigma, Německo)
Živný agar (Biolife, Itálie)
Živný bujón (Biolife, Itálie)

4.1.2 Laboratorní přístroje

Analytické váhy Pioneertexttrademark (Ohaus, Švýcarsko)
Aparatura pro elektroforetickou separaci proteinů (BioRad, USA)
Aparatura pro gelovou elektroforézu DNA (Schoeller, ČR)
Aparatura pro Western blot (Bio-Rad, USA)
Abbého refraktometr (Carl Zeiss Jena, Německo)
Centrifuga Hettich Universal 320R, úhlový rotor 1620A (Hettich, Německo)
Centrifuga GS-15R, výkyvný rotor S4180 (Beckman Coulter, USA)
Centrifuga MiniSpin plus, statický rotor IL016 (Eppendorf, Německo)
Centrifuga MSE, výkyvný rotor (MSE, UK)
CO₂ termostat (Forma Scientific, USA)
Elektroporátor Gene Pulser Apparatus (Bio-Rad, USA)
Fluorescenční mikroskop Olympus BX60 (Olympus, Japonsko)
Fluorimetr Qubit (Invitrogen, USA)
Fusion FX přístroj pro vizualizaci gelů a membrán (Vilber, Německo)
Jímač frakcí (Beckman Coulter, USA)
Konfokální mikroskop TCS SP2 Laser Scanning (Leica, Německo)
Laboratorní váhy (Kern, ČR)
Laminární box (Forma Scientific, USA)
Magnetická míchačka IKA® Big Squid (IKA, Německo)
Mikroskop Leica Dmi1 (Leica, Německo)
Mikrovlákná trouba (Vestel, Turecko)
Minicentrifuga Microfuge R, statický rotor F241.5 (Beckman Coulter, USA)
PCR cyklér Mastercycler EPgradinet S (Eppendorf, Německo)
Ruční sonikátor (Hielscher, Německo)
Sonikátor QSonica q500 (QSonica, USA)
Spektrofotometr Epoch™ Microplate (BioTek, USA)
Spektrofotometr Helios β (Thermo Electron, USA)
Spektrofotometr Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, USA)
Transmisní elektronový mikroskop JEOL JEM 1200EX (Jeol, USA)
Termoblok BioTDB-100 (Biosan, UK)
Třepačka Duomax 1030 (Heidolph, Německo)
Ultracentrifuga Optima L-92K, výkyvné rotory SW28, SW41 a SW55 (Beckman Coulter, USA)
UV transluminátor (BioLum, USA)
Vodní lázeň (Grant, UK)
Vortex-Genie 2 přístroj pro míchání či třepání (Scientific Industries, USA)

4.1.3 Složení běžně užívaných roztoků

(Pokud není uvedeno jinak, jedná se o roztoky rozpuštěné v dH₂O)

30% akrylamid/bisakrylamid

- 1% (w/v) bisakrylamid (Serva, Německo)
- 29% (w/v) akrylamid (Serva, Německo)

0,5M EDTA-NaOH (pH = 8,0)

- 0,5M EDTA (Fluka, Německo)
- pH upraveno pomocí NaOH (Sigma, Německo)

Elektrodotový pufr pro SDS-PAGE (pH = 8,3)

- 250mM Tris (Serva, Německo)
- 1,92M glycin (Serva, Německo)
- 1% (w/v) SDS (Sigma, Německo)

Elektrodotový pufr pro Western blot (pH = 8,3)

- 25mM Tris (Serva, Německo)
- 195M glycin (Penta, ČR)
- 20% (v/v) methanol (Lachema, ČR)

Eluční pufr pro HisTrap FF izolaci proteinů (pH = 7,4)

- 500mM imidazol (Sigma, Německo)
- 500mM NaCl (Lachner, ČR)
- 50mM HEPES (Sigma, Německo)

Fixační roztok pro polyakrylamidové gely

- 5% (v/v) HClO₄ (Serva, Německo)
- 50% (v/v) methanol (Lachema, ČR)

5x koncentrovaný Laemmliho pufr

- 5% (w/v) SDS (Sigma, Německo)
- 50mM Tris-HCl (pH = 6,8)
- 50% (v/v) glycerol (Lachema, ČR)
- 25% (w/v) β-merkapt ethanol (BioRad, USA)
- 0,005% (w/v) bromfenolová modř (Sigma, Německo)

10x koncentrovaný pufr-B

- 10mM Tris-HCl (pH = 7,4)
- 150mM NaCl (Lachner, ČR)
- 0,01mM CaCl₂ (Sigma, Německo)

RIPA pufr

- 150mM NaCl (Lachner, ČR)
- 5mM EDTA-NaOH (pH = 7,4)
- 50mM Tris-HCl (pH = 7,4)
- 0,05% (v/v) NP-40 (Sigma, Německo)
- 1% (w/v) deoxycholát sodný (Fluka, Německo)
- 1% (v/v) Triton X-100 (Sigma, Německo)

Roztok I

- 15mM Tris-HCl (pH = 8,0)
- 10mM EDTA-NaOH (pH = 8,0)
- 100 g/mL RNáza A (Fermentas, USA)

Roztok II

- 1% (w/v) SDS (Sigma, Německo)
- 0,2N NaOH (Sigma, Německo)

Roztok III

- 5M octan draselný (Penta, ČR)
- 99% (v/v) kyselina octová (Lachema, ČR)

Solný roztok pufovaný fosfátem (PBS; pH = 7,4)

- 137mM NaCl (Lachner, ČR)
- 2,7mM KCl (Lachema, ČR)
- 10mM Na₂HPO₄ (Penta, ČR)
- 1,8mM KH₂PO₄ (Lachner, ČR)

TE pufr

- 25mM Tris-HCl (pH = 8,0)
- 10mM EDTA-NaOH (pH = 8,0)

10x koncentrovaný Tris-acetátový pufr (TAE)

- 40mM Tris-HCl (pH = 8,0)
- 20mM kyselina octová (Lachema, ČR)
- 1mM EDTA-NaOH (pH = 8,0)

1M Tris-HCl (pH = 8,0)

- 1M Tris (Serva, Německo)
- pH upraveno pomocí HCl (Lachema, ČR)

Vazebný pufr pro HisTrap FF izolaci proteinů (pH = 7,4)

- 40mM imidazol (Sigma, Německo)
- 500mM NaCl (Lachner, ČR)
- 100mM HEPES (Sigma, Německo)

4.1.4 Kultivační média

4.1.4.1 Bakteriální média

LB médium

- 1% (w/v) pepton (Biolife, Itálie)
- 0,5% (w/v) kvasinkový extrakt (Biolife, Itálie)
- 1% (w/v) NaCl (Lachner, ČR)
- příslušné antibiotikum

LB médium s agarem

- 1% (w/v) pepton (Biolife, Itálie)
- 0,5% (w/v) kvasinkový extrakt (Biolife, Itálie)
- 1% (w/v) NaCl (Lachner, ČR)
- 1,5% (w/v) agar (Biolife, Itálie)
- příslušné antibiotikum

SOC médium

- 2% (w/v) pepton (Biolife, Itálie)
- 0,5% (w/v) kvasinkový extrakt (Biolife, Itálie)
- 10 mM NaCl (Lachner, ČR)
- 2,5mM KCl (Lachema, ČR)
- 20mM glukóza (Serva, Německo)
- 10mM MgCl₂ (Lachema, ČR) – přidáno těsně před užitím
- 10mM MgSO₄ (Lachema, ČR) – přidáno těsně před užitím

TPN médium

- 2% (w/v) pepton (Biolife, Itálie)
- 0,5% (w/v) kvasinkový extrakt (Biolife, Itálie)
- 0,5% (w/v) NaCl (Lachner, ČR)

4.1.4.2 Kultivační média pro kultivace buněk

Bezsérové médium (BSM)

- TNM-FH hmyzí médium (#T1032; Sigma-Aldrich, Německo)

DPBS médium (#A1285801; Thermo Scientific, USA)

Kompletní médium (médium se sérem)

- TNM-FH hmyzí médium (#T1032; Sigma-Aldrich, Německo)
- 10% (v/v) fetální sérum z telete (FBS; #10500064; Sigma, Německo)

Kompletní RPMI médium (médium se sérem)

- RPMI-1640 médium (#11875135; Sigma-Aldrich, Německo)
- 10% (v/v) FBS (#10500064; Sigma, Německo)

Kompletní médium pro plakovou titraci

- 0,675 g SeaPlaque agarózy (Bioproducts, USA) v 15 mL dH₂O
- 25 mL TNM-FH hmyzího média (#T1032; Sigma-Aldrich, Německo)
- 4,5 mL 10% (v/v) FBS (#10500064; Sigma, Německo)
- 0,5 mL směsi antibiotik pro tkáňové kultury (viz kapitola 4.1.6)

Růstové suspenze pro růst CTLL-2 buněk

- Supernatant IL-2 – získaný od RNDr. Milady Schierové Ph.D.
- IL-15 – 100 µg/mL (#180-095-765; Miltenyi Biotech, USA)
- Supernatant Konkavalinu A – připravený kultivací myších slezinných buněk s konkavalinem A (1 µg/mL), získaný od prof. Vladimíra Holáně DrSc.

4.1.5 Protilátky

Primární protilátky:

MαHIS – myší monoklonální IgG protilátka proti His-tag (Invitrogen, USA), ředěna 1000x (#MA1-21315)

MαIL-15 – myší monoklonální IgG protilátka proti lidskému IL-15 (R&D systems, USA), ředěna 500x (#MAB2471-100)

MαVP1 – myší monoklonální IgG protilátka proti denaturovanému VP1 proteinu MPyV (Forstová et al., 1993), ředěna 50x

MαVP1-D4 – myší monoklonální IgG protilátka proti VP1 proteinu MPyV (připraveno v rámci laboratoře virologie RNDr. Alenou Drda Morávkovou, Ph.D.), ředěna 20x

RβαVP1 SV40 – králičí polyklonální protilátka proti VP1 SV40 (Abcam, UK), ředěna 1000x (#ab53977)

Sekundární protilátky:

DαM-Ax488 – oslí protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s fluorescenční barvou Alexa Fluor 488 (Thermo Scientific, USA), ředěna 1000x (#A-21202)

GαM-Px – kozí protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou (BioRad, USA), ředěna 1000x (#0300-0108P)

GαRb-Px – kozí protilátka proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou (BioRad, USA), ředěna 1000x (#5196-2504)

4.1.6 Antibiotika

Ampicilin (Biotika, ČR)

Gentamycin (Sigma, Německo)

Kanamycin (Sigma, Německo)

Tetracyklin (Sigma, Německo)

Streptomycin (Sigma, Německo)

Směs antibiotik pro tkáňové kultury:

100x koncentrovaný roztok obsahující 25 mg amphotericinu B, 10000 jednotek ampicilinu a 10 mg streptomycinu na 1 mL (Gibco, Thermo Fisher Scientific)

4.1.7 Enzymy

Benzonáza® (Sigma, Německo)

DNáza I (Sigma, Německo)

DreamTaq DNA polymeráza (Thermo Scientific, USA)

Inhibitory proteáz (cOmplete™ ULTRA Tablets; Roche Švýcarsko)

Restrikční enzymy (*AgeI*, *BamHI*, *EheI*, *HindIII*, *NheI*, *NruI*; Fermentas, USA)

RNáza A (Fermentas, USA)

T4 DNA ligáza (Thermo Scientific, USA)

Vent® DNA polymeráza (Fermentas, USA)

4.1.8 Buněčné kultury a virová inokula

Bakteriální buňky:

- DH10Bac elektrokompetentní buňky – kmen *E. coli*
- TOP10 elektrokompetentní buňky – kmen *E. coli*

Eukaryotické buněčné linie:

- SF9 hmyzí buněčná linie – pochází z vaječnicků motýlů *Spodoptera frugiperda*
– využity pro bakulovirovou infekci
- Jurkat buněčná linie – lidské leukemické T-lymfocyty rostoucí v suspenzi odvozené z buněk periferní krve pacienta (*Homo sapiens*) s akutní T-buněčnou leukémií
- CTLL-2 buněčná linie – myši cytotoxické CD8 T-lymfocyty (kmen C57BL/6) získané od prof. Vladimíra Holáně, DrSc.

Viry:

- MPyV VP1 expresní rekombinantní bakulovirus (BG kmen, GeneBank: AF442959), připraven v rámci laboratoře RNDr. Jiřinou Žáčkovou Suchanovou, Ph.D.

4.1.9 Komerční soupravy

AllPrep® DNA/RNA/Protein Mini Kit (Qiagen, Německo)

- Souprava využita pro izolaci celkové genomové DNA z SF9 buněk

Cellfectin® II Reagent (Invitrogen, USA)

- Souprava využita pro transfekci SF9 buněk

CellTiter 96® AQUEOUS One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, USA)

- Souprava využita pro stanovení proliferační aktivity vzorků

GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, Německo)

- Souprava využita pro izolace plazmidové DNA z bakteriálních buněk

HisTrap FF crude columns souprava (GE Healthcare Life Sciences)

- Souprava využita jako alternativní metoda pro izolace proteinů, které obsahují histidinovou kotvu

JETSTAR Plasmid Purification Maxi Kit (Qiagen, Německo)

- Souprava využita pro izolace plazmidové DNA z bakteriálních buněk

NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel, Německo)

- Souprava využita pro extrakci DNA fragmentů z agarózového gelu

QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen, Německo)

- Souprava využita pro izolaci DNA z bakteriálních buněk

Qubit® Protein Assay Kit (Invitrogen, USA)

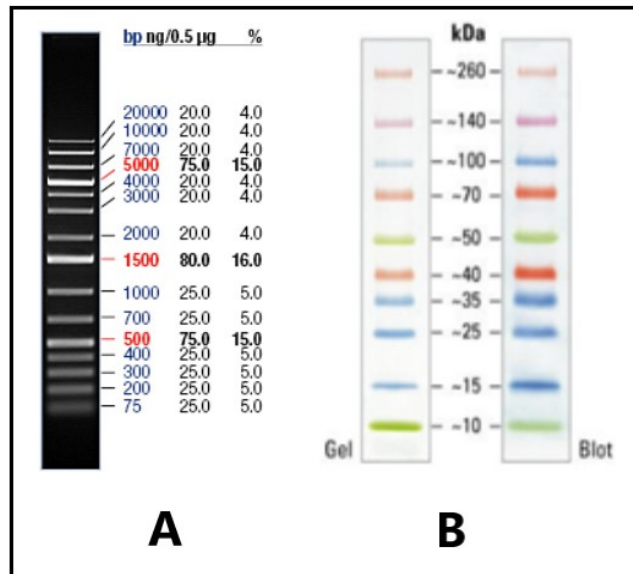
- Souprava využita pro stanovení koncentrace proteinů

4.1.10 Standardy pro určení molekulových hmotností

GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, USA) – DNA standard (obr. 3A)

Spectra™ Multicolour Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific, USA)

– proteinový standard (obr. 3B)

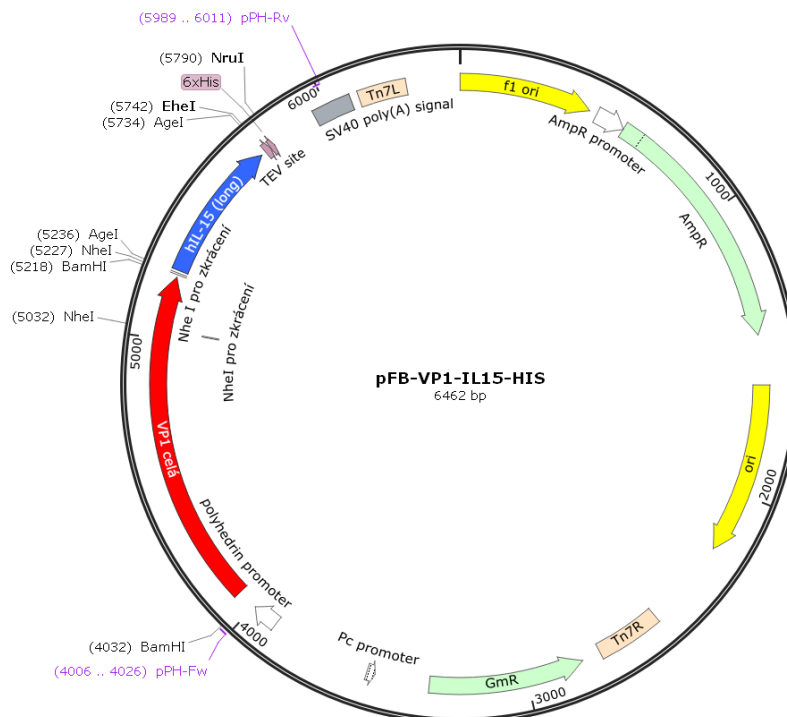


Obr. 3 – Použité standardy molekulových hmotností. DNA standard (A), Proteinový standard (B).
Převzato z doporučených návoduů výrobců.

4.1.11 Použité plazmidy

pFastBac1-VP1-hIL15 (obr. 4)

- plazmidový konstrukt uměle syntetizovaný obsahující gen pro VP1 protein MPyV a lidský IL-15, slouží jako základ pro všechny další plazmidy; připraveno na zakázku firmou Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, USA)



Obr. 4 – pFastBac1-VP1-IL15-HIS (vytvoreno v programu SnapGene).

4.1.12 Vektory

pFast-Bac1

- bakulovirový donorový vektor pro klonování a produkci rekombinantních bakulovirů (Invitrogen, USA)

4.1.13 Primery

pPh-Fw 5' - ATTCATACCGTCCCACCATCG - 3'

- $T_m = 57^\circ\text{C}$, nasedá pod polyhedrinový protomotor pFast-Bac1

pPh-Rv: 5' - TGTGAAATTTGTGATGCTATT - 3'

- $T_m = 57^\circ\text{C}$, nasedá do místa pro signál SV40 poly(A)

4.1.14 Použitý software

Blast software (NCBI, USA)

Bioinformatics.org – protein molecular weight prediction (USA)

itTEM 5.1 (Olympus soft imaging solutions GmbH, Japonsko)

Nanodrop (Nanodrop Technologies, USA)

Sequence Scanner v1.0 (Applied Biosystems, USA)

SnapGene software (GSL Biotech, USA)

4.1.15 Ostatní materiál

Dialyzační membrána Servapor 16mm, MWCO 12000 – 14000 (#44145; Serva, Německo)

Dialyzační kazeta Slide-A-Lyzer™, MWCO 10000 (#66380; Thermo Scientific, USA)

Elektroporační kyvety, 0,2cm elektrodová mezera (#165-2086; BioRad, USA)

Elektron-mikroskopické uhlíkem (3,3 nm) potažené měděné síťky (Electron Microscopy Science, UK)

Jednorázové plastové pomůcky (Biofil, Čína)

Laboratorní sklo (Kavalier, ČR)

Parafilm (Bemis, USA)

Nitrocelulózní membrána NC45 (Serva, Německo)

4.2 Metody

4.2.1 Sterilizace

Laboratorní sklo bylo sterilizováno po dobu 60 minut při teplotě 160°C horkým vzduchem. Jednorázové plastové pomůcky (např. špičky pro mikropipety či mikrozskumavky) byly sterilizovány po dobu 30 min v autoklávu při teplotě 121°C a tlaku 120 kPa. Roztoky, které nebylo možné sterilizovat v autoklávu, byly sterilizovány filtrací přes 0,45 a 0,22 μm póry. Kromě sterilizace v autoklávu byla ddH₂O rovněž filtrována. Skleněné a kovové nástroje byly opláchnuty v 96% (v/v) ethanolu a sterilizovány žiháním v plameni. Laminární boxy byly sterilizovány UV světlem nejméně po dobu 30 min.

4.2.2 Příprava plazmidů a práce s bakteriálními kulturami

4.2.2.1 Příprava agarových ploten pro TOP10 bakteriální buňky

LB médium obsahující příslušné množství agaru bylo sterilizováno v autoklávu a po zchladnutí na teplotu okolo 60°C bylo přidáno ampicilinové antibiotikum (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Na jednu Petriho misku (\varnothing 10 cm) bylo nalito 20 mL média a po zchladnutí byly Petriho misky uloženy do 4°C.

4.2.2.2 Příprava kompetentních buněk

Bakteriální buňky TOP10 byly zaočkovány do 20 mL TPN média a byly inkubovány 16 hodin při teplotě 37°C a 250 rpm na třepačce. Po stanovení optické hustoty na spektrofotometru Helios β byla bakteriální kultura zaočkována do 400 mL TPN média s výslednou optickou hustotou $A = 0,1$. Bakteriální kultura byla inkubována při 37°C a 250 rpm na třepačce. Po dosažení optické hustoty v rozmezí $A = 0,5 - 0,7$ byla suspenze rozdělena do osmi 50mL centrifugačních zkumavek. Po 10min centrifugaci při 4°C a 4000 rpm (rotor S4180, centrifuga Beckman GS-15R) a odstranění supernatantu byl sediment resuspendován v 50 mL sterilní ddH₂O a byla provedena centrifugace za stejných podmínek. Po odstranění supernatantu byl sediment resuspendován ve 25 mL sterilní ddH₂O a suspenze byla převedena do čtyř 50mL centrifugačních kyvet. Po opětovné centrifugaci po dobu 10 min při 4°C a 4000 rpm (rotor S4180, centrifuga Beckman GS-15R) byl sediment resuspendován ve 2 mL 10% (v/v) glycerolu a suspenze byly spojeny do dvou 50mL centrifugačních kyvet. Ty byly opět centrifugovány za stejných podmínek. Sediment byl resuspendován v jednom mL 10% (v/v) glycerolu. Suspenze byla po rozplnění do mikrozskumavek (po 50 nebo 100 μL) ihned zamrazena v tekutém dusíku a dále skladována při -80°C.

4.2.2.3 Elektroporace plazmidu do elektrokompetentních TOP10 bakteriálních buněk

(Dower et al., 1988)

Konzerva TOP10 bakteriálních buněk a konkrétní plazmid byly rozmrazeny na ledu. Po rozmrazení bylo 100 ng plazmidu přidáno ke 49 μL suspenze bakteriálních buněk. Po jednominutové inkubaci při laboratorní teplotě byla suspenze kvantitativně převedena do předem vychlazené elektroporační kyvety a byla provedena elektroporace při aplikaci elektrického pulsu (25 μF , 2,5 kV, 200 Ω) v elektroporátoru Gene Pulser Apparatus. Do elektroporační kyvety byl přidán jeden mL SOC média a suspenze byla převedena do Erlenmayerovy baňky. Po 60min inkubaci při 37°C a 250 rpm na třepačce byla bakteriální suspenze vyseta na agarové plotny s ampicilinovou rezistencí. Plotny byly uloženy do termostatu při teplotě 37°C po dobu 18 hodin.

4.2.2.4 Propagace plazmidů na bakteriálních buňkách

Z bakteriálních kultur, obsahujících příslušný plazmid, narostlých na agarových plotnách s ampicilinem bylo náhodně vybráno několik bakteriálních kolonií. Ty byly párátkem přeneseny do 100 mL LB média s ampicilinovým antibiotikem (100 µg/mL). Bakteriální kultura byla kultivována po dobu 16 hodin při 37°C a 250 rpm na třepačce.

4.2.2.5 Příprava konzerv

Do mikrozkuhavky bylo nanášeno 300 µL sterilního 50% (v/v) glycerolu a 700 µL roztoku buněk v LB médiu. Mikrozkuhavky byly ihned zamrazeny v tekutém dusíku a skladovány při -80°C.

4.2.2.6 Izolace plazmidu z TOP10 bakteriálních buněk – MiniPrep souprava

Bakteriální suspenze byla centrifugována po dobu 15 min při 4800 rpm (rotor S4180, centrifuga Beckman GS-15R). Po odstranění supernatantu byl ze sedimentu izolován plazmid pomocí soupravy GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit dle doporučeného návodu výrobce. Izolovaný plazmid ve formě sedimentu byl rozpuštěn ve 100 µL elučního roztoku, který byl součástí soupravy.

4.2.2.7 Izolace plazmidu z TOP10 bakteriálních buněk – MaxiPrep souprava

Bakteriální suspenze byla centrifugována po dobu 5 min při 9000 rpm (rotor 1620A, centrifuga Hettich universal 320R). Po odstranění supernatantu byl ze sedimentu izolován konkrétní plazmid pomocí soupravy JETSTAR Plasmid Purification Maxi Kit dle doporučeného návodu výrobce. Izolovaný plazmid ve formě sedimentu byl rozpuštěn ve 250 µL TE pufru, který byl součástí soupravy.

4.2.2.8 Minipreparace plazmidu z TOP10 bakteriálních buněk alkalickou lyzí

Bakteriální suspenze (0,75 mL) byla centrifugována jednu minutu při 14000 rpm (rotor F241.5, Beckman Microfuge R) a po odstranění supernatantu byl sediment resuspendován ve 250 µL TE pufru (viz kapitola 4.1.3). Dále bylo přidáno 250 µL roztoku II (viz kapitola 4.1.3) a obsah mikrozkuhavky byl promíchán otáčením, po kterém bylo ihned přidáno 250 µL roztoku III (viz kapitola 4.1.3). Suspenze byla centrifugována 5 min při 14000 rpm (rotor F241.5, Beckman Microfuge R). Vzniklý supernatant byl odebrán do nové mikrozkuhavky, bylo k němu přidáno 500 µL 100% izopropanolu a promícháno otáčením. Byla provedena 10min centrifugace při 14000 rpm (rotor F241.5, Beckman Microfuge R), supernatant byl odstraněn a sediment byl propláchnut 200 µL 80% (v/v) ethanolu. Po vyschnutí zbylého ethanolu na vzduchu byl vlhký pelet resuspendován ve 30 µL sterilní ddH₂O s RNázou A (10 mg/mL).

4.2.2.9 Restrikční štěpení plazmidů

Byla připravena restrikční směs obsahující 15 µg plazmidu, vhodný objem konkrétního restrikčního enzymu (tedy *AgeI*, *BamHI*, *NheI*, *NruI* a *EheI*) dle doporučeného návodu výrobce, vhodný pufr pro konkrétní restrikční enzym odpovídající desetíně celkového objemu restrikční směsi a ddH₂O. Restrikční směs byla umístěna po dobu dvou hodin do termostatu při teplotě 37°C.

4.2.2.10 Inaktivace restrikční směsi

Mikrozkuhavka s reakční směsí byla inkubována po dobu 10 min při teplotě 65°C ve stolním termobloku.

4.2.2.11 Fenol-chloroformová extrakce

Inaktivovaná restriční směs byla doplněna do celkového objemu 400 μL TE pufrem (viz kapitola 4.1.3). Následně bylo přidáno 400 μL fenolu, směs byla důkladně promíchána a byla provedena centrifugace po dobu 5 min při 13400 rpm (rotor F241.5, Beckman Microfuge R). Horní vodná fáze byla převedena do nové mikrozkušavky, ke které bylo přidáno v poměru 25:24:1 (v/v/v) 400 μL fenolu, chloroformu a izoamylalkoholu. Po promíchání byla provedena centrifugace za stejných podmínek. Horní vodná fáze byla opět převedena do nové mikrozkušavky, ke které bylo přidáno v poměru 24:1 (v/v) 400 μL chloroformu a izoamylalkoholu. Po promíchání a opětovné centrifugaci za stejných podmínek byla horní vodná fáze odebrána do nové mikrozkušavky, ke které byl přidán 3M octan sodný odpovídající desetině objemu vodné fáze a 96% ethanol odpovídající dvou a půl násobku objemu vodné fáze. Bylo provedeno dvouhodinové srážení DNA při teplotě -20°C s následnou centrifugací po dobu 5 min při 12000 rpm (rotor F241.5, Beckman Microfuge R). Supernatant byl odstraněn a sediment byl propláchnut 70% (v/v) ethanolem. Po 45min centrifugaci při teplotě 4°C a 13000 rpm (rotor F241.5, Beckman Microfuge R) a odstranění supernatantu byl sediment rozpuštěn ve 100 μL ddH₂O.

4.2.2.12 Izolace plazmidu z agarózového gelu

Fragmenty rozdělené pomocí gelové elektroforézy (viz kapitola 4.2.3.3) byly vizualizovány a vyříznuty z gelu v UV transluminátoru a poté izolovány pomocí soupravy NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit dle doporučeného návodu výrobce. Izolovaný plazmid ve formě sedimentu byl rozpuštěn ve 30 μL roztoku, který byl součástí soupravy.

4.2.2.13 Ligace plazmidu

Na základě pracovního protokolu Thermo Fisher Scientific (“User Guide: T4 DNA Ligase, 5 Weiss U, 1000 Weiss U,”) byla připravena ligační směs (tab. 1). Ta byla inkubována po dobu 60 min v termostatu při teplotě 37°C . Ligační směs byla inaktivována po dobu 10 min při 70°C ve stolním termobloku.

Tab. 1 – Složení a množství ligační směsi

	Objem
50 ng plazmidu	5 μL
T ₄ DNA ligáza	5 U
10x T ₄ DNA ligační pufr	5 μL
ddH ₂ O	do 50 μL

4.2.2.14 Sekvence

Na základě požadavků sekvenační laboratoře (Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova) byla připravena příslušná sekvenační směs o celkovém objemu 8 μL do 0,2mL tenkostěnné PCR mikrozkušavky (tab. 2) a vzorky předány k sekvenaci. Získané výsledky byly analyzovány pomocí softwarů SequenceScanner (Applied Biosystems) a Blast (NCBI).

Tab. 2 – Složení a množství sekvenační směsi

5 ng/100 bp plazmidu
5 pmol sekvenační primer
do 8 μL ddH ₂ O

4.2.3 Metody využití pro práci s DNA

4.2.3.1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA

Na měřicí plošku spektrofotometru NanoDrop byly nanесeny 2 μL příslušného vzorku a byla stanovena jeho koncentrace.

4.2.3.2 Polymerázová řetězová reakce

Reakční směs pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR) byla připravena v laminárním boxu dle tabulky 3. Se všemi složkami pro reakční směs bylo pracováno na ledu. Množství 25 μL / 50 μL reakční směsi bylo pipetováno do 0,2mL tenkostěnné mikrozkušavky, která byla poté umístěna do PCR cykléru, a byl spuštěn příslušný program (tab. 4). Po ukončení programu byly vzorky separovány na gelové elektroforéze (viz. kapitola 4.2.3.3) a vizualizovány pomocí přístroje Fusion FX.

Tab. 3 – Složky a jejich množství využitá pro PCR

Komponenty	Zásobní koncentrace	25 μL reakce	50 μL reakce
DNA templát	-	40 ng	80 ng
Forward primer	10 μM	1 μL	2 μL
Reverse primer	10 μM	1 μL	2 μL
dNTP	10mM	0,5 μL	1 μL
Reakční pufr	10x koncentrovaný	2,5 μL	5 μL
Polymeráza (DreamTaq/Vent)	5 U/ μL / 2 U/ μL	0,5 μL	1 μL
ddH ₂ O	-	18,5 μL	37 μL

Tab. 4 – Nastavení programu PCR cykléru

Proces	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94°C	180 s	1
Denaturace	94°C	40 s	
Nasedání primerů	59°C	50 s	30
Amplifikace	72°C	60 s	
Ukončení PCR	72°C	120 s	1

4.2.3.3 Gelová elektroforéza pro rozdělení a vizualizaci DNA fragmentů

Pro přípravu 1% agarózového gelu bylo do Erlenmayerovy baňky odváženo vhodné množství agarózy, která byla zahřátím rozpuštěna v 1x koncentrovaném TAE pufru (viz kapitola 4.1.3). 1,5 μL barvicího činidla MIDORI bylo přidáno k roztoku a po důkladném rozmíchání byl roztok nanесen do plastové formy a byl zasunut hřeben. Tuhý gel byl přenesen do předem sestavené aparatury pro gelovou elektroforézu DNA, zalit 1x koncentrovaným TAE pufrém a do jednotlivých jamek byl nanесen molekulový standard GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder a ekvivalentní množství vzorků s přidávkem jednoho μL 6x koncentrovaného DNA Loading Dye pufru. Elektroforéza probíhala po dobu 60 min při 70 V. Výsledný gel byl vizualizován pomocí přístroje VILBER Fusion FX.

4.2.4 Příprava rekombinantního bakuloviru

4.2.4.1 Příprava DH10Bac kompetentních buněk

Bakteriální buňky DH10Bac byly zaočkovány do 20 mL LB média s příslušnými antibiotiky (viz kapitola 4.2.4.2) a postup přípravy byl totožný jako v kapitole 4.2.2.2.

4.2.4.2 Příprava agarových ploten pro DH10Bac selekci

LB médium obsahující příslušné množství agaru bylo sterilizováno v autoklávu po dobu 30 min. Po zchladnutí na teplotu okolo 60°C byly přidány kanamycin (50 µg/mL), tetracyklin (10 µg/mL), gentamicin (7 µg/mL), X-gal (20 µg/mL) a IPTG (20 µg/mL). Na jednu Petriho misku (Ø 10 cm) bylo nalito 20 mL média. Po zchladnutí byly Petriho misky uloženy do 4°C.

4.2.4.3 Transformace plazmidů do DH10Bac kompetentních buněk elektroporací

pFast-Bac1 plazmidové konstrukty byly transformovány do DH10Bac kompetentních buněk elektroporací. K 50 µL suspenze DH10Bac buněk bylo přidáno 100 ng příslušného plazmidu. Po jednominutové inkubaci byla suspenze kvantitativně převedena do předem vychlazené elektroporační kyvety a byla provedena elektroporace při aplikaci elektrického pulsu (25 µF, 2,5 kV, 200 Ω) o délce 5 ms v elektroporátoru Gene Pulser Apparatus. Do elektroporační kyvety byl přidán jeden mL SOC média a po promíchání byla suspenze převedena do Erlenmayerovy baňky. Ta byla inkubována po dobu tří hodin při 37°C a 250 rpm na třepačce. Následně byla bakteriální suspenze s plazmidem vyseta na agarové plotny se selekčními antibiotiky, X-gal a IPTG (viz kapitola 4.2.4.2). Ty byly 48 hodin inkubovány v termostatu při teplotě 37°C.

4.2.4.4 Selektce DH10Bac monokultur pro izolaci bakmidové DNA

Narostlé bakteriální kolonie byly prozkoumány a bylo vybráno několik bílých, tedy úspěšně rekombinovaných kolonií, které byly sterilním párátkem zaočkovány na novou agarovou plotnu. Po 48hodinové inkubaci v termostatu při teplotě 37°C byla vybrána pouze bílá kolonie, která byla sterilním párátkem přenesena do Erlenmayerovy baňky obsahující 5 mL LB média, kanamycin (50 µg/mL), tetracyklin (10 µg/mL) a gentamicin (7 µg/mL). Ta byla inkubována při 37°C a 250 rpm na třepačce po dobu 16 hodin.

4.2.4.5 Izolace rekombinantní bakmidové DNA z DH10Bac kompetentních buněk

Po 16hodinové inkubaci byl 1,5 mL bakteriální suspenze kvantitativně přenesen do mikrozkušavky a byla provedena centrifugace po dobu jedné minuty při 14000 rpm (mikrocentrifuga Eppendorf). Po odstranění supernatantu byl pelet resuspendován ve 300 µL roztoku I (viz kapitola 4.1.3). Bylo přidáno 300 µL roztoku II (viz kapitola 4.1.3), promícháno otáčením mikrozkušavky a byla provedena inkubace při laboratorní teplotě po dobu 5 min. Poté bylo přidáno 300 µL 3M octanu draselného a po promíchání otáčením byla mikrozkušavka umístěna na led po dobu 10 min. Byla provedena centrifugace po dobu 10 min při 14000 rpm (mikrocentrifuga Eppendorf), po které byl supernatant umístěn do nové mikrozkušavky. Do té bylo přidáno 800 µL 100% izopropanolu, mikrozkušavka byla promíchána otáčením a byla umístěna na led po dobu 10 min. Byla provedena centrifugace po dobu 15 min při laboratorní teplotě při 14000 rpm (mikrocentrifuga Eppendorf). Supernatant byl odstraněn a k sedimentu bylo přidáno 500 µL 70% (v/v) ethanolu, promícháno otáčením mikrozkušavky. Byla opět provedena centrifugace, tentokrát po dobu 5 min při 14000 rpm (mikrocentrifuga Eppendorf). Po odstranění supernatantu byl sediment sušen na vzduchu po dobu 5 min při laboratorní teplotě a poté byl sediment resuspendován ve 40 µL TE pufu.

4.2.4.6 Pasážování buněk SF9

Buňky byly kultivovány v TNM-FH médiu s 10% (v/v) FBS v termostatu při teplotě 27°C a pasážovány v poměru 1:3 dvakrát týdně.

4.2.4.7 Transfekce buněk SF9 rekombinantní bakulovirovou DNA

Buňky SF9 byly vysety na 6-jamkovou destičku tak, že v každé jamce bylo 8×10^5 buněk ve 2 mL BSM média. Smícháním 100 μ L BSM média a 8 μ L činidla Cellfectinu byl připraven transfekční roztok, který byl důkladně resuspendován. Ke 100 μ L BSM média byl přidán jeden μ g rekombinantní bakmidové DNA a po promíchání byl celkový objem přenesen k transfekčnímu roztoku. Směs byla inkubována po dobu 20 min při laboratorní teplotě a poté byla po kapkách přidána do příslušné jamky s buňkami. Po čtyřhodinové inkubaci při teplotě 27°C bylo médium odstraněno a byly přidány 2 mL kompletního média s antibiotiky. Byla provedena 72 – 96 hodinová inkubace při teplotě 27°C.

4.2.4.8 Sklizení virového inokula a buněk SF9 po infekci nebo transfekci

Buňky byly mechanicky odstraněny z povrchu misky pomocí škrabátka a spolu s médiem kvantitativně převedeny do 50mL centrifugační kyvety. Po 5min centrifugaci při laboratorní teplotě a 2000 rpm (výkyvný rotor, centrifuga MSE) byl supernatant převeden do nové sterilní 50mL centrifugační zkumavky a sloužil jako virové inokulum pro další infekce (uchováván při 4°C). Buněčný pelet byl resuspendován v 10 mL PBS (viz kapitola 4.1.3). Po 5min centrifugaci při laboratorní teplotě a 2000 rpm (výkyvný rotor, centrifuga MSE) byl supernatant odstraněn a používán pro další infekce a pelet byl uchován při -20°C.

4.2.4.9 Infekce rekombinantním bakulovirem

Buňky SF9 byly vysety na Petriho misku (\varnothing 10 nebo 15 cm) v BSM médiu, po přisednutí buněk k povrchu (cca 30 min) bylo médium odsáto a k buňkám bylo přidáno virové inokulum. Obvykle byla infekce prováděna na Petriho miskách o průměru 15 cm s multiplicitou infekce (MOI) 10 PFU/buňku v minimálním objemu 2,5 mL BSM. Po 60min inkubaci při laboratorní teplotě a konstantním kývání bylo k buňkám přidáno 25 mL kompletního média s antibiotiky. Buňky byly dále inkubovány 72 – 96 hodin při teplotě 27°C a buněčné změny charakteristické pro probíhající infekci byly monitorovány.

4.2.4.10 Izolace celkové DNA z buněk SF9

Pomocí laboratorní soupravy AllPrep® DNA/RNA/Protein Mini Kit byla z peletu hmyzích buněk SF9 (viz kapitola 4.2.4.8) izolována celková DNA dle doporučeného návodu výrobce. Izolovaná DNA ve formě sedimentu byla rozpuštěna ve 100 μ L TE pufru.

4.2.4.11 Plaková titrace

Buňky SF9 byly vysety na 6-jamkovou destičku tak, že v každé jamce bylo 1×10^6 buněk ve 2 mL BSM média. Virové inokulum bylo ředěno desítkovou metodou v BSM v celkovém objemu jeden mL v ředící řadě 10^{-4} – 10^{-8} . Po 30min inkubaci při laboratorní teplotě bylo od buněk odsáto médium a v duplikátech bylo přidáno 400 μ L ředěného virového inokula. Po 60min inkubaci při laboratorní teplotě a konstantním kývání bylo k buňkám přidáno 2,5 mL rozehřátého kompletního média pro plakovou titraci (42°C; viz kapitola 4.1.4.2). Po zatuhnutí média (cca 20 min) při pokojové teplotě byly buňky inkubovány 6 – 8 dní v termostatu při teplotě 27°C a test byl vyhodnocen. Plaky byly spočítány a titer inokula byl stanoven podle vzorce 1.0.

$$\text{titr (pfu/mL)} = \frac{\text{průměrný počet plaků v jamce}}{\text{ředění virového inokula} \times \text{objem přidávaného viru}} \quad 1.0$$

4.2.4.12 Příprava buněčných lysátů pro elektroforetickou separaci

Buněčné pelety získané sklizením infikovaných buněk (viz kapitola 4.2.4.8) ze čtyř Petriho misek (Ø 15 cm) byly rozmrazeny a bylo k nim přidáno 150 µL RIPA pufru. Byla provedena 20min inkubace na ledu a sonikace ručním sonikátorem. Po promíchání a centrifugaci po dobu 30s při 13000 rpm (mikrocentrifuga Eppendorf) bylo do nové mikrozkušavky odebráno 80 µL supernatantu, ke kterému bylo přidáno 20 µL 5x koncentrovaného Laemmliho pufru. Vzorek byl umístěn na 5 min do termobloku při teplotě 100°C a poté byl elektroforetický separován (viz kapitola 4.2.6.3).

4.2.5 Izolace proteinů a virových částic

4.2.5.1 Izolace proteinů s histidinovou kotvou

Pelet buněk SF9 po infekci rekombinantním bakulovirem kódujícím proteiny obsahující histidinovou kotvu byl rozmrazen a resuspendován v 10 mL vazebného pufru pro HisTrap FF izolaci proteinů (viz kapitola 4.1.3), ve kterém byla rozpuštěna tableta inhibitoru proteáz. K suspenzi bylo přidáno 50 µL 1M (w/v) chloridu hořečnatého a 100 µL DNázy I. Suspenze byla důkladně resuspendována, bylo k ní přidáno 500 µL 10% (v/v) Tritonu X-100 a byla inkubována po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Suspenze byla 30x sonikována (QSONICA) po dobu 2s při 20% amplitudě s 5s intervaly mezi jednotlivými pulzy. Po rozplnění do mikrozkušavek byla centrifugována po dobu 20 min při 14950 rpm (rotor F241.5, Beckman Microfuge R) a teplotě 4°C. Mezitím byla připravena HisTrap FF kolonka, která byla promyta ddH₂O, elučním a vazebným pufrem pro HisTrap FF izolaci proteinů (viz kapitola 4.1.3) a byla provedena izolace dle doporučeného návodu výrobce. Vzorek byl uschován při -20°C.

4.2.5.2 Izolace VLPs a VNS po buněčné lýzy detergentem a vysolení

(Buck et al., 2005)

Pelet buněk SF9 po infekci rekombinantním bakulovirem byl rozmrazen a resuspendován ve stejném objemu DPBS média s 9,5mM Mg²⁺. K suspenzi byl přidán 10% (v/v) Triton X-100 odpovídající 0,5% celkového objemu a benzonáza odpovídající 0,1% celkového objemu. Suspenze byla inkubována po dobu 2 hodin při teplotě 37°C a poté 12 hodin při teplotě 0°C. Následně byl k suspenzi přidán 5M (w/v) NaCl (výsledná koncentrace 850mM) a suspenze byla centrifugována 5 min při 7500 rpm (rotor F241.5, Beckman Microfuge R) a teplotě 4°C. Supernatant byl kvantitativně převeden do ultracentrifugační kyvety a sediment byl resuspendován v jednom mL pufru-B a doplněn 5M NaCl (výsledná koncentrace 850mM). Byla provedena centrifugace za stejných podmínek. Supernatant byl opět převeden do ultracentrifugační kyvety a byla provedena ultracentrifugace v CsCl gradientu (viz kapitola 4.2.5.4).

4.2.5.3 Izolace VLPs a VNS po sonikaci a přečištění přes sacharózový polštář

Pelet buněk SF9 po infekci rekombinantním bakulovirem byl rozmrazen a resuspendován ve 2 mL pufru-B. Suspenze byla sonikována (QSONICA) pětkrát po dobu 30s při 20% amplitudě s 20s intervaly mezi jednotlivými pulzy. Byla provedena centrifugace po dobu 5 min při 4°C a 14950 rpm (rotor F241.5, Beckman Microfuge R) a vzniklý supernatant byl převeden do ultracentrifugační kyvety. Do zkumavky, ve které byla provedena sonikace buněčného peletu, byly dány 2 mL pufru-B, suspenze byla opět centrifugována za stejných podmínek a vzniklý supernatant byl spojen s předchozím. Celý tento krok byl ještě jednou zopakován. Suspenze v ultracentrifugační kyvetě byla doplněna do celkového objemu 10 mL, byla podvrstvena 2 mL 10% (w/v) sacharózy v pufru-B a byla provedena tříhodinová ultracentrifugace při teplotě 4°C a 35000 rpm (rotor SW41,

ultracentrifuga Beckman optima L-90K). Supernatant byl odstraněn a pelet byl rozpouštěn ve 2 mL pufru-B po dobu 12 hod při teplotě 4°C.

4.2.5.4 Purifikace VLPs a VNS ultracentrifugací v rovnovážném CsCl gradientu

Získaná suspenze (viz kapitola 4.2.5.2 a 4.2.5.3) byla doplněna pufrům-B do celkové hmotnosti 8 g. Do ultracentrifugační kyvety bylo přidáno a rozpuštěno 3,65 g CsCl. Suspenze v kyvetě byla doplněna parafinovým olejem a byla provedena centrifugace po dobu 24 hod při teplotě 18°C a 35000 rpm (rotor SW41, centrifuga Beckman optima L-90K). Po centrifugaci byl parafinový olej odstraněn a po cca 500 µL byly separovány jednotlivé frakce. Ty byly dále charakterizovány dle refraktometrického indexu (viz kapitola 4.2.5.5) a přítomnosti proteinu. Z každé separované frakce byly nanášeny 2 µL vzorku na nitrocelulózovou membránu a po vyschnutí byla přítomnost proteinů ve frakcích ověřena imunodetekcí (viz kapitola 4.2.6.6).

4.2.5.5 Refraktometrické stanovení

Na měřicí plošku Abbého refraktometru bylo nanášeno 10 µL roztoku z každé frakce obsahující VLPs či VNS a byl stanoven index lomu jednotlivých frakcí.

4.2.5.6 Dialýza proteinů

Vhodné frakce obsahující požadované proteiny byly vybrány na základě refraktometrického stanovení (viz kapitola 4.2.5.5) a imunodot blot analýzy (viz kapitola 4.2.6.6) a převedeny a uzavřeny do předem vařených dialyzačních membrán. Spojené frakce byly dialyzovány proti 2 L 1x koncentrovaného (w/v) pufru-B při 4°C na magnetické míchačce po dobu 72 hodin s jednou výměnou 2 L 1x koncentrovaného (w/v) pufru-B po prvních 30 minutách.

4.2.5.7 Koncentrování proteinů přes sacharózový polštář

Dialyzované frakce byly převedeny do ultracentrifugačních kyvet a byly podvrstveny 2 mL 10% (w/v) sacharózy v pufru-B. Byla provedena tříhodinová ultracentrifugace při teplotě 4°C a 35000 rpm (rotor SW41, ultracentrifuga Beckman optima L-90K). Supernatant byl odstraněn a sediment byl resuspendován ve 300 µL pufru-B. V případě potřeby byl vzorek uschován při -20°C.

4.2.5.8 Precipitace proteinů

Z rozmrazeného vzorku bylo odebráno 200 µL do nové mikrozkušavky, do které bylo přidáno 600 µL 96% methanolu. Po důkladném promíchání bylo přidáno 150 µL chloroformu, opět promícháno a bylo přidáno 400 µL ddH₂O. Byla provedena centrifugace po dobu 5 min při 14950 rpm (rotor F241.5, Beckman Microfuge R). Horní vodná fáze byla odstraněna a ke spodní fázi bylo přidáno 450 µL 96% methanolu. Byla znovu provedena centrifugace za stejných podmínek. Supernatant byl odstraněn a sediment byl sušen na vzduchu po dobu 15 min při laboratorní teplotě. Poté byl rozpouštěn v příslušném množství vhodného roztoku.

4.2.6 Charakterizace proteinů

4.2.6.1 Stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů ve vzorcích byla stanovena pomocí fluorimetru Qubit dle doporučeného návodu výrobce.

4.2.6.2 Příprava vzorků na SDS-PAGE

Vzorek byl rozmrazen na ledu a v případě potřeby byla provedena jeho precipitace (viz kapitola 4.2.5.8). Ze vzorku byla část odebrána do nové mikrozkušavky, do které bylo

přidáno 5 μL 5x koncentrovaného Laemmliho pufru. Do celkového objemu 25 μL byla suspenze doplněna ddH₂O a vzorek byl po důkladném promíchání vařen po dobu 5 min při 100°C ve stolním termobloku. Následně byl vzorek nanášen na gel ve vhodném množství (nanášky jsou uvedeny v legendách jednotlivých výsledků).

4.2.6.3 Elektroforetická separace proteinů v polyakrylamidovém gelu

Separční 12% gel (30% (w/v) akrylamid, 1,5M Tris-HCl (pH = 6,8), 10% (w/v) SDS, 10% (w/v) APS, TEMED, ddH₂O) byl nanesen do sestavené aparatury pro SDS-PAGE a převrstven dH₂O. Po ztuhnutí gelu (cca 30 min) byla voda vylita a byl nanesen 5% zaostřovací gel (30% (w/v) akrylamid, 1,5M Tris-HCl (pH = 8,8), 10% (w/v) SDS, 10% (w/v) APS, TEMED, ddH₂O), do kterého byl umístěn hřeben. Po ztuhnutí gelu (cca 30 min) a vyjmutí hřebenu byl gel umístěn do elektroforetické aparatury, která byla naplněna elektrodovým pufrem pro SDS-PAGE (viz kapitola 4.1.3). Po nanesení vzorků a molekulového standardu probíhala elektroforetická separace nejprve při 80 V po dobu 30 min a poté při 140 V cca 120 min.

4.2.6.4 Barvení a fixace gelů

Výsledné gely byly barveny buď přímo po separaci proteinů v polyakrylamidovém gelu nebo po přenosu proteinů na membránu pomocí Western blotu. Po rozložení aparatury byl gel promyt po dobu 5 min v ddH₂O a následně byl barven v ImperialTM Protein Stain barvivu dle doporučeného návodu výrobce. Po 12hodinové inkubaci byl gel opět promyt ddH₂O a byl vizualizován pomocí přístroje Fusion FX.

4.2.6.5 Western Blot

Po elektroforetické separaci vzorků byl gel inkubován v elektrodovém pufru pro Western blot po dobu 10 min. Poté byl vytvořen blotovací sendvič dle doporučeného návodu výrobce, který byl umístěn do blotovací aparatury a zalit 1,2 L vychlazeného elektrodového pufru pro Western blot (viz kapitola 4.1.3). Proteiny byly blotovány po dobu 3 hodin při konstantním proudu 250 mA. Po přenesení proteinů na nitrocelulózovou membránu byla membrána propláchnuta v ddH₂O a 30 min inkubována v 5% (w/w) sušeném mléce v PBS. Přítomnost proteinů na membráně byla ověřena a vizualizována pomocí imunodetekce (viz kapitola 4.2.6.6).

4.2.6.6 Imunodetekce proteinů na membráně

Membrána byla blokována roztokem 5% (w/w) nízkotučného sušeného mléka v PBS po dobu 30 min. Membrána byla inkubována v jednom mL 5% (w/w) sušeného mléka v PBS s příslušnou primární protilátkou po dobu 60 min. Poté byla membrána promyta třikrát 10 min v PBS a inkubována v jednom mL 5% (w/w) sušeného mléka v PBS se sekundární protilátkou proti použité primární protilátce konjugovanou s křenovou peroxidázou po dobu 30 min. Membrána byla promyta třikrát 10 min v PBS a byla vyvolána inkubací v suspenzi roztoku A (0,1M Tris-HCl (pH = 8,0), 250mM (w/v) luminol, 90mM (w/v) kyselina p-kumarová) a roztoku B (0,1M Tris-HCl (pH = 8,0), 0,02% (v/v) H₂O₂), smíchaných v poměru 1:1, po dobu 20s při laboratorní teplotě. Signál byl vizualizován pomocí přístroje Fusion FX.

4.2.6.7 Elektronová mikroskopie

Na proužek parafilmu bylo vedle sebe umístěno 5 μL izolované VLPs suspenze, dvakrát 100 μL ddH₂O a dvakrát 50 μL roztoku 2% (v/v) kyseliny fosfowolframové. Aktivovaná elektron-mikroskopická síťka byla na 10 min nejprve umístěna na kapku virové suspenze, po kterých byla dvakrát přenesena na 30s na kapku ddH₂O. Následně byla dvakrát přenesena na kapku fosfowolframové kyseliny na dobu 60s. Po odstranění přebytečné

kapaliny ze sítky filtračním papírem byly vzorky vizualizovány na elektronovém mikroskopu JEOL JEM 1200EX s CDD kamerou (itTEM 5.1; Olympus soft imaging solution GmbH).

4.2.6.8 Imunofluorescence virem infikovaných buněk SF9

Do 24-jamkové destičky bylo umístěno ethanolem opláchnuté plamenem protažené imunofluorescenční sklíčko. Buňky SF9 byly vysety tak, že v každé jamce bylo 3×10^5 buněk v jednom mL BSM média. Po 30min inkubaci při laboratorní teplotě bylo od buněk odsáto médium a v triplicátech bylo do každé jamky přidáno 100 μ L příslušného vzorku. Byla provedena 60min inkubace při laboratorní teplotě na stolní třepačce, po které byl do jednotlivých jamek přidán jeden mL kompletního média s antibiotiky. Po 48hod inkubaci při teplotě 27°C bylo odsáto médium a buňky byly fixovány 10 min 96% methanolem při teplotě -80°C. Po odstranění methanolu byly buňky inkubovány ve 200 μ L 0,25% (v/w) BSA a 0,25% (v/w) želatiny v PBS s příslušnou primární protilátkou po dobu 60 min. Poté byly jamky promyty třikrát 10 min v PBS a buňky byly inkubovány ve 200 μ L 0,25% (v/w) BSA a 0,25% (v/w) želatiny v PBS se sekundární protilátkou proti použité primární protilátce konjugované s fluorescenční barvou po dobu 30 min. Jamky s buňkami byly opět promyty třikrát 10 min v PBS, po kterém bylo do jamek přidáno 500 μ L ddH₂O. Imunofluorescenční sklíčka s buňkami byla umístěna do 2 μ L 70% (v/v) glycerolu s fluorescenční barvou DAPI. Sklíčka byla vizualizována na fluorescenčním mikroskopu.

4.2.6.9 Pasážování buněk Jurkat

Buňky byly kultivovány v kompletním RPMI médiu v CO₂ termostatu při teplotě 37°C a pasážovány v poměru 1:3 třikrát týdně.

4.2.6.10 Proliferační zkouška na buňkách Jurkat *in vitro*

Pomocí laboratorní soupravy CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell laboratorní soupravy byla provedena proliferační zkouška dle doporučeného návodu výrobce. Do jednotlivých jamek 96-jamkové destičky bylo pipetováno 100 μ L předem připravené suspenze buněk Jurkat s konkrétními variantami vzorků. Vzorky byly ředěny desítkovou metodou v kompletním RPMI médiu s antibiotiky v celkovém objemu 300 μ L v ředící řadě $2 \times 10^{-2} - 2 \times 10^2$ nebo $6 \times 10^{-2} - 6 \times 10^2$. Buňky Jurkat, ředěné v koncentraci 2×10^5 buněk/mL v kompletním RPMI médiu s antibiotiky, byly smíchány s ředěnými variantami vzorků v poměru 1:1. Byla provedena inkubace v CO₂ termostatu při teplotě 37°C po dobu 72 hodin. Do jednotlivých jamek s buňkami bylo přidáno 20 μ L CellTiter 96[®] roztoku a byla provedena inkubace v CO₂ termostatu při teplotě 37°C po dobu čtyř hodin. Následně byla stanovena absorbance při vlnové délce $\lambda = 490$ nm a proliferační zkouška byla vyhodnocena.

4.2.6.11 Pasážování buněk CTLL-2

Buňky byly kultivovány v kompletním RPMI médiu s 10% (v/v) suspenzí IL-2 nebo konkavalinu v CO₂ termostatu při teplotě 37°C a pasážovány v poměru 1:2 třikrát týdně.

4.2.6.12 Proliferační zkouška na buňkách CTLL-2 *in vitro*

Proliferační zkouška byla opět provedena pomocí CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell laboratorní soupravy dle doporučeného návodu výrobce, ale uzpůsobeným pro buňky CTLL-2. Vzorky byly ředěny desítkovou metodou v kompletním RPMI médiu s antibiotiky v celkovém objemu 300 μ L v ředící řadě $2 \times 10^{-2} - 2 \times 10^2$ nebo $6 \times 10^{-2} - 6 \times 10^2$. Buňky CTLL-2 byly sklizeny do 50mL centrifugační kyvety, dvakrát centrifugovány 5 min při 400 rpm (rotor 1620A, centrifuga Hettich universal 320R) a dvakrát propláchnuty 50 mL kompletního RPMI média. Následně byly ředěné v koncentraci 5×10^4 buněk/mL v kompletním RPMI médiu a byly smíchány s ředěnými variantami vzorků v poměru 1:1. Byla provedena inkubace v CO₂ termostatu při teplotě 37°C po dobu 48 hodin. Další postup byl totožný jako v kapitole 4.2.6.10.

5 Výsledky

5.1 Experimentální schéma práce

Průběh experimentální práce zahrnuté v této diplomové práci je zachycen na schématu č. 1. a obr. 5.

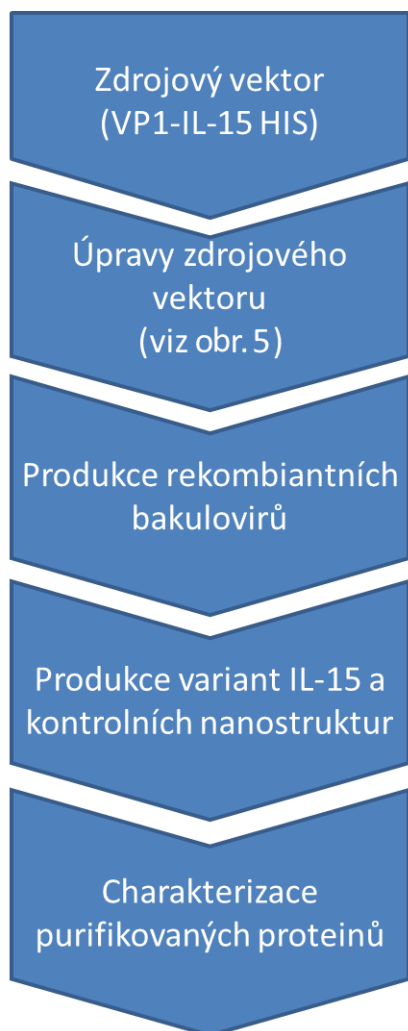
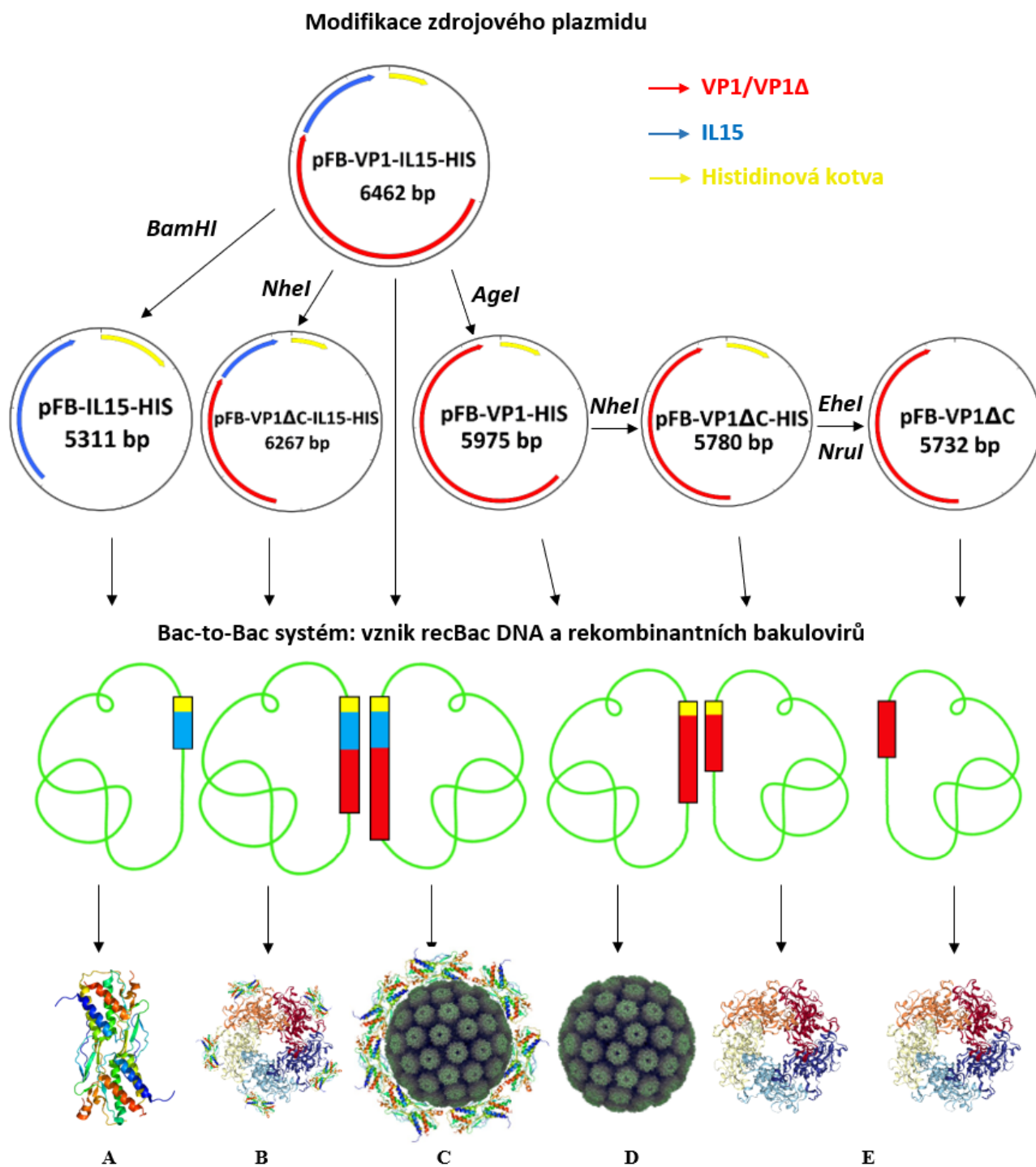


Schéma č. 1 – Metodami genového inženýrství byly z jednoho uměle syntetizovaného konstruktu pFB-VP1-IL15-HIS (zdrojový vektor) obsahujícího geny pro VP1 protein, IL-15 a histidinovou kotvu, připraveny různé plazmidové konstrukty: konstrukt pFB-VP1-IL15-HIS byl modifikován restričním štěpením různými restričními enzymy (popis viz obr. 5). Připravené plazmidové vektory byly využity v Bac-to-Bac systému pro produkci rekombinantních bakulovirů. Pomocí bakulovirového expresního systému pak byly produkovány a následně purifikovány a charakterizovány (elektronová mikroskopie, imunodetekce) různé varianty IL-15 a kontrolních virových nosičů (viz obr. 5). U vybraných vzorků bylo dále provedeno testování jejich vlastností pomocí proliferačního testu na T-lymfocytech *in vitro*.

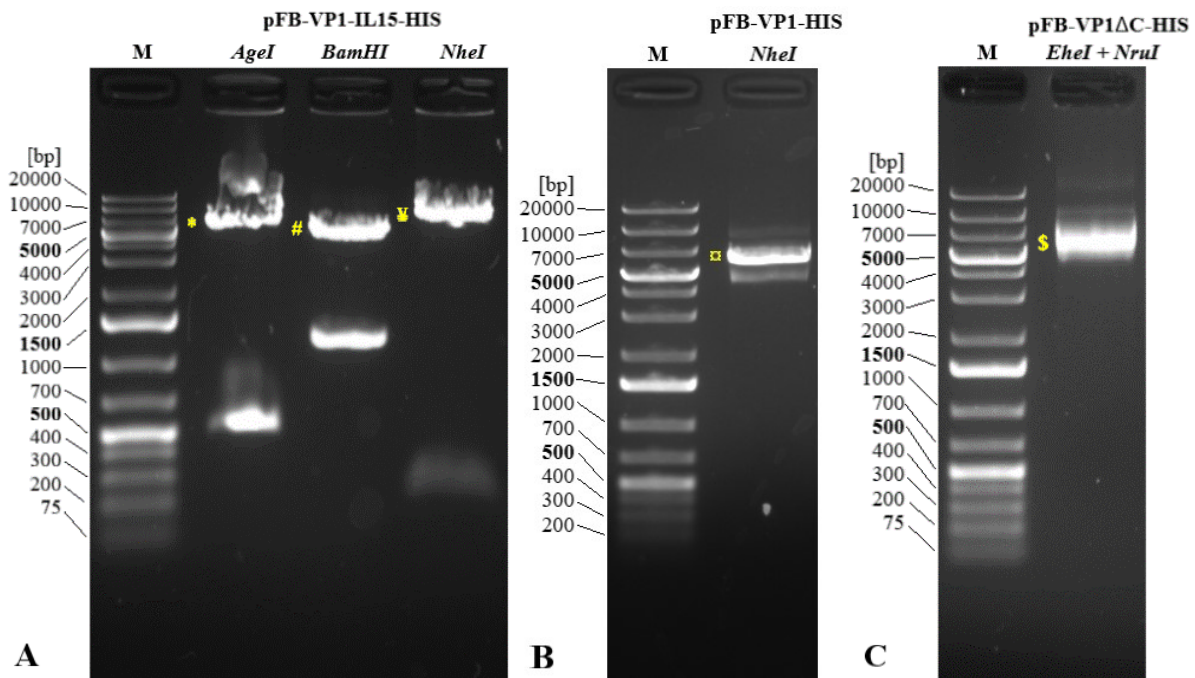
Konkrétně byly připraveny tyto virové nosiče odvozené od VP1 MPyV: VLPs obsahující celý VP1 protein, dlouhý 384 aminokyselin, fúzovaný na C-konci s IL-15 (VP1-IL15-HIS). Dále VNS obsahující VP1 protein zkrácený o jeho C-konec, pouze 322 aminokyselin dlouhý, a fúzovaný s IL-15 (VP1 Δ C-IL15-HIS). Dále jako kontroly byly připraveny VLPs a VNS obsahující různě modifikovaný VP1 protein a samotný protein IL-15. Konkrétně se jednalo o IL-15 (IL15-HIS), samotný VP1 protein (VP1-HIS) a VP1 protein zkrácený o C-konec (VP1 Δ C-HIS a VP1 Δ C). Většina těchto konstruktů obsahuje histidinovou kotvu (HIS) pro snadnější izolaci a přečištění například pomocí IMAC chromatografie.



Obr. 5 - Úpravy zdrojového plazmidu a následná produkce proteinů. Plazmid pFB-VP1-IL15-HIS byl modifikován štěpením znázorněnými restričními enzymy za vzniku variant vektorů, které sloužily pro přípravu rekombinantní bakmidové DNA (recBac DNA). Ta byla transfekována do buněk SF9, kde dala vzniknout příslušným rekombinantním bakulovirům (recBacV). Po následné infekci došlo v buňkách k produkci proteinů. Výsledné obrázky (velikostní poměry nejsou zachovány) odpovídají předpokládaným strukturám vzniku. IL15 protein (A), VP1ΔC-IL15-HIS konstrukt, pentamery VP1 s navázaným IL-15 (B), VP1-IL15-HIS konstrukt, VLPs s navázaným IL-15 (C), VP1-HIS, klasické VLPs (D), VNS VP1ΔC-HIS a VP1ΔC, pentamery (E, F).

5.2 Příprava a modifikace jednotlivých plazmidů metodami genového inženýrství

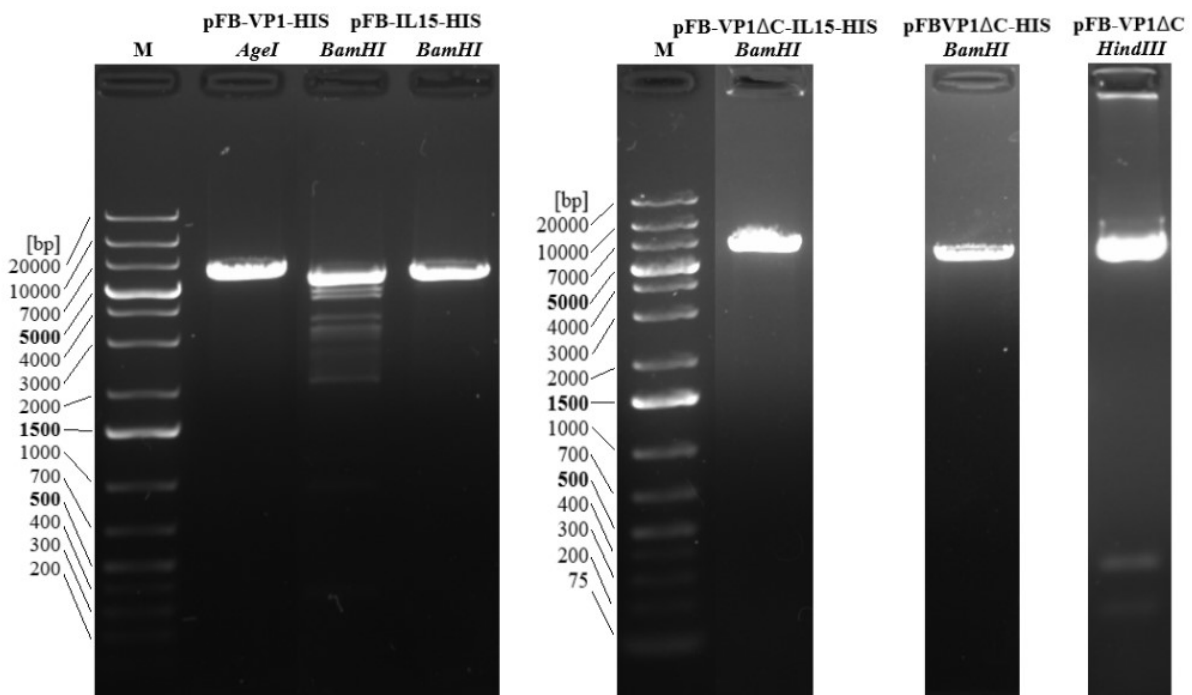
Zdrojový plazmid pFB-VP1-IL15-HIS (viz mapa plazmidu na obr. 4, str. 29) dlouhý 6462 bp byl štěpen následujícími restrikcími enzymy: enzym *AgeI* rozštěpil tento pFB-VP1-IL15-HIS za vzniku lineární pFB-VP1-HIS DNA dlouhé 5975 bp (obr. 6A), enzym *BamHI* za vzniku lineární pFB-IL15-HIS DNA o délce 5311 bp (obr. 6A) a enzym *NheI* za vzniku lineární pFB-VP1 Δ C-IL15-HIS DNA dlouhé 6267 bp (obr. 6A). Požadované DNA fragmenty byly izolovány z gelu, opět ověřeny gelovou elektroforézou (data nepřiložena) a ligovány. Po religaci plazmidu byl pFB-VP1-HIS opětovně štěpen enzymem *NheI* za vzniku lineární pFB-VP1 Δ C-HIS DNA dlouhé 5780 bp (obr. 6B), která byla po religaci opět štěpena, tentokrát enzymy *EheI* a *NruI* za vzniku lineární pFB-VP1 Δ C DNA dlouhé 5732 bp (obr. 6C). Úspěšnost štěpení daných enzymů byla ověřena gelovou elektroforézou.



Obr. 6 – Restrikcí štěpení plazmidů, pFB-VP1-IL15-HIS byl štěpen enzymem *AgeI* za vzniku pFB-VP1-HIS DNA (6A*), enzymem *BamHI* za vzniku pFB-IL15-HIS DNA (6B#) a enzymem *NheI* za vzniku pFB-VP1 Δ C-IL15-HIS DNA (6A¥). Plazmid pFB-VP1-HIS byl štěpen enzymem *NheI* za vzniku pFB-VP1 Δ C-HIS DNA (6B□) a plazmid pFB-VP1 Δ C-HIS byl štěpen enzymy *EheI* a *NruI* za vzniku pFB-VP1 Δ C (6C\$).

V případě pFB-VP1 Δ C-HIS DNA, která byla štěpena postupně dvěma enzymy, byla před štěpením druhým enzymem provedena fenol-chloroformová extrakce. Ligací nově vzniklé plazmidové konstrukty byly transformovány do TOP10 elektrokompetentních bakteriálních buněk a ty byly selektovány na agarových plotnách s ampicilinovou rezistencí. Tímto způsobem byl zaručen růst pouze buněk obsahující plazmidy našeho zájmu. Z náhodně

vybraných bakteriálních kolonií byla izolována finální podoba plazmidů a jejich správnost byla ověřena restričním štěpením (obr. 7). Na základě mapy plazmidů v programu SnapGene byly vybrány takové restriční enzymy, z jejichž dvou restričních míst bylo jedno v nové DNA zachováno v původní sekvenci, zatímco druhé restriční místo bylo odstraněno modifikacemi. Plazmidy, u kterých neodpovídal vzorec štěpení předpokladu, byly po kontrole štěpení na gelové elektroforéze vyřazeny. Tímto způsobem byly selektovány pouze plazmidy obsahující geny našeho zájmu. Sekvenací byla potvrzena správnost nově připravených selektovaných plazmidových konstruktů (data nepřiložena), která definitivně potvrdila, že byly úspěšně připraveny všechny požadované plazmidové konstrukty nesoucí geny našeho zájmu.



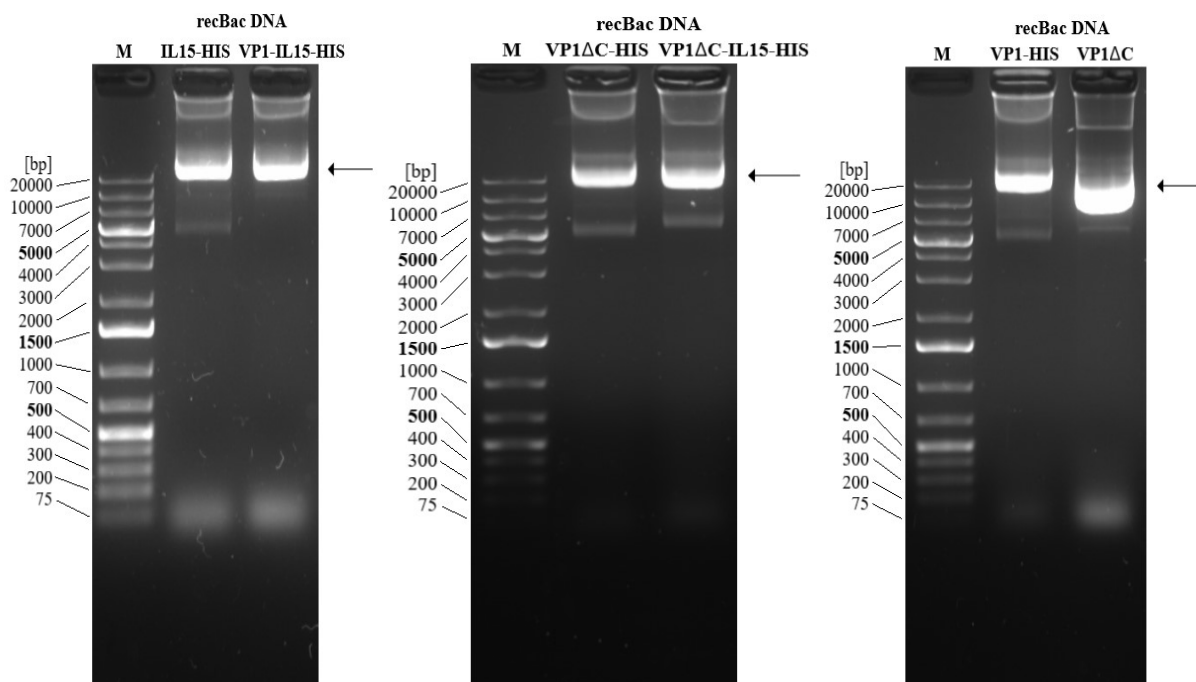
Obr. 7 – Výsledné ověření správnosti daných plazmidů. Obrázek zobrazuje správné i nesprávné štěpení plazmidů vybranými restričními enzymy. První pFB-IL15-HIS plazmid štěpený BamHI obsahuje mnoho fragmentů, jedná se tedy o nevhodný plazmid, zatímco druhý pFB-IL15-HIS plazmid štěpený BamHI zaujímá lineární formu a jedná se tedy o požadovaný plazmid. Ostatní plazmidy obsahují pouze jeden lineární fragment, jedná se tedy o správný plazmid.

5.3 Příprava recBac DNA a produkce proteinů v bakulovirovém expresním systému

5.3.1 Izolace recBac DNA z DH10Bac buněk

Připravené plazmidy byly transformovány do DH10Bac buněk, ve kterých proběhla místně specifická rekombinace plazmidové DNA za vzniku recBac DNA. Na základě „modro-bílé“ selekce byly vybrány bakteriální kolonie nesoucí geny našeho zájmu. RecBac DNA byla izolována pouze z bílých, úspěšně rekombinovaných bakteriálních kolonií

a ověřena vizualizací po gelové elektroforéze (obr. 8). Dle doporučeného návodu výrobce a již předešlých experimentů v rámci laboratoře byla očekávána velikost izolované recBac DNA pro každý příslušný plazmid okolo 20 kbp. Z obr. 8 je patrné, že všechny vizualizované recBac fragmenty odpovídají našemu očekávání a mělo by se teoreticky jednat o úspěšně rekombinovanou recBac DNA. Před následnou transfekcí do hmyzích buněk byla stanovena koncentrace izolované recBac DNA (tab. 6, str. 58).

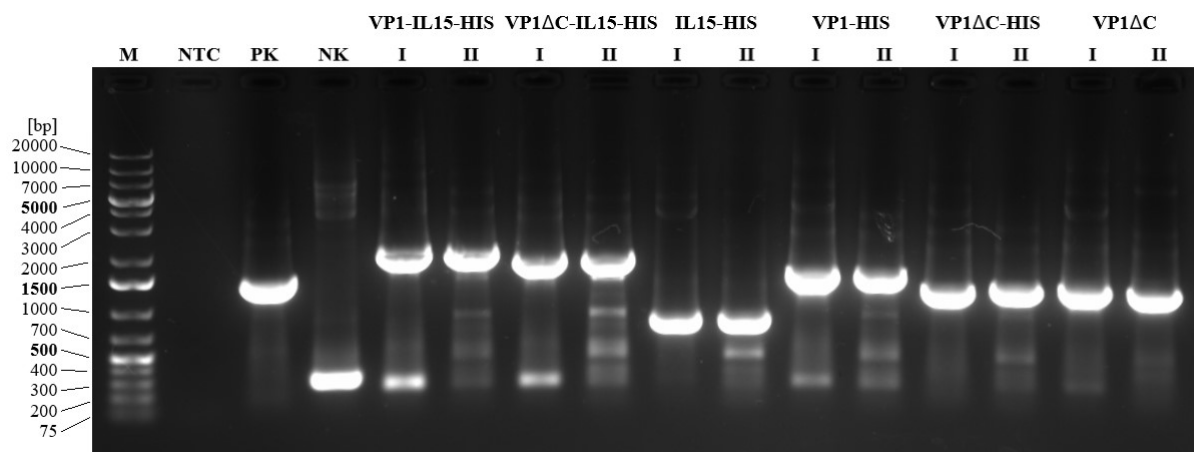


Obr. 8 – Ověření úspěšné rekombinace plazmidů do podoby recBac DNA její izolací. Izolovaná recBac DNA byla vizualizována po gelové elektroforéze pro všechny konstrukty. Šipka značí velikost DNA všech konstruktů, která je dle očekávání okolo 20 kbp. Fragmenty okolo 75 bp jsou RNA, které byly dodatečně odstraněny RNázou A.

5.3.2 Ověření úspěšné rekombinace v recBac DNA PCR reakci

Z důvodu definitivního ověření, že izolovaná recBac DNA jednotlivých konstruktů obsahuje geny našeho zájmu, byla provedena PCR reakce s následnou vizualizací po separaci na gelové elektroforéze (obr. 9, str. 47). Kontrolní PCR reakce byly rovněž provedeny s použitím původních (pFB) konstruktů jako templátové DNA. Ty sloužily jako kontrola pro porovnání velikosti vzniklých produktů PCR reakce s využitím recBac DNA jako templátu. Pro PCR reakci byly využity primery pPh, které lze použít univerzálně pro amplifikaci celého genu klonovaného pod polyhedrinový promotor, a to jak v plazmidu pFastBac1, tak i v bakmidové DNA. Podle velikosti fragmentů (bez klonovaného genu vzniká s pPh primery fragment o velikosti 299 bp) se podařilo prokázat, že izolované DNA obsahuje geny pro VP1, IL-15 a histidinovou kotvu ve správné pozici za polyhedrinovým promotorem. V programu SnapGene bylo zjištěno, že velikost fragmentů vzniklých při amplifikaci recBac

DNA VP1-IL15-HIS by měla být 2006 bp, VP1 Δ C-IL15-HIS by měla být 1811 bp, IL15-HIS 820 bp, VP1-HIS 1508 bp, VP1 Δ C-HIS 1313 bp a VP1 Δ C by měla být 1265 bp. Na obr. 9 je patrné, že produkty PCR s použitím recBac DNA jako templátu jsou velikostně identické s produkty PCR využívajícími odpovídající plazmidovou DNA. Lze tedy předpokládat, že plazmidová DNA jednotlivých vzorků byla úspěšně rekombinována do podoby recBac DNA.



Obr. 9 – Ověření úspěšné rekombinace a izolace recBac DNA. PCR reakce poskytuje stejně velké produkty při použití templátové DNA z plazmidu nebo recBac DNA. Římská jedna (I) značí použití plazmidové DNA, římská dvě (II) značí použití recBac DNA. Jako pozitivní kontrola (PK) byla použita DNA izolovaná po infekci recBacV kódujícího MPyV VP1 protein (kmen BG). Jako negativní kontrola (NK) byl použit prázdný pFB plazmid. Fragменты VP1-IL15-HIS jsou velké 2006 bp, VP1 Δ C-IL15-HIS 1811 bp, IL15-HIS 820 bp, VP1-HIS 1508 bp, VP1 Δ C-HIS 1313 bp a VP1 Δ C 1265 bp. Jako primery byly použity pPh primery a DreamTaq polymeráza. Teplota nasedání primerů byla 59°C a vstupní množství DNA templátu bylo 40 ng.

5.3.3 Transfekce recBac DNA do buněk SF9 a izolace celkové DNA

RecBac DNA byla transfekována do buněk SF9 bakulovirového expresního systému. Po čtyřdenní inkubaci buněk při 27°C byly na buňkách SF9 patrné viditelné změny značící úspěšnou transfekci (konkrétní data nepřiložena, nicméně obr. 11, str. 51 zobrazuje stejné změny, které byly pozorovány). Buňky SF9 byly větší, konfluentní a obsahovaly zvětšená jádra. Některé buňky SF9 se zvětšenými jádry nebyly tolik vázány k povrchu kultivační misky. Po sklizení transfekovaných buněk SF9 byla z jejich peletů izolována celková DNA, zatímco médium obsahující recBacV bylo využito pro infekci jiných buněk SF9. Byla provedena PCR reakce s využitím stejných primerů jako v kap. 5.3.2 a s použitím celkové DNA izolované z peletů buněk SF9 jako templátu. PCR reakce byla prováděna kvůli ověření přítomnosti bakulovirové DNA a produkce rekombinantního bakuloviru v buňkách SF9 bakulovirového expresního systému. I v tomto případě byl výsledek PCR reakce s celkovou DNA obsahující mimo jiné bakulovirovou DNA porovnáván s výsledkem PCR reakce při použití plazmidové DNA jako templátu. PCR reakcí bakulovirové DNA s následnou

vizualizací po gelové elektroforéze byl získán totožný výsledek jako v kapitole 5.3.2 (obr. 9, str. 47). Jednotlivé DNA fragmenty příslušných konstruktů získaných z plazmidové a celkové DNA byly totožné. Z výše uvedeného vyplynulo, že se po transfekci příslušná recBac DNA v buňkách SF9 vyskytuje a může dát vznik recBacV.

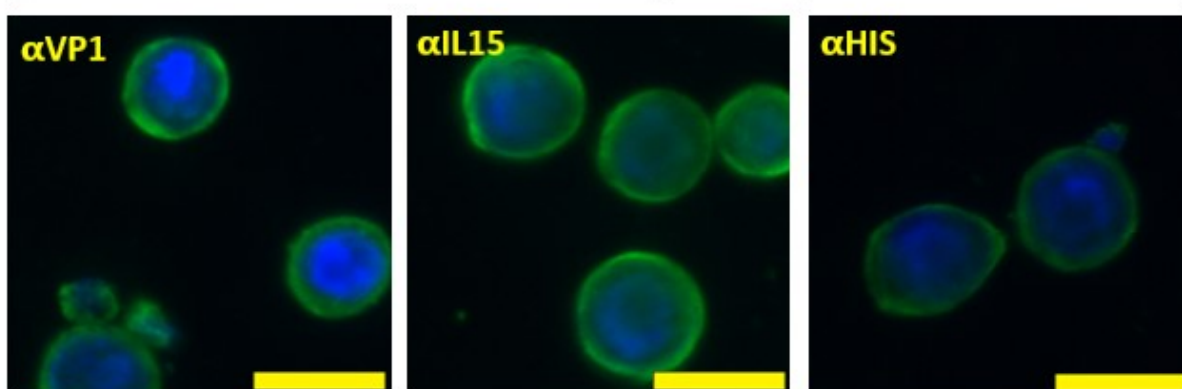
5.3.4 Plaková titrace

Získaná virová inokula recBacV byla charakterizována pomocí plakové titrace. Plakovou titrací byl stanoven titr jednotlivých bakulovirů (tab. 6, str. 58) nutný pro další infekci buněk SF9. U všech recBacV, s výjimkou recBacV VP1-IL15-HIS, se podařilo po infekci vizualizovat velké množství plaků a titr byl stanoven. U recBacV VP1-IL15-HIS nebylo možné ani po opakovaných pokusech (reizolace recBac DNA, opakované transfekce) určit titr, protože v žádném ředění nebyly nikdy vizualizovány virové plaky.

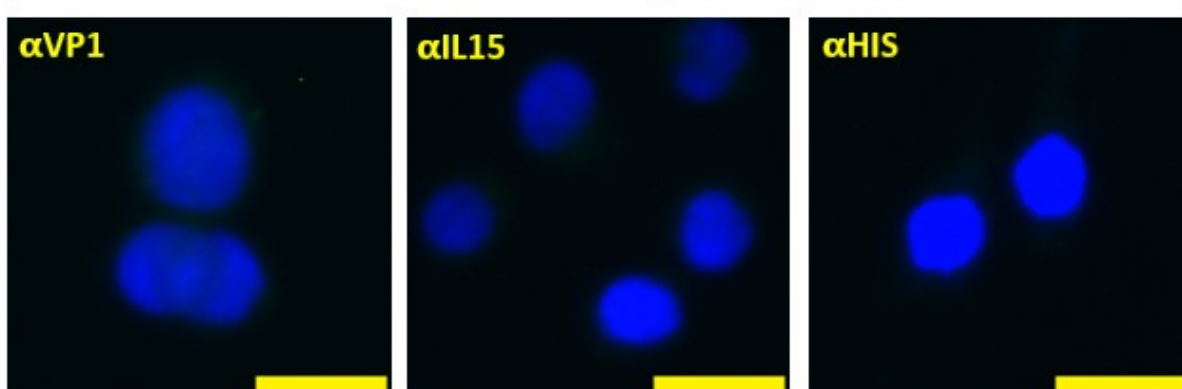
5.3.5 Imunofluorescence recBacV infikovaných SF9 buněk

Z důvodu absence plaků u konstruktů VP1-IL15-HIS a nemožnosti určit jeho titr byla provedena imunofluorescence recBacV infikovaných SF9 buněk. Tímto způsobem bylo zjištěno, zda dochází k produkci příslušných rekombinantních proteinů kódovaných recBacV v buňkách SF9 s možností kontroly produkce v různých pasážích virového inokula. Buňky byly v triplicátech infikovány každým z konstruktů a po 48 hodinách po infekci fixovány. Detekce vznikajících proteinů byla prováděna pomocí protilátky proti VP1 proteinu, proti IL-15 a proti HIS. Na základě obr. 10 je patrné, že dochází k úspěšné produkci očekávaných rekombinantních proteinů v buňkách SF9 po infekci recBacV VP1 Δ C-IL15-HIS, VP1-HIS, VP1 Δ C-HIS, VP1 Δ C a IL15-HIS. Tento výsledek byl u těchto konstruktů potvrzen ve všech pasážích (značeno „P“), tedy hned po transfekci (P0), po první infekci (P1) a po druhé re-infekci (P2). Naopak konstrukt VP1-IL15-HIS byl takto vizualizován pouze ihned po transfekci, tedy v pasáži P0, zatímco v dalších pasážích detekován nebyl. Lze usuzovat, že všechny plazmidové konstrukty byly úspěšně připraveny a převedeny do podoby recBac DNA a recBacV, protože dochází k jejich vizualizaci ihned v P0. Na druhou stranu je zde patrný problém s konstruktem VP1-IL15-HIS (který nebyl nijak upravován), neboť rekombinantní proteiny lze detekovat pouze v pasáži P0, zatímco v dalších pasážích nikoliv. Z uvedeného vyplývá, že po transfekci recBac DNA (provedena opakovaně po re-izolaci recBac DNA z DH10Bac) pravděpodobně z nějakého důvodu nedochází ke vzniku infekčního recBacV VP1-IL15-HIS. Momentálně nejsme schopni určit, z jakého důvodu dochází v tomto případě k takovéto restrikci při produkci virového potomstva.

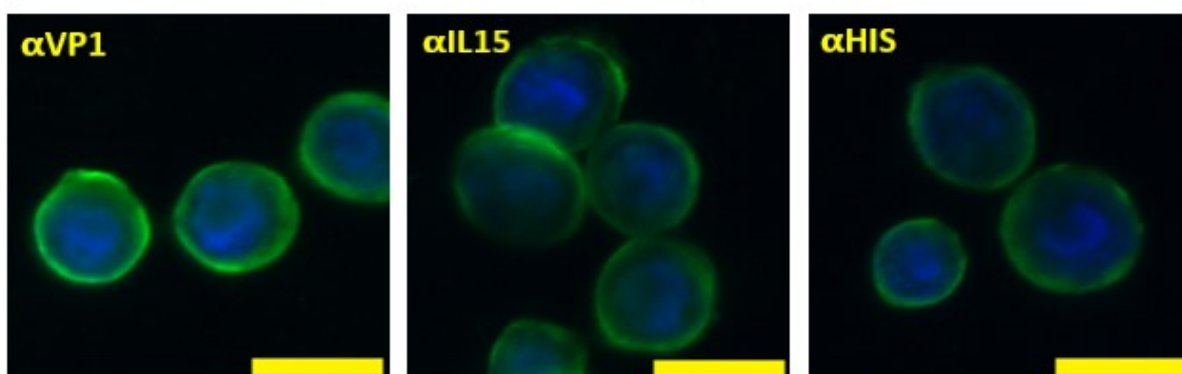
VP1-IL15-HIS (pasáž P0)



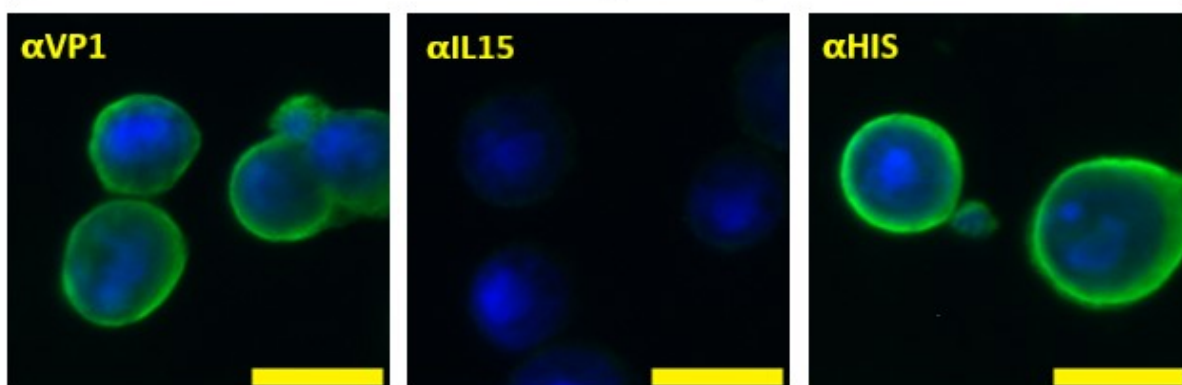
VP1-IL15-HIS (pasáž P1)

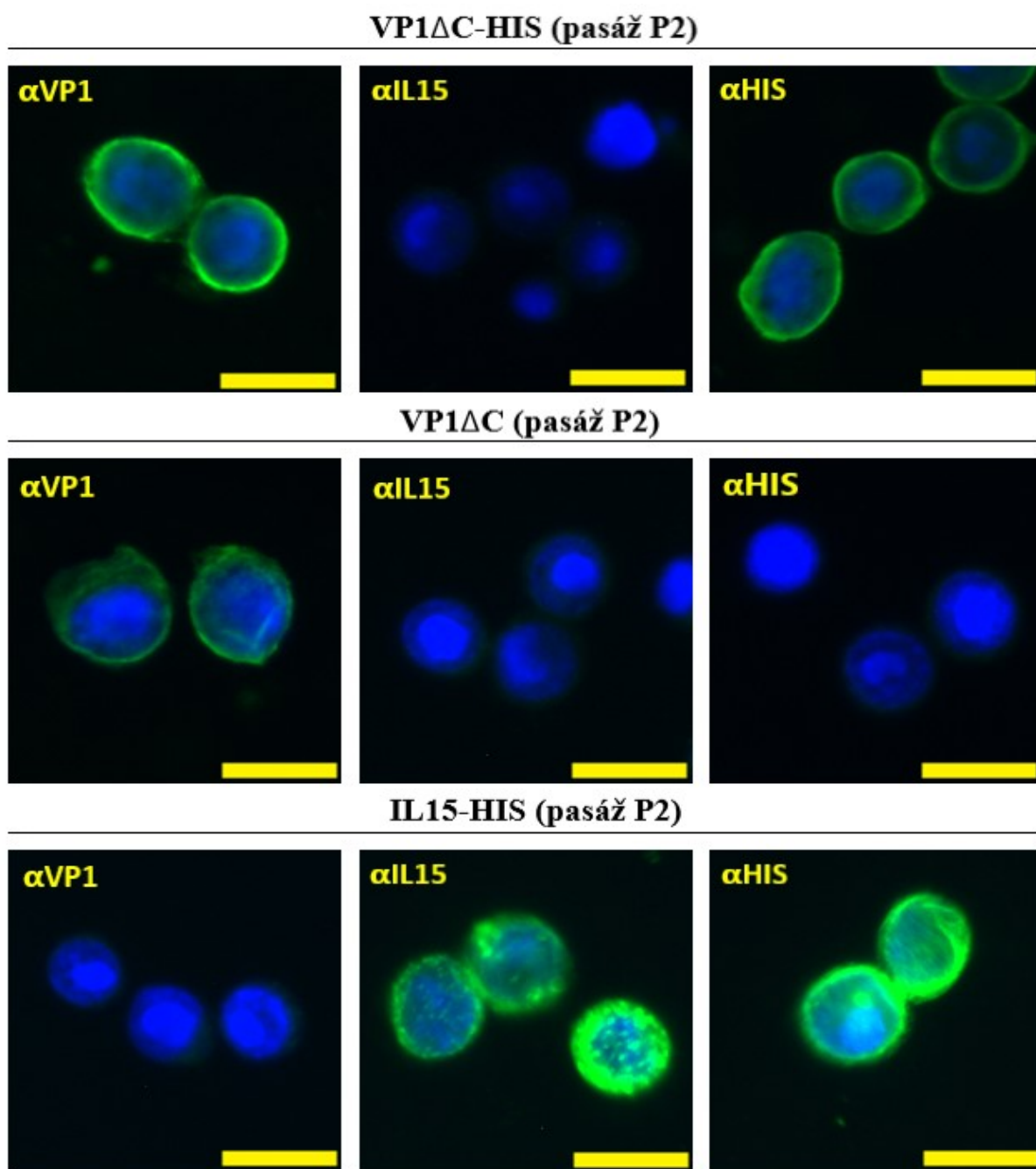


VP1 Δ C-IL15-HIS (pasáž P2)



VP1-HIS (pasáž P2)



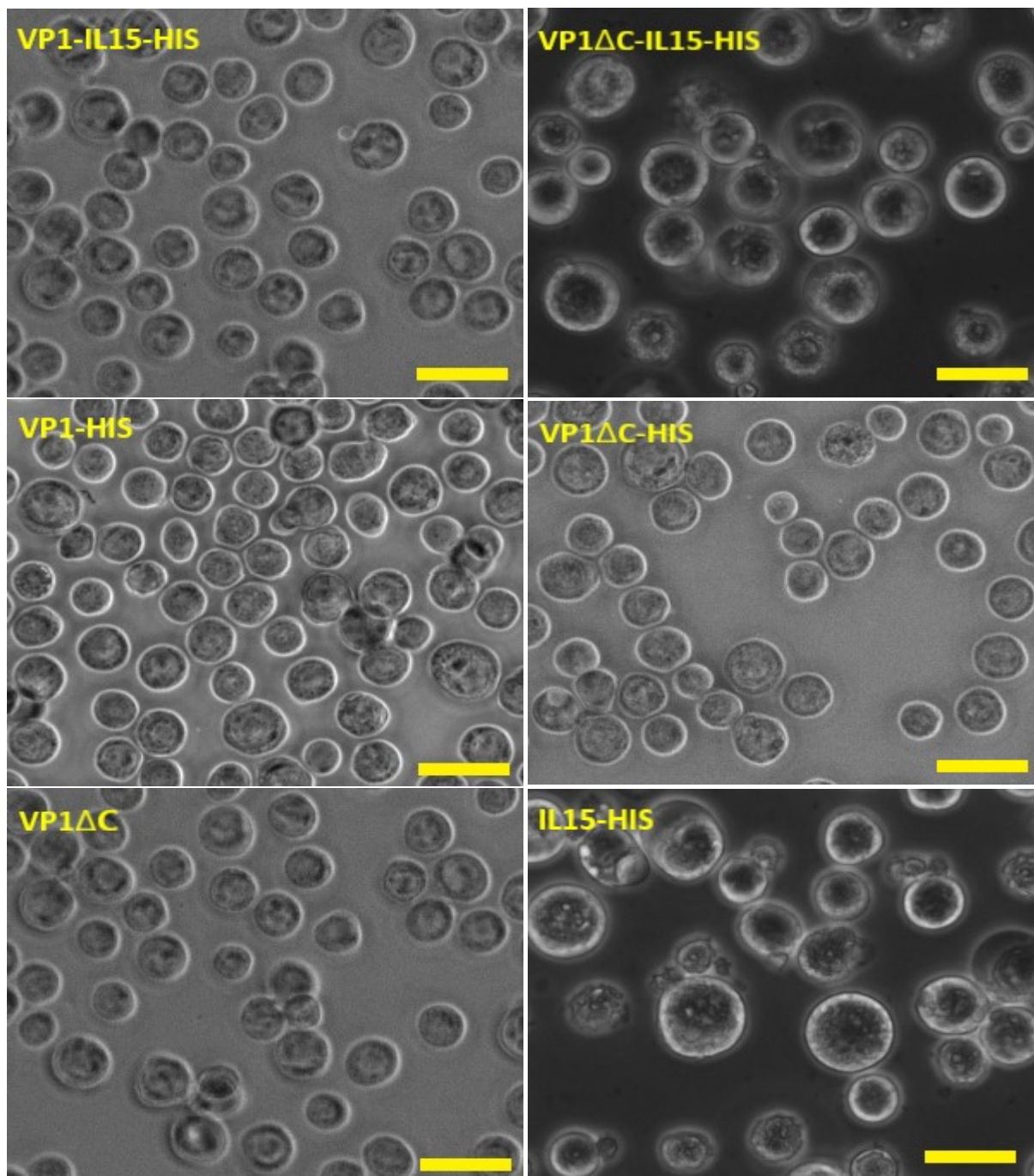


Obr. 10 – Detekce produkce rekombinantních proteinů v buňkách SF9 imunofluorescencí. Buňky SF9 byly infikovány v triplicátech všemi variantami recBacV v různých pasážích a 48 hodin po infekci fixovány. Rekombinantní proteiny vznikající v buňkách byly detekovány s použitím protilátky proti VP1 proteinu (α VP1), IL-15 (α IL15) a histidinové kotvě (α HIS); zelený signál. Jádra buněk byla značena DAPI (modrý signál). Žlutá úsečka odpovídá velikosti 20 μ m.

5.3.6 Infekce buněk SF9

Médium získané ze sklizených buněk SF9 po transfekci bylo použito pro následné infekce. V pasáži P1 byla provedena infekce na Petriho miskách \varnothing 10 cm a v pasáži P2 byla provedena infekce na Petriho miskách \varnothing 15 cm (obě infekce probíhaly s MOI 10 pfu/buňku) ze kterých byla provedena finální izolace proteinů. Plně infikované SF9 buňky byly izolované

po čtyřdenní inkubaci po infekci při 27°C. Stejně jako v případě transfekce, i zde buňky vykazovaly patrné změny odpovídající jejich úspěšné infekci (obr. 11). Infikované buňky byly rovněž větší, konfluentní a obsahovaly zvětšená jádra. Zajímavá byla infekce recBacV konstruktů IL15-HIS, u kterého byly pozorovány plně infikované buňky již po třech dnech po infekci. Zároveň u tohoto konstruktů byly buňky větší a měly více zvětšená jádra než u ostatních recBacV konstruktů. Podobné změny byly pozorovány i po infekci recBacV VP1 Δ C-IL15-HIS.



Obr. 11 – Buňky SF9 infikované v pasáži P1 recBacV VP1-IL15-HIS, VP1 Δ C-IL15-HIS, VP1-HIS, VP1 Δ C, VP1 Δ C-HIS a IL15-HIS. Žlutá úsečka odpovídá velikosti 20 μ m.

5.4 Izolace proteinů

5.4.1 Izolace proteinů VP1-HIS, VP1ΔC-HIS a VP1Δ

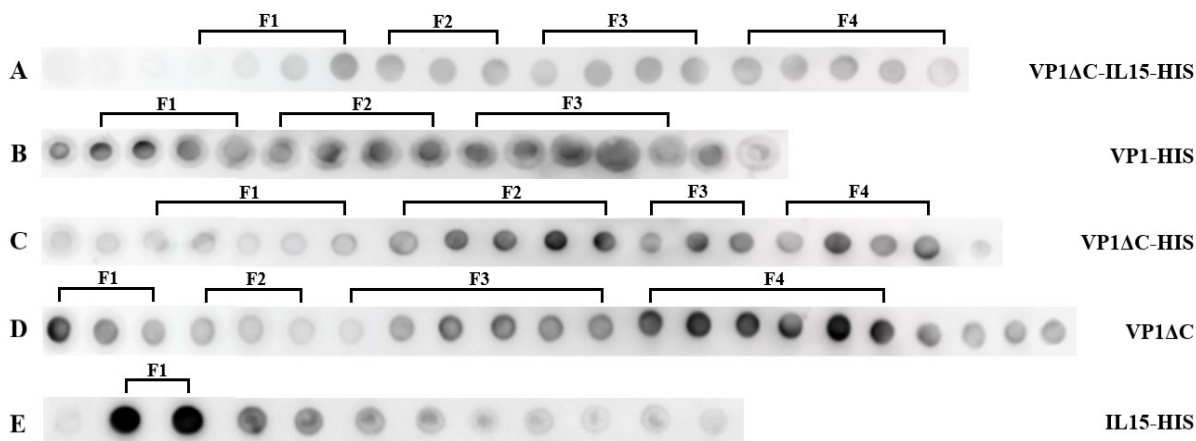
Virové nanostruktury kódované konstrukty VP1-HIS, VP1ΔC-HIS a VP1ΔC byly izolovány podle zavedeného protokolu (viz kapitola 4.2.5.3). Infikované buňky byly lyzovány sonikací a VNS byly purifikovány izopyknickou ultracentrifugací v gradientu CsCl. Jednotlivé subfrakce gradientu byly analyzovány a na základě refraktometrického stanovení indexů lomu (tab. 5) a reaktivity s protilátkami anti-VP1, anti-IL-15 a anti-His (imunodot blot) analýzy (obr. 12, str. 53) byly sloučeny do frakcí F1 až F4. Tyto frakce byly dialyzovány a bylo provedeno koncentrování proteinů přes sacharózový polštář. Celkový výtěžek jednotlivých frakcí těchto vzorků po koncentrování byl u vzorku VP1-HIS v řádech miligramů, zatímco u vzorků VP1ΔC-HIS a VP1ΔC byla v řádech stovek nanogramů. Z tohoto důvodu bylo po dialýze u dalších izolací vynecháno koncentrování přes sacharózový polštář kvůli zamezení ztrátám proteinů.

5.4.2 Izolace proteinů VP1ΔC-IL15-HIS

Konstrukt VP1ΔC-IL15-HIS byl izolován metodou buněčné lýze a vysolením (viz kapitola 4.2.5.2) s následnou ultracentrifugací v CsCl gradientu. Gradient byl rozebrán na jednotlivé subfrakce, a i v tomto případě bylo provedeno refraktometrické stanovení indexu lomu (tab. 5) a imunodot blot analýza (obr. 12, str. 53). Subfrakce byly sloučeny do frakcí F1 až F4, které byly dále dialyzovány. V tomto případě nebylo provedeno koncentrování proteinů přes sacharózový polštář z důvodu zamezení ztrát vzniklých při tomto koncentrování, jako tomu bylo při izolaci proteinových konstruktů VP1-HIS, VP1ΔC-HIS a VP1ΔC. Nabohacení proteinů mohlo být provedeno kdykoliv v dalším průběhu práce v případě potřeby. Celkový výtěžek jednotlivých frakcí VP1ΔC-IL15-HIS byl v řádech miligramů.

Tab. 5 – Refraktometrické indexy jednotlivých frakcí všech vzorků. U všech konstruktů kromě IL15-HIS bylo provedeno refraktometrické stanovení proteinů

	F1	F2	F3	F4
VP1ΔC-IL15-HIS	1,368 – 1,364	1,363 – 1,362	1,361 – 1,360	1,359 – 1,354
VP1-HIS	1,371 – 1,366	1,365 – 1,364	1,363 – 1,360	-
VP1ΔC-HIS	1,372 – 1,367	1,366 – 1,365	1,365 – 1,364	1,363 – 1,360
VP1ΔC	1,377 – 1,374	1,372 – 1,369	1,368 – 1,366	1,365 – 1,359



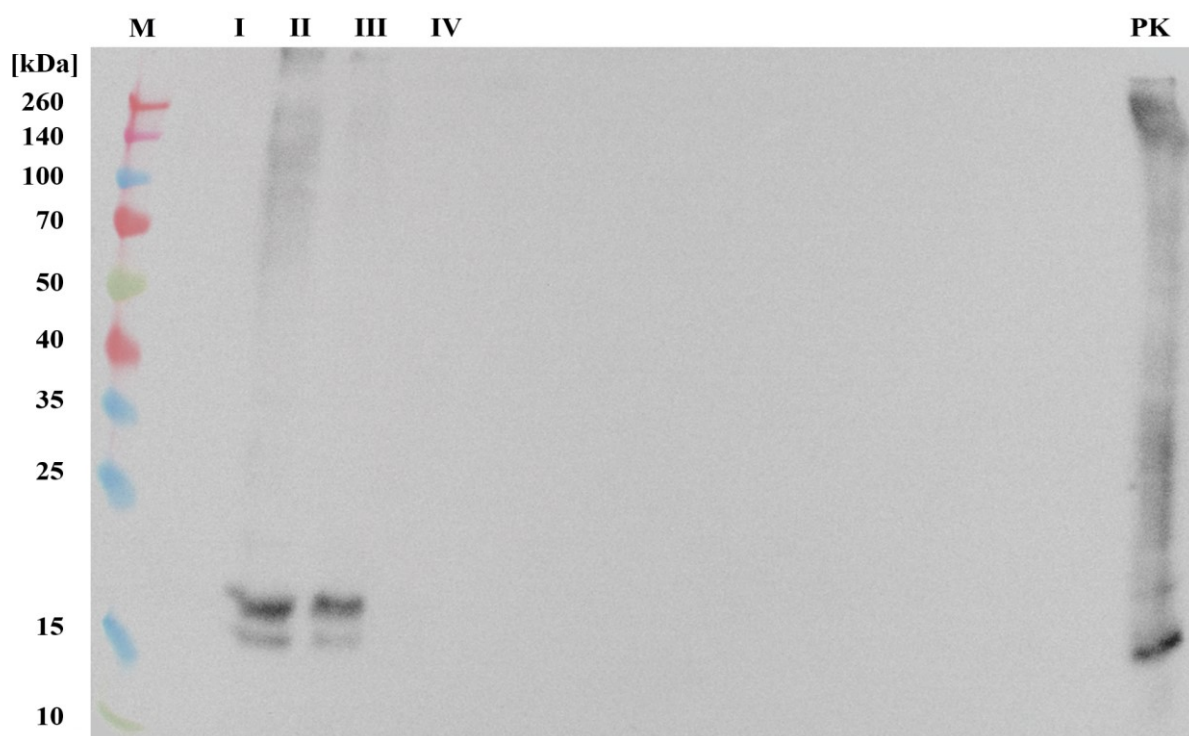
Obr. 12 – Zastoupení jednotlivých proteinů v subfrakcích získaných při purifikaci proteinů. U obr. 12A – D se jedná o subfrakce získané při purifikaci v gradientu CsCl, které byly detekovány protilátkou proti VP1 proteinu, u obr. 12E se jedná o frakce získané purifikací pomocí HisTrap FF kolony, kde byl v subfrakcích produkt detekován protilátkou proti IL-15. Subfrakce byly sloučeny do frakcí F1 až F4 na základě intenzity signálu (odpovídá množství proteinu). Jednotlivé frakce byly dále charakterizovány.

5.4.3 Izolace proteinu IL15-HIS

Vzorek IL15-HIS obsahující IL-15 protein byl izolován pomocí HisTrap FF kolony určené pro izolaci proteinů přes HIS. Po aplikaci vzorku na kolonku a jejím dvojitým promytí promývacím roztokem byl protein několikrát eluován jedním mL elučního roztoku. Pro prvotní ověření úspěšné izolace IL15-HIS proteinu byla provedena imunodot blot analýza (obr. 12E). Vizualizované proteiny byly detekovány anti-IL15 a anti-HIS protilátkami. Obě imunodot blot analýzy různými protilátkami vypadaly identicky, proto je uveden pouze výsledek pro anti-IL15 analýzu. Byla provedena SDS-PAGE elektroforéza s následnou imunodetekcí proteinů na membráně po Western blotu z důvodu další kontroly úspěšné izolace IL15-HIS a detekce konkrétních subfrakcí obsahující IL15-HIS s předpokládanou molekulovou hmotností (MW) 15,7 kDa, odhadnutou na základě genové sekvence v programu protein molecular weight (bioinformatics.org). Z obr. 13 (str. 54) je patrné, že tento proteinový konstrukt se vyskytuje pouze v subfrakci po druhé a třetí eluci. Tyto dvě subfrakce byly sloučeny dohromady a označeny jako frakce F1.

Byla provedena dialýza frakce F1 standardním postupem popsáním v kapitole 4.2.5.6, při druhé izolaci provedena dialýza frakce F1 pomocí dialyzační kazety Slide-A-Lyzer. Stanovená koncentrace frakce F1 dosahovala 0,203 mg/mL při první izolaci a 0,126 mg/mL při druhé izolaci.

Všechny izolace vzorku IL15-HIS poskytly stejný výsledek, tedy úspěšně připravený a izolovaný IL-15 protein v relativně vysoké koncentraci, který se nachází v suspenzi po druhé a třetí eluci, souhrnně označené jako frakce F1.



Obr. 13 – Imunodetekce proteinového konstruktů IL15-HIS. Membrána byla vyvolána protilátkou proti IL-15. Protein se vykazuje pouze ve vzorku po eluci II a III. Tyto dvě subfrakce byly spojeny a označeny jako frakce F1. Jako pozitivní kontrola (PK) byl použit vzorek obsahující lyzát z buněk infikovaných *recBacV IL15-HIS*.

5.5 Charakterizace částic

Proteinové frakce jednotlivých konstruktů byly nejprve charakterizovány elektroforetickou separací v polyakrylamidovém gelu a imunodetekcí proteinů na membráně po Western blotu. Tyto frakce byly rovněž vizualizovány elektronovou mikroskopií. Pro testování dalších vlastností a schopností ovlivnit proliferaci buněk byly využity pouze nejvhodnější frakce od každého konstruktů.

5.5.1 Elektroforetická separace proteinů v polyakrylamidovém gelu

Proteinové vzorky jednotlivých konstruktů byly elektroforeticky separovány v 10% polyakrylamidovém gelu s následným obarvením po přenosu proteinů (obr. 14) na membránu metodou Western Blot (obr. 15, obr. 16 a obr. 17). Na základě obr. 14 je patrné, že většina frakcí všech konstruktů obsahuje určité množství proteinů. Předpokládané MW proteinových konstruktů byly odhadnuty na základě příslušné genové sekvence.

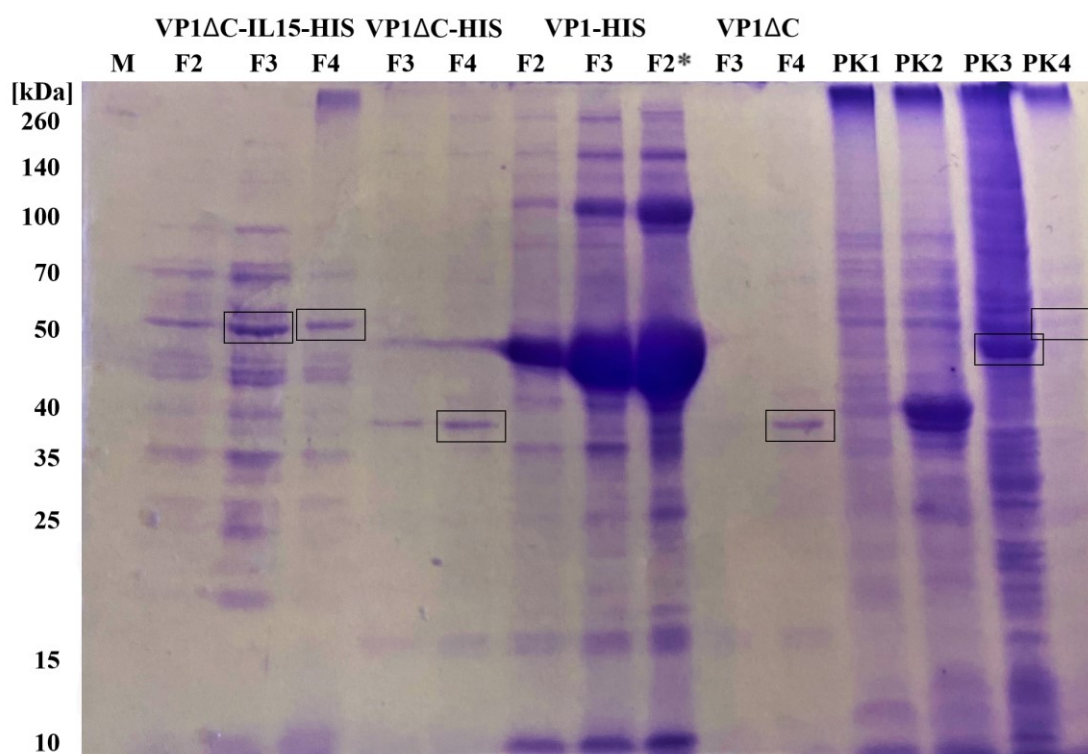
Proteinový produkt konstruktů VP1 Δ C-IL15-HIS s předpokládanou MW 51,6 kDa byl detekován obtížně. Okolo MW 50 kDa je na gelu viditelný protein, který velikostí odpovídá námi předpokládané MW konstruktů. Tyto proteiny ve frakcích F2 – F4 rovněž odpovídají vzorku PK4 (vzorek připravený z lyzátu buněk infikovaných *recBacV VP1 Δ C-IL15-HIS* s ověřenou produkcí proteinu), který byl použit jako pozitivní kontrola. Na obrázku jsou také

viditelné i další nespecifické proteiny u tohoto konstruktů. Může se jednat o různě zkrácené verze nebo o buněčné proteiny.

Nespecifické proteiny jsou přítomny i v jednotlivých frakcích u konstruktů VP1-HIS. V jednotlivých frakcích je nicméně vidět velmi silný proužek okolo MW 42,5 kDa typický pro VP1 protein. Fúzovaný VP1 s HIS má ale předpokládanou MW 43,4 kDa, čemuž pravděpodobně odpovídá daný fragment. Frakce F2, F3 a F2* byly izolovány metodou sonikace, nicméně frakce F2 a F3 nebyly na rozdíl od F2* koncentrovány přes sacharózový polštář.

Lze se domnívat, že byla provedena úspěšná izolace konstruktů VP1ΔC-HIS s MW 36,7 kDa a VP1ΔC s MW 35,9 kDa. U obou těchto proteinových konstruktů je viditelný pouze silný protein, který odpovídá předpokládané MW velikosti připravených konstruktů.

Na základě vizualizace jednotlivých fragmentů a jejich porovnání s předpokládanou MW se lze domnívat, že u některých proteinových konstruktů byla provedena jejich úspěšná izolace. Definitivní potvrzení bylo provedeno imunodetekcí proteinů na membráně.



Obr. 14 – Vizualizované konstrukty po elektroforetické separaci. Pro každý konstrukt byly vybrány frakce s vhodnou koncentrací proteinů. Konstrukt VP1ΔC-IL15-HIS by měl být veliký 51,6 kDa, VP1ΔC-HIS 36,7 kDa, VP1-HIS 43,4 kDa a VP1ΔC 35,9 kDa. Jako pozitivní kontrola byly využity testované lyzáty buněk infikované jednotlivými recBacV konstrukty. PK1 je lyzát infikovaný recBacV IL15-HIS, PK2 je lyzát infikovaný recBacV VP1ΔC-HIS, PK3 je lyzát infikovaný recBacV VP1-HIS a PK4 je lyzát infikovaný recBacV VP1ΔC-IL15-HIS. Na základě stanovené koncentrace byly pro každý proteinový konstrukt nanášeny 3 μg vzorků. Předpokládané proteiny mého zájmu některých konstruktů a kontrol jsou ohraničeny černě.

5.5.2 Imunodetekce proteinů na membráně

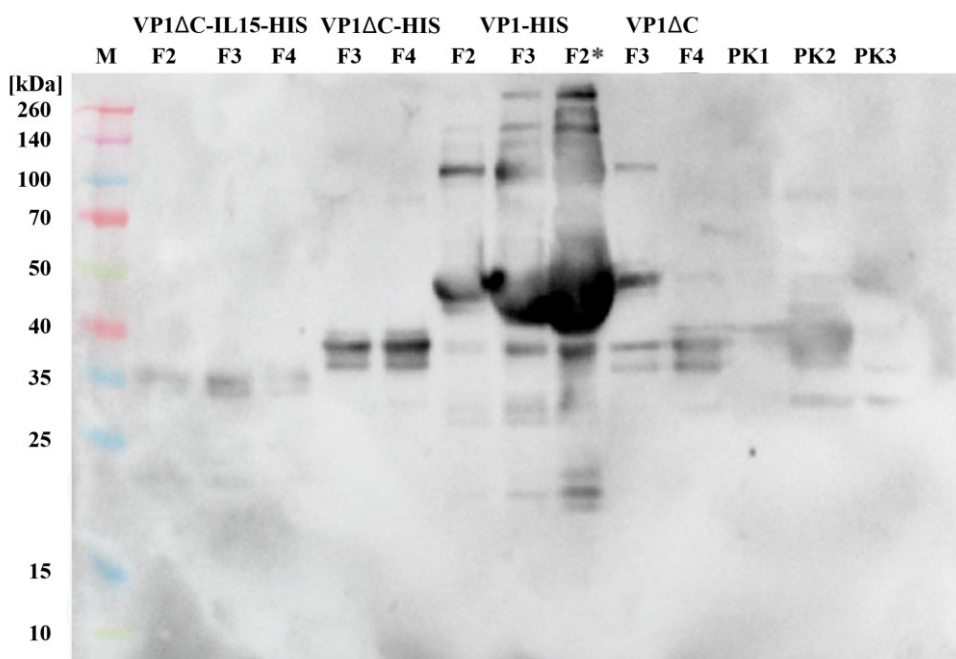
Z důvodu potvrzení úspěšné izolace konstruktů VP1 Δ C-IL15-HIS, VP1-HIS, VP1 Δ C-HIS a VP1 Δ C a jejich charakterizace byla provedena imunodetekce protilátkami proti VP1 proteinu (obr. 15), HIS (obr. 16) a IL-15 (obr. 17). Je nutné zmínit, že protilátka anti-VP1 MPyV vhodná pro imunodetekci proteinů po Western blotu nedetekuje VP1 protein bez C-konce. Z tohoto důvodu byla použita protilátka anti-SV40 VP1, která ale také pravděpodobně nedetekuje tento protein s takovou afinitou jako plnodělkové VP1.

Imunodetekce protilátkami proti VP1 a proti HIS potvrdila, že konstrukt VP1-HIS byl úspěšně izolován. Na obr. 15 je vidět ve všech frakcích velmi silný signál pro tento proteinový konstrukt, který odpovídá předpokládané MW 43,4 kDa. Tento protein je patrný i na obr. 16, který potvrzuje úspěšnou fúzi VP1 proteinu s HIS.

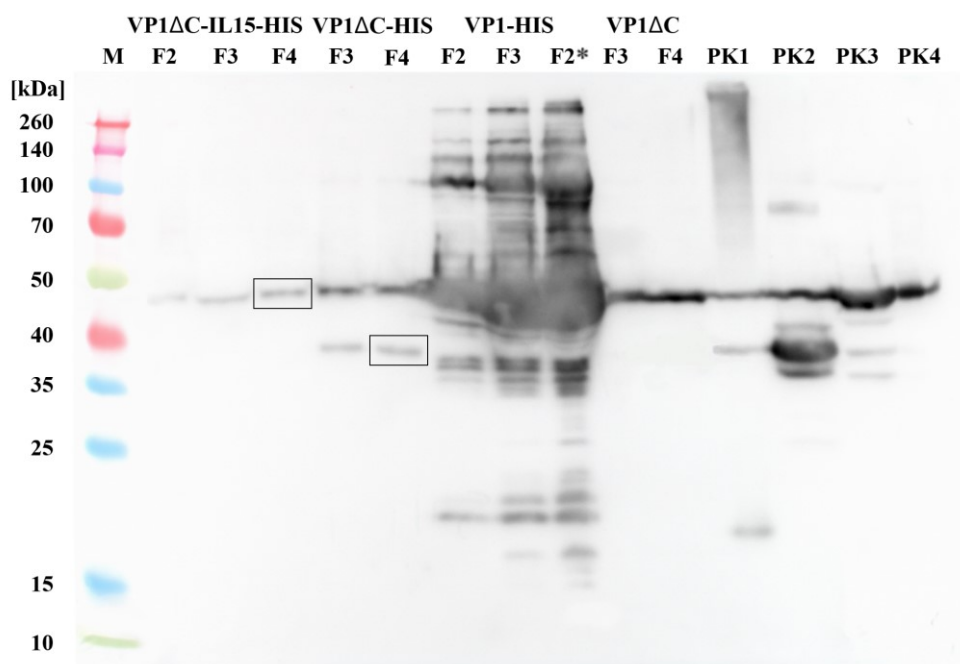
Také lze konstatovat, že byla provedena úspěšná izolace proteinového konstruktu VP1 Δ C-HIS. Pro tento protein s předpokládanou MW 36,7 kDa je viditelný jasný signál na obr. 15 v obou frakcích F3 a F4. V případě obr. 16 je i zde tento signál viditelný, nicméně s nižší intenzitou. Předpokládáme, že byla rovněž provedena úspěšná izolace proteinového konstruktu VP1 Δ C. Obr. 15 zobrazuje signál okolo 35 kDa, který odpovídá předpokládané MW 35,9 kDa. Nespecifické signály na obr. 16 u frakcí F3 a F4 tohoto proteinu jsou následkem přelítí materiálu (VP1-HIS) do sousedních jamek. Stejný problém je pravděpodobně patrný i ve frakcích F3 a F4 VP1 Δ C-HIS a i ve vzorku kontrol PK1 a PK2.

Posledním charakterizovaným byl proteinový konstrukt VP1 Δ C-IL15-HIS s MW 51,6 kDa. Na obr. 15 není viditelný žádný signál odpovídající této velikosti. Je zde vidět pouze signál okolo 35 kDa, který by mohl odpovídat degradačním produktům proteinu. Na druhou stranu na obr. 16 je ve všech frakcích patrný signál okolo 50 kDa, který by mohl odpovídat MW daného konstrukt. Definitivní potvrzení úspěšné izolace VP1 Δ C-IL15-HIS je patrné na obr. 17. Pouze ve frakci F4 je zde vidět slabý signál okolo MW 50 kDa, které pravděpodobně odpovídá proteinovému konstruktu VP1 Δ C-IL15-HIS. Po srovnání s PK4 (buněčný pelet VP1 Δ C-IL15-HIS) je patrné, že se jedná o cílový produkt. Na obr. 17 je také patrný fragment okolo 15 kDa, který odpovídá samotnému proteinu IL-15.

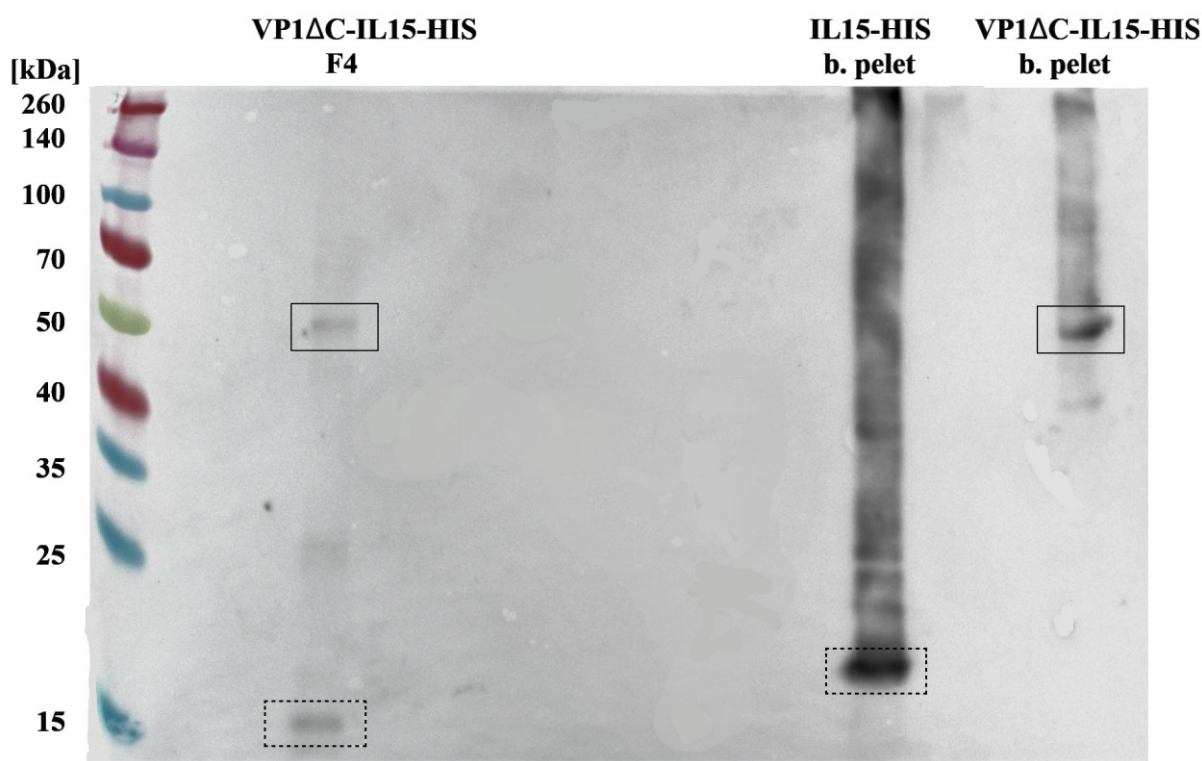
Po porovnání gelu na obr. 14 po elektroforetické separaci s obr. 15, 16 a 17 po imunodetekci proteinů různými protilátkami tedy lze shrnout, že se podařilo úspěšně izolovat a charakterizovat všechny připravené proteinové konstrukty VP1 Δ C-IL15-HIS, VP1-HIS, VP1 Δ C-HIS a VP1 Δ C. S výjimkou proteinu VP1-HIS a VP1 Δ C-IL15-HIS byly však celkové výtěžky izolací nízké (tab. 6, str. 58).



Obr. 15 – Membrána po detekci proteinu protilátkou anti-SV40 VP1. Předpokládaná MW pro VP1ΔC-IL15-HIS je 51,6 kDa, pro VP1ΔC-HIS 36,7 kDa, pro VP1-HIS 43,4 kDa, pro VP1ΔC 35,9 kDa. Jako pozitivní kontrola byly využity testované lyzáty buněk infikované jednotlivými recBacV konstrukty. PK1 je lyzát infikovaný recBacV IL15-HIS, PK2 je lyzát infikovaný recBacV VP1ΔC-HIS, PK3 je lyzát infikovaný recBacV VP1-HIS a PK4 je lyzát infikovaný recBacV VP1ΔC-IL15-HIS. Na základě stanovené koncentrace byly pro každý proteinový konstrukt naneseny 3 μg vzorků.



Obr. 16 – Obr. 15 – Membrána po detekci protilátkou proti HIS. Předpokládaná MW pro VP1ΔC-IL15-HIS je 51,6 kDa, pro VP1ΔC-HIS 36,7 kDa, pro VP1-HIS 43,4 kDa, pro VP1ΔC 35,9 kDa. Jako pozitivní kontrola byly využity testované lyzáty buněk infikované jednotlivými recBacV konstrukty. PK1 je lyzát infikovaný recBacV IL15-HIS, PK2 je lyzát infikovaný recBacV VP1ΔC-HIS, PK3 je lyzát infikovaný recBacV VP1-HIS a PK4 je lyzát infikovaný recBacV VP1ΔC-IL15-HIS. Na základě stanovené koncentrace byly pro každý proteinový konstrukt naneseny 3 μg vzorků. Předpokládané proteiny mého zájmu některých konstruktů a kontrol jsou černě ohraničeny.



Obr. 17 – Membrána po detekci protilátkou proti IL-15. Frakce F4 konstruktů zobrazuje slabý signál pro protein VP1ΔC-IL15-HIS s předpokládanou MW 51,6 kDa. Jako pozitivní kontrola byly použity buněčné lyzáty IL15-HIS a VP1ΔC-IL15-HIS. Černě označený je protein našeho zájmu v porovnání s PK. Tečkovaně je označen IL-15 v porovnání s PK.

Tab. 6 – Shrnutí dosažených výsledků. Titr [pfu/mL] je uveden pro jednotlivé recBacV konstruktů, koncentrace proteinů [mg/mL] je uvedena pro nejlepší frakce jednotlivých proteinových konstruktů, které byly dále využity pro testování vlastností. Celkový výtěžek po spojení jednotlivých frakcí příslušného proteinového konstruktů je přepočten na milion buněk.

	Koncentrace recBac DNA [ng/μL]	Titr [pfu/mL]	Koncentrace proteinů [mg/mL]	Celkový výtěžek [μg/10 ⁶ buněk]	Celkový výtěžek [mg/L]
VP1-IL15-HIS	359,0	-	-	-	-
VP1ΔC-IL15-HIS	472,7	$8,7 \cdot 10^9$	1,220	25,42	53,38
VP1-HIS	423,4	$1,4 \cdot 10^9$	0,244	13,49	35,06
VP1ΔC-HIS	433,0	$1,3 \cdot 10^9$	0,091	1,65	3,63
VP1ΔC	737,7	$1,5 \cdot 10^9$	0,148	2,91	8,02
IL15-HIS	378,1	$1,6 \cdot 10^9$	0,203	3,68	8,46

5.5.3 Vizualizace VLPs a VNS elektronovou mikroskopií

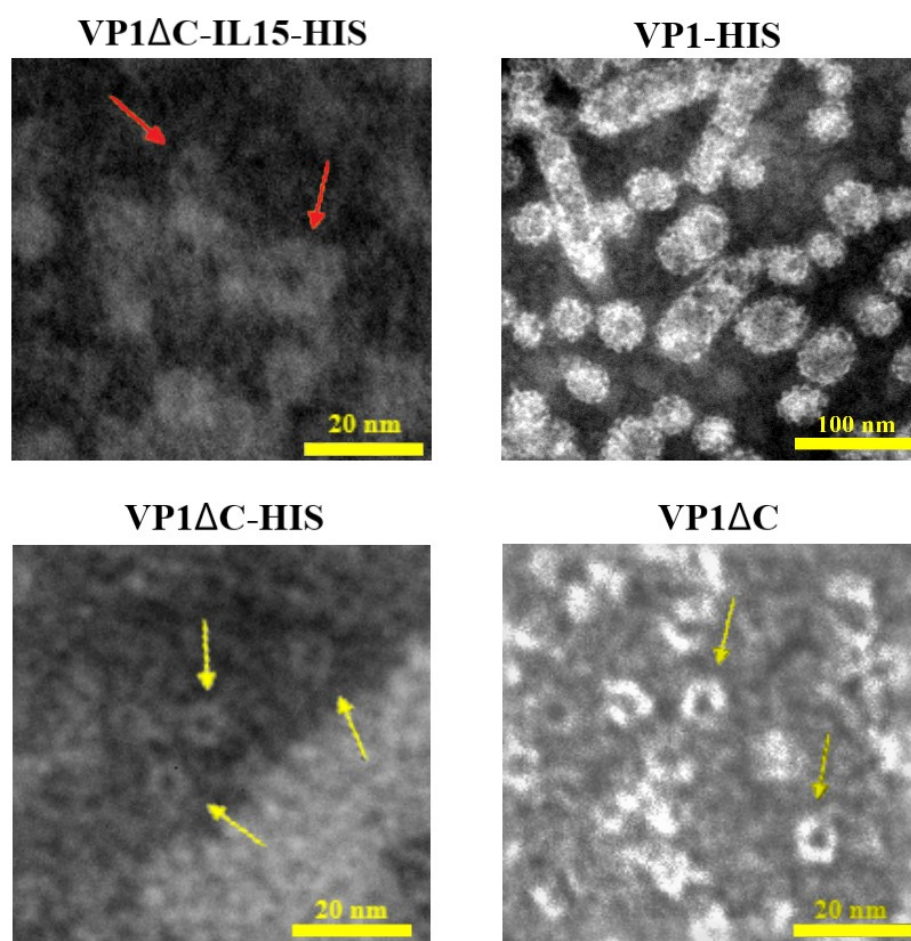
Vhodné frakce jednotlivých VLPs a VNS konstruktů byly vizualizovány elektronovou mikroskopií za účelem detekce proteinů a jejich struktury ve vzorcích (obr. 18).

Podle očekávání, konstrukt VP1-HIS tvořil VLPs podobné virovým částicím. Kromě VLPs rozdílných velikostí byly u tohoto proteinového konstruktu detekovány i tubulární částice tvořené z VP1 proteinu. V porovnání s VLPs tvořenými samotnými VP1 proteiny, mají tyto VLPs s navázaným histidinem mnohem vrásčitější a drsnější povrch.

U konstruktů VP1 Δ C-HIS a VP1 Δ C byly elektronovou mikroskopií vizualizované pouze nanostruktury, tedy samotné virové pentamery.

Konstrukt VP1 Δ C-IL15-HIS tvořil ne zcela typické pentamerní struktury. V tomto případě VP1 Δ C protein fúzovaný s IL15 a histidinem tvořil pravděpodobně agregáty a nanostruktury různých tvarů.

Konstrukt IL15-HIS nebyl na elektronové mikroskopii vizualizován kvůli své malé velikosti.



Obr. 18 – Vizualizace konstruktů elektronovou mikroskopií. Proteinové konstrukty VP1 Δ C-IL15-HIS tvoří nestandardní VNS (červené šipky). VP1 Δ C-HIS a VP1 Δ C tvoří virové pentamery. VP1-HIS tvoří VLPs a tubulární částice. Žluté šipky zobrazují virové pentamery složené z VP1 proteinů.

5.6 Testování vlastností připravených konstruktů

Na základě stanovené koncentrace a výsledků charakterizace popsaných v kapitole 5.5 byly od každého konstruktů vybrány vhodné frakce, které obsahovaly dané proteiny. V případě VP1 Δ C-IL15-HIS se jednalo o frakci F4, IL15-HIS frakci F1, VP1-HIS frakci F2, VP1 Δ C-HIS frakci F4 a VP1 Δ C rovněž frakci F4. U těchto frakcí jednotlivých proteinových konstruktů byla testována schopnost vázat se a interagovat s příslušnými buňkami stejně jako schopnost ovlivnit a indukovat proliferaci konkrétních buněk.

5.6.1 Proliferační zkouška na buňkách Jurkat

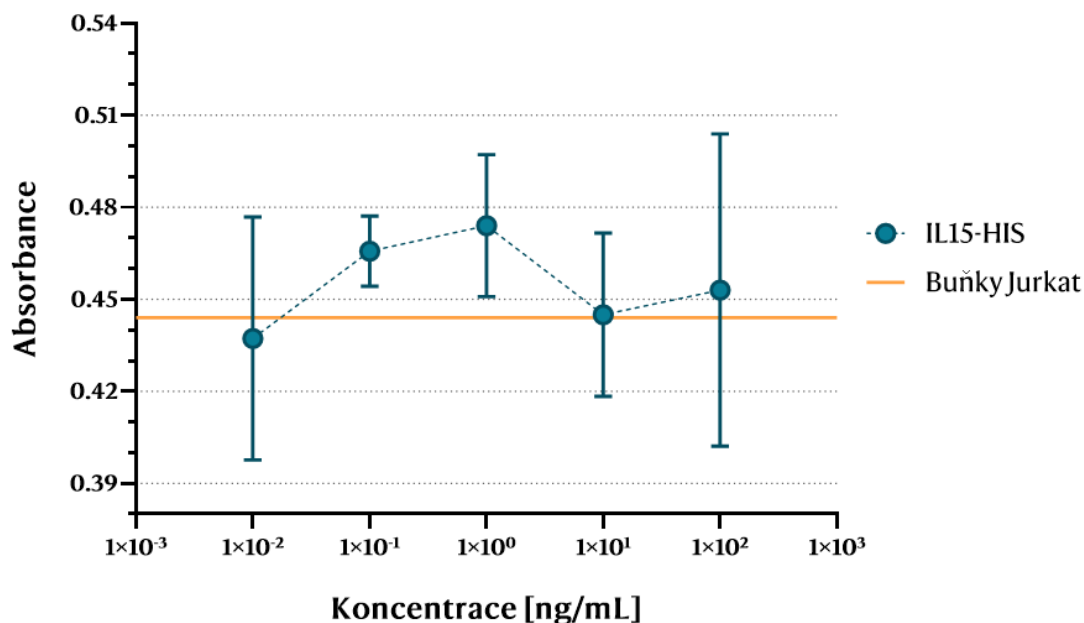
Biologická aktivita připravených proteinových konstruktů byla nejprve testována na buňkách Jurkat, tedy lidských leukemických T-lymfocytech. Tato buněčná linie byla pro naše účely dobře dostupná a společností Cloud-Clone corporation byl proliferační test na Jurkat buňkách používán pro průkaz biologické aktivity rekombinantního lidského IL-15 (Cloud-Clone Corporation, 2016). Buňky, ke kterým byl přidán příslušný proteinový konstrukt, byly inkubovány 72 hodin a poté byly 4 hodiny inkubovány s přidavkem 20 μ L CellTiter roztoku. Absorbance, která odpovídá nárůstu buněk, byla stanovena při vlnové délce $\lambda = 490$ nm.

Byla testována schopnost samotného proteinového konstruktů IL15-HIS indukovat proliferaci T-lymfocytů *in vitro*, tato skutečnost je zobrazena na grafu 1. Z grafu je patrné, že IL15-HIS nijak neovlivňuje proliferaci buněk Jurkat, přestože je zde nepatrný nárůst absorbance u T-lymfocytů po přidání IL15-HIS v koncentraci 1×10^{-2} ng/mL, 1×10^{-1} ng/mL a 1×10^0 ng/mL.

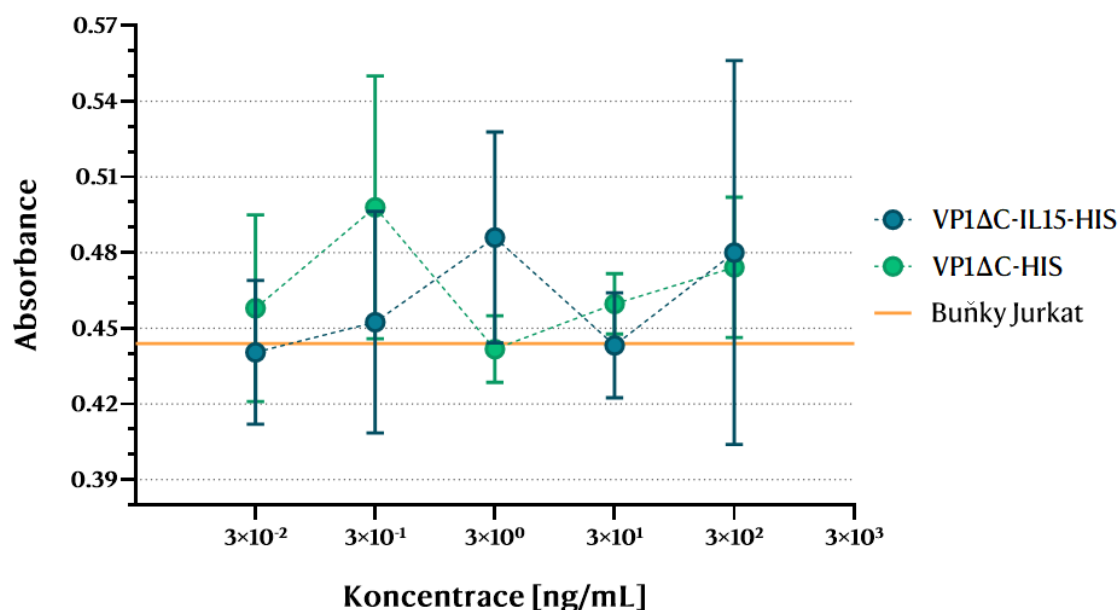
Proliferační zkouška na buňkách Jurkat *in vitro* byla rovněž provedena pro proteinový konstrukt VP1 Δ C-IL15-HIS v porovnání s negativní kontrolou VP1 Δ C-HIS (graf 2, str. 61). Oba proteinové konstrukty byly k T-lymfocytům přidávány v koncentraci 3×10^{-2} ng/mL, 3×10^{-1} ng/mL, 3×10^0 ng/mL, 3×10^1 ng/mL a 3×10^2 ng/mL. Ani v tomto případě nebyla pozorována zvýšená proliferace buněk Jurkat vyvolaná daným proteinovým konstruktem, přestože je i zde vidět nepatrný nárůst absorbance u T-lymfocytů po přidání proteinů v koncentraci 3×10^{-1} ng/mL a 3×10^0 ng/mL (graf 2, str. 60). Navíc, na základě grafu 2, i po přidání proteinového konstruktů VP1 Δ C-HIS je zde nepatrný nárůst absorbance buněk Jurkat.

Lze tedy shrnout, že ani jeden proteinový konstrukt, tedy samotný IL15-HIS a VP1 Δ C-IL15-HIS, žádným způsobem neovlivňuje proliferaci buněk Jurkat *in vitro*.

Graf 1 – Ovlivnění proliferace buněk Jurkat proteinovým konstruktem IL15-HIS. Oranžová přímka reprezentuje proliferační aktivitu buněk, ke kterým nebyl přidán žádný proteinový konstrukt, tedy samotné buňky Jurkat. Modrá křivka reprezentuje proliferační aktivitu buněk, ke kterým byl přidán proteinový konstrukt IL15-HIS. Ten byl přidáván v koncentraci 1×10^{-2} ng/mL, 1×10^{-1} ng/mL, 1×10^0 ng/mL, 1×10^1 ng/mL a 1×10^2 ng/mL. Bylo pracováno v tetraplikátech ($n=4$). Grafy vytvořeny Danielem Žuchou.



Graf 2 - Ovlivnění proliferace buněk Jurkat proteinovým konstruktem VP1ΔC-IL15-HIS. Oranžová přímka reprezentuje proliferační aktivitu buněk, ke kterým nebyl přidán žádný proteinový konstrukt, tedy samotné buňky Jurkat. Modrá křivka reprezentuje proliferační aktivitu buněk, ke kterým byl přidán proteinový konstrukt VP1ΔC-IL15-HIS. Zelená křivka reprezentuje proliferační aktivitu buněk, ke kterým byl přidán proteinový konstrukt VP1ΔC-HIS, který sloužil jako negativní kontrola. Oba proteinové konstrukty byly přidávány v koncentraci 3×10^{-2} ng/mL, 3×10^{-1} ng/mL, 3×10^0 ng/mL, 3×10^1 ng/mL a 3×10^2 ng/mL. Bylo pracováno v tetraplikátech ($n=4$). Grafy vytvořeny Danielem Žuchou.



5.6.2 Proliferační zkouška na buňkách CTLL-2

Druhým typem buněk, na kterých byla testována biologická aktivity připravených proteinových konstruktů, byly myší cytotoxické T-lymfocyty CTLL-2. Na těchto buňkách jsou mnohem častěji testovány vlastnosti různých cytokinů.

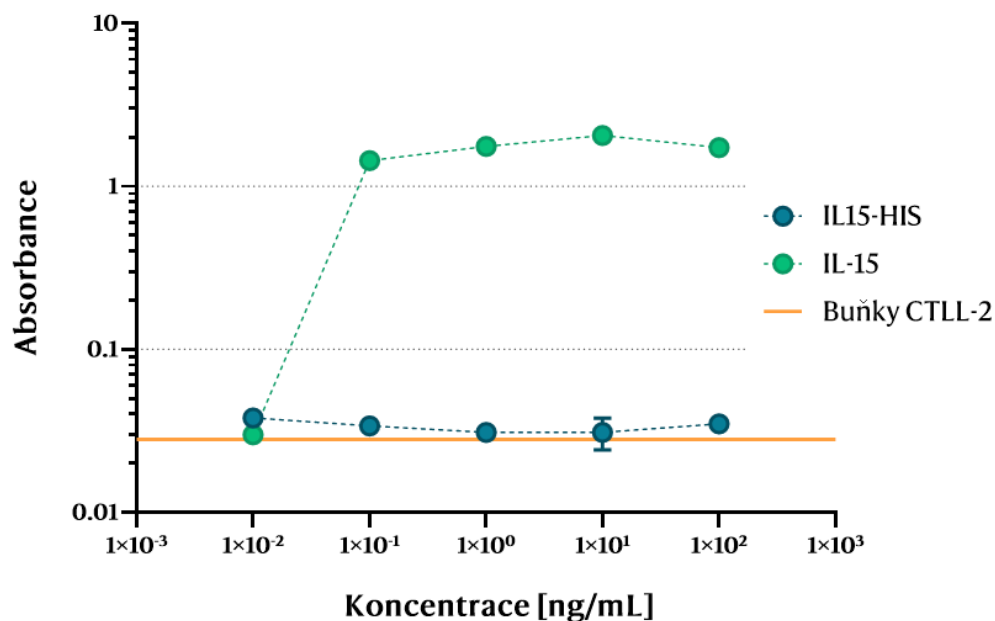
Na základě proliferační zkoušky provedené na buňkách Jurkat byly optimalizovány parametry experimentu pro tuto zkoušku. Zároveň byl jako pozitivní kontrola využit komerční protein IL-15, zda námi vyprodukovaný proteinový konstrukt IL15-HIS je funkční a aktivní. Buňky, ke kterým byly proteiny přidány, byly inkubovány pouze 48 hodin a poté byly 4 hodiny inkubovány s přidavkem 20 μL CellTiter roztoku. Absorbance byla opět stanovena při vlnové délce $\lambda = 490 \text{ nm}$.

Na základě grafu 3 (str. 63) je možné konstatovat, že proteinový konstrukt IL15-HIS není schopný *in vitro* indukovat proliferaci buněk CTLL-2. Přestože je opět pozorován nepatrný nárůst absorbance u buněk CTLL-2 po přidání tohoto proteinu, po porovnání s komerčním proteinem IL-15 námi připravený proteinový konstrukt žádným způsobem neovlivňuje proliferační aktivitu T-buněk.

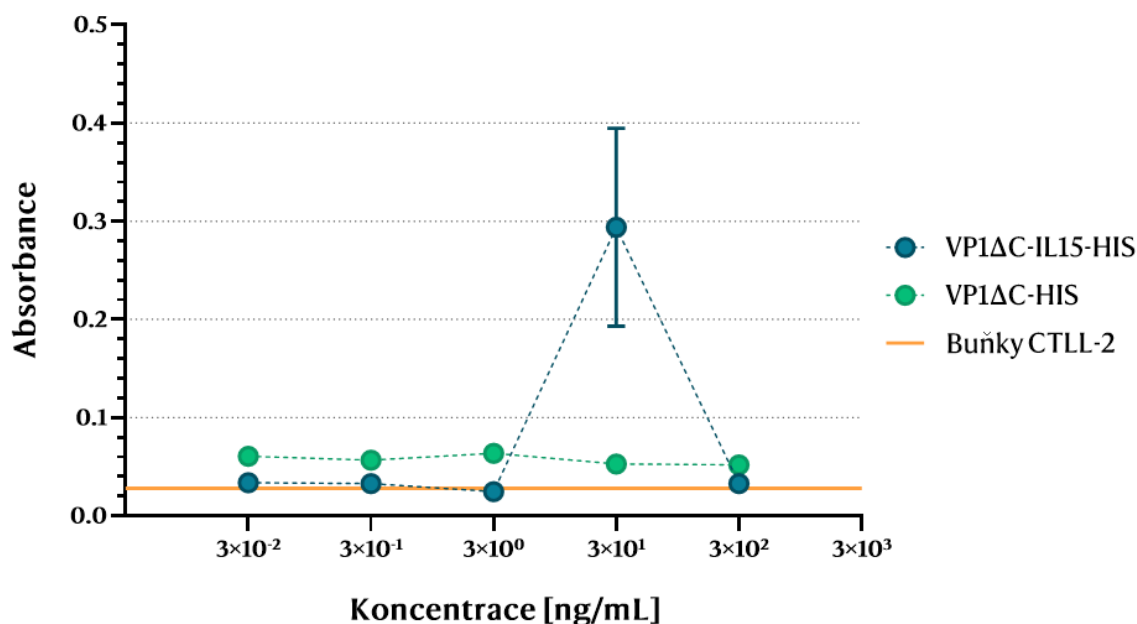
Stejně výsledky lze pozorovat rovněž i u VP1 Δ C-IL15-HIS proteinového konstrukt (graf 4, str. 63). Ani v tomto případě nebyla pozorována žádná významná proliferační aktivita *in vitro* u tohoto proteinu. Přestože je zde patrný nárůst absorbance po přidání proteinu v koncentraci $3 \times 10^1 \text{ ng/mL}$, v porovnání s pozitivní kontrolou (buňky CTLL-2 s přidáním IL-2) jde o malý nárůst. Absorbance pozitivní kontroly dosáhla stejného maxima, jako komerční proteinový IL-15. Také je navíc velmi nepravděpodobné, aby proteinový konstrukt VP1 Δ C-HIS způsobil vyšší absorbanci buněk téměř ve všech koncentracích než proteinový konstrukt obsahující IL-15.

Proliferační experimenty lze tedy shrnout, že námi připravené proteinové konstrukty IL15-HIS a VP1 Δ C-IL15-HIS nijak neovlivňují proliferační aktivitu T-buněk a jsou tedy pravděpodobně nefunkční.

Graf 3 – Ovlivnění proliferace buněk CTLL-2 proteinovým konstruktem IL15-HIS. Oranžová přímka reprezentuje proliferační aktivitu buněk, ke kterým nebyl přidán žádný proteinový konstrukt, tedy samotné buňky CTLL-2. Modrá křivka reprezentuje proliferační aktivitu buněk, ke kterým byl přidán proteinový konstrukt IL15-HIS. Zelená křivka reprezentuje proliferační aktivitu buněk, ke kterým byl přidán komerční protein IL-15, který sloužil jako pozitivní kontrola. Oba proteinové konstrukty byly přidávány v koncentraci 1×10^{-2} ng/mL, 1×10^{-1} ng/mL, 1×10^0 ng/mL a 1×10^1 ng/mL. Bylo pracováno v tetraplikátech ($n=4$). Osa Y je zobrazena v logaritmickém měřítku. Grafy vytvořeny Danielem Žuchou.



Graf 4 - Ovlivnění proliferace buněk CTLL-2 proteinovým konstruktem VP1ΔC-IL15-HIS. Oranžová přímka reprezentuje proliferační aktivitu buněk, ke kterým nebyl přidán žádný proteinový konstrukt, tedy samotné buňky CTLL-2. Modrá křivka reprezentuje proliferační aktivitu buněk, ke kterým byl přidán proteinový konstrukt VP1ΔC-IL15-HIS. Zelená křivka reprezentuje proliferační aktivitu buněk, ke kterým byl přidán proteinový konstrukt VP1ΔC-HIS, který sloužil jako negativní kontrola. Oba proteinové konstrukty byly přidávány v koncentraci 3×10^{-2} ng/mL, 3×10^{-1} ng/mL, 3×10^0 ng/mL, 3×10^1 ng/mL a 3×10^2 ng/mL. Bylo pracováno v tetraplikátech ($n=4$). Osa Y není zobrazena v logaritmickém měřítku. Grafy vytvořeny Danielem Žuchou.



6 Diskuze

V rámci této diplomové práce byly připravovány VNS odvozené od MPyV, z nichž některé měly sloužit jako virové nosiče IL-15, potenciální a terapeuticky velmi zajímavé molekuly pro biologickou léčbu různých, převážně nádorových onemocnění (Cheever, 2008). Na základě předchozích zkušeností v rámci laboratoře a rozvoje využití polyomavirových VLPs jsme se rozhodli pro přípravu těchto nanostruktur. Předpokládali jsme, že vazba IL-15 na C-konec VP1 proteinu MPyV bude IL-15 stabilizovat a prodlouží jeho poločas života. Výhodou MPyV pseudočástic je jejich vysoká stabilita, relativně levná a snadná purifikace v expresním systému a v neposlední řadě schopnost interakce VP1 s vysokým počtem různých buněk a tkání. Zároveň jsme již v rámci laboratoře docílili možnosti modifikovat zacílení VLPs přímo na nádorové buňky (Žáčková Suchanová, 2018). Využití částic a struktur odvozených od MPyV by navíc neměl představovat problém v podobě imunitní odpovědi proti myším virovým strukturám tak jako k tomu může docházet při využití lidských polyomavirů. Domníváme se, že virové nanonosiče potenciálně umožní účinný průnik do nádorové tkáně a zároveň zlepší vlastnosti a zvýší stabilitu IL-15.

Pro tvorbu těchto proteinových nosičů byl využit bakulovirový expresní systém buněk SF9, který je velmi často využíván v rámci laboratoře. Tento systém se prokázal být vhodným nástrojem pro tvorbu nejenom samotného VP1 proteinu odvozeného od MPyV, ale i jeho různě modifikovaných variant. Tímto způsobem lze docílit vysokého výtěžku VP1 proteinů v relativně čistém stavu (Li et al., 2003). Další předností tohoto systému je relativně nízká cena produkovaných proteinů. Pro tvorbu proteinů je nicméně nutná příprava plazmidů vkládaných do bakulovirového donorového vektoru tzv. Fast-Bac1, který je nezbytný pro klonování a produkci rekombinantních bakulovirů.

Cílové plazmidy byly připraveny pouze z jednoho, uměle syntetizovaného konstruktů pFB-VP1-IL15-HIS metodami genového inženýrství. Tento modulární systém umožnil vytvořit cílové plazmidy obsahující různé kombinace různě modifikovaných genů kódující proteiny pro VP1/ VP1 Δ C, IL-15 a HIS. Další předností tohoto modulárního systému je, že v něm byla vhodně navržena další místa pro modifikace restrikčními enzymy. Pokud by například finální proteinové konstrukty ve své funkci omezovala HIS, na úrovni DNA může být relativně snadno z daného plazmidového konstruktů odstraněna v případě, že nebude nutné pro izolaci tuto kotvu použít. Konstrukt však obsahuje i místa pro štěpení TEV proteázou, které dovolí HIS odstranit i po izolaci proteinového produktu. Tento systém tedy umožnil z jediného plazmidu vznik celé palety různých plazmidových konstruktů, které sloužily buď pro produkci samotných nosičů IL-15 či příslušných kontrol.

Připravené plazmidy byly ověřeny restrikčním štěpením v místě původního

restrikčního štěpení s následnou sekvenací plazmidů. Ta definitivně potvrdila, že se úspěšně podařilo připravit požadované plazmidové konstrukty, tedy pFB-VP1-IL15-HIS, pFB-IL15-HIS, pFB-VP1ΔC-IL15-HIS, pFB-VP1-HIS, pFB-VP1ΔC-HIS a pFB-VP1ΔC. Na základě sekvenace bylo potvrzeno, že všechny obsahovaly geny našeho zájmu.

Z plazmidových konstruktů byla následně v systému Bac-to-Bac připravena bakmidová DNA. Podařilo se úspěšně izolovat recBac DNA ze všech konstruktů (obr. 8, str. 46). Velikost této DNA byla očekávána okolo 20 kbp, preparace však obsahovala i kratší DNA, což by mohlo naznačovat, že se podařilo izolovat i plazmidy obsažené v bakteriích DH10Bac, kde probíhala rekombinace. Pro ověření, že každá recBac DNA obsahuje geny našeho zájmu, byla provedena PCR reakce (obr. 9, str. 47).

I po transfekci buněk SF9 bakulovirového expresního systému jednotlivými recBac DNA konstrukty byla izolována celková DNA a přítomnost cílových genů byla opět ověřena pomocí PCR.

Pro stanovení titru jednotlivých bakulovirů a jejich charakterizaci byla provedena plaková titrace, která byla nezbytná pro další infekci buněk SF9. U většiny recBacV se podařilo po infekci vizualizovat velké množství plaků ze kterých byl relativně snadno stanoven titr (tab. 6, str. 58). Výjimkou byl VP1-IL15-HIS recBacV, u kterého se ani po opakovaných pokusech nepodařilo určit titr. U tohoto recBacV nebyly vizualizovány opakovaně žádné plaky ani v případě rozšíření ředící řady testovaného inokula od 10^{-1} – 10^{-12} . Z tohoto důvodu jsme se rozhodli ověřit, zda dochází k produkci proteinových konstruktů kódovaných recBacV v jednotlivých buňkách po infekci pomocí imunofluorescence.

Imunofluorescence byla provedena pro všechny recBacV konstrukty s inokulem v pasáži P2, pro VP1-IL15-HIS navíc pro pasáže P0, P1 a P2. Po 48 hodinách po infekci byly produkty infekce recBacV detekovány protilátkami proti VP1, IL-15 a proti HIS. U všech recBacV, které tvořily plaky, byly detekovány dle našeho očekávání příslušné signály podle toho, zda recBacV obsahuje geny kódující proteiny našeho zájmu. V případě VP1-IL15-HIS byly v pasáži P0 (tedy v inokulu získaném ihned po transfekci buněk SF9) detekovány VP1 proteiny, IL-15 i HIS, nicméně v pasáži P1 a P2 nebyl již vizualizován žádný signál. Momentálně nejsme schopni určit z jakého důvodu nedochází ke vzniku infekčního recBacV VP1-IL15-HIS a dochází k restrikci v pasážích P1 a P2.

Jedním z možných vysvětlení je pravděpodobná mutace během rekombinace, která vedla ke vzniku poškozené recBac DNA. To by znamenalo, že nedochází ke vzniku VP1-IL15-HIS recBacV a že signál pozorovaný při imunofluorescenčním stanovení v pasáži P0 pochází z pFB-VP1-IL15-HIS. Během izolace recBac DNA mohlo dojít rovněž k izolaci

pFB-VP1-IL15-HIS konstrukt, který byl ko-transfekován do buněk SF9 a který pravděpodobně může (při součinnosti s produkty genů produkovaných z částečně nefunkční bakmidové DNA) zajistit nízkou expresi transgenů z polyhedrinového promotoru. pFB-VP1-IL15-HIS pravděpodobně mohly být i templátem při ověření přítomnosti recBac DNA v buňkách SF9 pomocí PCR. Pro opakované transfekce do buněk SF9 byla použita recBac DNA pocházející pouze z jedné bakteriální kolonie.

Druhým možným vysvětlením je, že produkce IL-15 (nebo jeho varianty, která mohla vzniknout mutací v rámci bakteriální kolonie) je spojena s negativním efektem na virovou infekci. Může se jednat například o produkt, který je toxický pro buňky SF9 nebo je restriktivní pro bakulovirus (Jahanian-Najafabadi et al., 2012). Na druhou stranu, ostatní vytvořené recBacV konstrukty jsou dobrou indikací, že v původním plazmidu pFB-VP1-IL15-HIS nejsou poškozené žádné geny – všechny vznikající konstrukty byly sekvenovány a nebyla zjištěna žádná mutace. Expresí proteinů u ostatních konstruktů navíc naznačuje, že polyhedrinový promotor je v pořádku. Podle dostupné literatury nebyly při produkci jiných interleukinů v bakulovirovém expresním systému buněk SF9 pozorovány žádné problémy (de Pinheiro et al., 2016; Mirzaei et al., 2009; Smith et al., 1985).

Nejsnazším řešením pro rozklíčování možností, které vedly k neúspěchu při produkci recBacV VP1-IL15-HIS je opětovná rekombinace pFB-VP1-IL15-HIS do virové DNA. Z buněk DH10Bac bude nutné izolovat recBac DNA, která bude pocházet nejlépe ze dvou odlišných bakteriálních kolonií. Tu následně transfekovat do buněk SF9 a při následné plakové zkoušce ověřit, zda dochází ke vzniku plaků. Pokud by ke vzniku plaků stále nedocházelo, nabízelo by se vytvořit recBacV produkovaný v hmyzích buňkách, ve kterém bude IL-15 klonován za konkrétní savčí promotor, a infikovat savčí buňky pro pouhou produkci proteinů. Tato varianta může být navíc obohacena o inducibilní promotor (Aslanidi et al., 2009).

Z důvodu nemožnosti produkce a izolace VP1-IL15-HIS proteinového konstruktů jsme se rozhodli tento konstrukt prozatím vynechat z dalších experimentů a zaměřit se na ostatní proteinové konstrukty, které se nám podařilo úspěšně charakterizovat a izolovat. Ty byly izolovány z peletů buněk SF9, které byly infikovány danými recBacV.

Izolace VLPs a VNS probíhala několikrát různými metodami. Jednalo se o izolaci navazující na buněčnou lýzu detergentem a vysolení a izolaci navazující na sonikaci buněčného materiálu s následným přečištěním přes sacharózový polštář. Po obou těchto metodách následovala purifikace VLPs a VNS ultracentrifugací v rovnovážném CsCl gradientu. Na základě předchozích zkušeností v naší laboratoři (Martin Fraiberk, osobní sdělení) jsme dali přednost tomuto způsobu izolace před izolací pomocí afinitní

chromatografie přes HIS, neboť izolace pentamerních struktur VP1 zajišťovala velké výtěžky. Naopak proteinový konstrukt IL15-HIS byl izolován afinitní chromatografií přes HIS.

Metoda izolace navazující na buněčnou lýzy detergentem a vysolením bez závěrečného koncentrování přes sacharózový polštář se jevila nejvhodnější volbou, neboť celkový výtěžek proteinů získaný touto metodou činil 25,42 $\mu\text{g}/10^6$ buněk (pro proteinový konstrukt VP1 Δ C-IL15-HIS). Nejvyšší celkový výtěžek získaný metodou izolace využívající sonikaci buněčného materiálu s následným přečištěním přes sacharózový polštář bez závěrečného koncentrování činil pouze 13,49 $\mu\text{g}/10^6$ buněk (pro proteinový konstrukt VP1-HIS). Závěrečné koncentrování přes sacharózový polštář bylo po prvotní izolaci proteinů vynecháno, neboť nejvyšší celkový výtěžek byl při koncentraci přes sacharózový polštář nižší, 8,54 $\mu\text{g}/10^6$ buněk (opět pro proteinový konstrukt VP1-HIS).

Po ultracentrifugaci proteinů v rovnovážném CsCl gradientu bylo již možno teoreticky odvodit, které vzorky obsahují VLPs a které VNS. Po ultracentrifugaci bylo v centrifugační kyvetě zřetelné rozprostření proteinů do jasných „zón“ u vzorku VP1-HIS odpovídající vznášivé hustotě částic (Gillock et al., 1997; Osterman, 1984). Toto uspořádání odpovídalo přítomnosti VLPs, což bylo později potvrzeno na snímcích z elektronové mikroskopie. U dalších vzorků bylo v horní polovině centrifugační kyvety pozorováno rovnoměrné rozprostření materiálu, které dle našeho předpokladu odpovídalo virovým pentamerům. Konkrétně se jednalo o VP1 Δ C-IL15-HIS, VP1 Δ C-HIS a VP1 Δ C proteinové konstrukty.

Všechny izolované proteinové konstrukty byly dále charakterizovány SDS-PAGE a Western blot s následnou imunodetekcí proteinů na membráně.

U proteinového konstrukt IL15-HIS, který byl izolován afinitní chromatografií na HisTrap FF kolonce přes HIS, byl identifikován majoritní výskyt pouze v subfrakci II a III (obr. 16, str. 54). Nejvyšší proteinový výtěžek tohoto proteinového konstrukt činil 3,68 $\mu\text{g}/10^6$ buněk, tedy 8,46 mg/L kompletního média. V porovnání, například Mirzaei et al. v SF9 bakulovirovém expresním systému vyprodukovali 1,7 $\mu\text{g}/\text{L}$ lidského interleukinu 7 (Mirzaei et al., 2009), stanoveno pomocí ELISA testu. De Pinheiro et al. naopak vyprodukovali 6 mg/L psího interleukinu 12, nicméně je nutné dodat, že autoři optimalizovali DNA konstrukt interleukinu 12 (de Pinheiro et al., 2016). V porovnání s ostatními interleukiny produkovanými v bakulovirovém expresním systému je náš výtěžek vysoký. Mnohem častěji ale dochází k produkci IL-15 v bakteriálním expresním systému, hlavně v *E. Coli*. Například Béhar et. al vyprodukovali 51 $\mu\text{g}/\text{L}$ (Béhar et al., 2011) zatímco Ward et. al získali zhruba 25 mg/L (Ward et al., 2009) a Huang et al. dokonce 50 mg/L (Huang et al., 2018). I když je tedy náš výtěžek v porovnání s Ward et. al a Huang et al. nižší, produkce

IL-15 v bakulovirovém expresním systému může mít své výhody. Výhodou může být bezpečnost systému, možnost posttranslačních modifikací proteinů a nepřítomnost endotoxinů (Felberbaum, 2015; Invitrogen - Guide to BEVS).

Zajímavým výsledkem byla přítomnost dalšího signálu pro IL-15 po imunodetekci proteinu po Western blotu. Kromě očekávaného signálu okolo MW 15 kDa, který odpovídá IL15-HIS (MW 15,7 kDa), je na obrázku patrný další signál lokalizovaný opět okolo MW 15 kDa (obr. 13, str. 54). V propagačních materiálech různých firem (např. Novus Biological nebo Abbkine), které komerčně prodávají IL-15, se jeho MW pohybuje mezi 12 – 18 kDa, nikoliv 14-15 kDa (Grabstein et al., 1994). Jedním z možných vysvětlení je, že se jedná o IL-15 bez HIS. Mnohem pravděpodobněji se ale může jednat o degradovaný protein nebo špatně zabalený protein. Ward et al. (2009) ve své práci zkoumali produkci a purifikaci různých IL-15 s/bez HIS. Autoři prokázali, že může docházet k degradaci/špatnému balení IL-15, a proto jsou detekovány rozdílné MW daného proteinu, tedy různé proteinové signály. Pokud by se jednalo o degradovaný protein, může to být vysvětlení, proč nedochází k žádanému ovlivnění proliferační aktivity na buňkách v případě IL15-HIS proteinového konstruktů. Dalším vysvětlením přítomnosti dvou proteinových signálů na membráně okolo MW 15 kDa je možnost posttranslačních modifikací. Předpokládá se, že za tyto dva signály může být zodpovědná například glykosylace (Mirzaei et al., 2009). IL-15 má hned tři domnělá místa jen pro N-glykosylaci (Huang et al., 2018). Můžeme tedy předpokládat, že dva signály pro IL15-HIS mohou v našem případě značit buď přítomnost degradovaného či špatně sbaleného IL15-HIS nebo přítomnost glykosylace. Řešením je analýza detekovaných proteinů na hmotnostní spektrometrii, která by poskytla definitivní výsledek, o jakou z těchto možností se jedná.

Na základě SDS-PAGE a imunodetekce proteinů na membráně po Western blotu byly všechny připravené proteinové konstrukty úspěšně charakterizovány. Vzorky VP1-HIS, VP1 Δ C-HIS a VP1 Δ C byly charakterizovány relativně snadno protilátkami proti VP1 a proti HIS, zatímco VP1 Δ C-IL15-HIS neposkytoval žádný signál s protilátkou proti VP1 ani u jedné z několika provedených imunodetekcí tohoto proteinu. Logickým vysvětlením může být fakt, že IL-15 fúzovaný s VP1 Δ C může omezovat interakci protilátky proti VP1 SV40 s imunodominantními epitopy na VP1 nebo dokonce měnit strukturu VP1 proteinu tak, že protilátka tento protein jen obtížně rozezná. VP1 Δ C-IL15-HIS byl naopak úspěšně detekován protilátkou proti IL-15 a proti HIS. Tyto protilátky detekovaly jasný signál okolo MW 50 kDa, který odpovídal předpokládané MW 51,6 kDa VP1 Δ C-IL15-HIS.

VNS byly rovněž charakterizovány elektronovou mikroskopií, kde každý proteinový konstrukt obsahoval příslušné VLPs nebo VNS. Ve vzorcích VP1 Δ C-HIS a VP1 Δ C byly vizualizovány pouze pentamery vzniklé zkrácením VP1 proteinu o 60 aminokyselin. Nemohlo tedy dojít ke vzájemné interakci pentamerů v rámci kapsidy (Stehle et al., 1996) a vzniku VLPs. U proteinového konstrukt VP1 Δ C-IL15-HIS, který rovněž vznikl zkrácením C-konce VP1 o 60 aminokyselin byly také pozorovány virové pentamery. Po porovnání snímků VP1 Δ C-IL15-HIS se snímky obsahující VNS VP1 Δ C-HIS a VP1 Δ C lze teoreticky usuzovat, že mezi těmito VNS je strukturní rozdíl. Ten může být pravděpodobně způsoben vazbou IL-15 na VP1 s následnými konformačními změnami v rámci pentamerů VP1. Pro úplné potvrzení této teorie by bylo vhodné provést elektronovou mikroskopií s následným porovnáním pentamer znovu nicméně s mnohem vyšší rozlišovací schopností mikroskopu.

V případě vzorku VP1-HIS bylo elektronovou mikroskopií detekováno velké množství morfologicky různých částic. Ve vzorku byly kromě klasických VLPs detekovány i další agregáty vzniklé samouspořádáním VP1. Tyto částice nezvyklého tvaru, tzv. tic-tac (obr. 18, str. 59) byly pozorovány v naší laboratoři již dříve – při přípravě VNS formovaných VP1 se zkráceným C-koncem o 35 aminokyselin (Hrušková, nepublikované výsledky). Ty mohou být dle obrázku tvořeny spojením dvěma či více kapsidami VP1 proteinů. Tyto tubulární agregáty byly rovněž pozorovány v práci Dr. Fraiberka (Fraiberk, 2017). Zajímavá byla rovněž struktura samotných VLPs. Tyto částice, tvořeny proteiny VP1 s HIS, mají dle snímků mnohem drsnější a vrásčitější povrch a strukturu než „klasické“ VLPs tvořené pouze VP1 proteiny. Tento drsnější vzhled může být pravděpodobně dán „rozvolněním“ vzájemných interakcí pentamer v rámci částice. Za toto „rozvolnění“ je navíc pravděpodobně zodpovědná HIS. U všech těchto proteinových konstruktů nicméně nebylo pozorováno, že by HIS nějakým způsobem ovlivnila strukturu pentamerů.

Samotný protein IL-15 se nám elektronovou mikroskopií nepodařilo vizualizovat z důvodu jeho malé velikosti.

Součástí této práce rovněž bylo testování vlastností připravených proteinových konstruktů a indukce buněčné proliferace. Hlavním cílem bylo otestovat proteinový konstrukt VP1 Δ C-IL15-HIS, který sloužil jako virový nosič IL-15, a proteinový konstrukt IL15-HIS. Ostatní proteinové konstrukty sloužily jako negativní kontroly. Pro toto testování byly vybrány vhodné frakce příslušných proteinových konstruktů. Konkrétně se jednalo o frakci F4 VP1 Δ C-IL15-HIS, frakci F1 IL15-HIS, frakci F2 VP1-HIS, frakci F4 VP1 Δ C-HIS a frakci F4 VP1 Δ C. Testování interakce a proliferační aktivity *in vitro* bylo prováděno na buňkách Jurkat a buňkách CTLL-2.

Schopnost proteinových konstruktů indukovat proliferaci byla nejprve testována *in vitro* na lidských leukemických T-lymfocytech, tedy buňkách Jurkat. Přestože byl u obou proteinových konstruktů VP1ΔC-IL15-HIS a IL15-HIS v nízkých koncentracích viditelný nepatrný nárůst absorbance, která odpovídá schopnosti buněk proliferovat, zřetelná indukce a podpora proliferace u buněk Jurkat nebyla pozorována ani u jednoho proteinového konstruktu. Tento výsledek může být způsoben tím, že buňky Jurkat postrádají IL-15Rα receptorovou podjednotku (Anderson et al., 1995). Z tohoto důvodu nemůže u těchto T-lymfocytů pravděpodobně docházet k plnohodnotné stimulaci pomocí cis- či trans-prezentace, tedy mechanismům důležitých v signalizaci IL-15. Buňky Jurkat obsahují IL-2Rβ a γc receptorové podjednotky a lze tedy předpokládat, že s mnohem nižší vazebnou afinitou (Giri et al., 1994) může docházet k prezentaci zobrazené na obr. 1D (str. 7). Nicméně při proliferačním testu provedeném společností Cloud-Clone corporation byla pozorována proliferace buněk Jurkat způsobená přidáním proteinu lidského IL-15 (Cloud-Clone Corporation, 2016). V tomto testu byla pozorována významná proliferační aktivita buněk Jurkat způsobená již po přidání IL-15 v koncentraci 1 ng/mL po 72 hodinách. Nutno zmínit, že v rámci našeho experimentu jsme využili podobné parametry, tedy stejně dlouhou inkubaci buněk po přidání velmi podobných koncentrací proteinů. V jiných studiích však byla buněčná linie Jurkat používána jako linie, která na stimulaci IL-15 nereaguje (Anderson et al., 1995). Z tohoto důvodu jsme provedli rovněž testování interakce a proliferační aktivity na buňkách CTLL-2.

Buňky CTLL-2 jsou myší CD8 T-lymfocyty, které jsou schopné reagovat na IL-15 (Zhao et al., 2016) a jsou pro stanovení biologické aktivity IL-15 (a dalších interleukinů) standardně využívány (Carmenate et al., 2013; Khatri et al., 2007; Mock et al., 2020; Soman et al., 2009; Vorauer et al., 1996). Zároveň by tento experiment neměl být ovlivněn skutečností, že využíváme lidský IL-15 na myších buňkách. Obě formy IL-15, tedy lidská a myší sdílí zhruba 70% sekvenční homologii a mělo by tedy docházet ke stejné prezentaci a signalizaci (Carson et al., 1994), převzato z (Guo et al., 2017). CTLL-2 jsou pro testování biologické aktivity lidského IL-15 využívány standardně (Ota et al., 2010; Paxton, 1996; Soman et al., 2009).

Na základě výsledků získaných z testování proliferační aktivity *in vitro* na buňkách CTLL-2 je patrné, že námi vytvořené proteinové konstrukty pravděpodobně nejsou aktivní, protože neovlivňují proliferaci buněk CTLL-2. Proteinový konstrukt IL15-HIS v porovnání s komerčním proteinem IL-15 nezpůsobuje žádnou indukci proliferace, stejně jako proteinový konstrukt VP1ΔC-IL15-HIS. Dle dostupné literatury by mělo docházet k proliferaci buněk již

po přidání $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^0$ ng/mL proteinu, tak jako například u námi využitého komerčního IL-15 nebo u Ota et al. (2010). Protože se tak nestalo, je možné se domnívat, že námi připravené proteinové konstrukty nejsou bioaktivní. Zajímavý je pouze nárůst absorbance u VP1 Δ C-IL15-HIS. Nicméně v porovnání s komerčním IL-15 a pozitivní kontrolou (CTLL-2 buňky kultivované s IL-2), u kterých nárůst absorbance dosahoval hodnoty cca 2, nelze nárůst absorbance na hodnotu 0,3 po přidání 3×10^1 ng/mL proteinu považovat za signifikantní.

Z výše uvedeného vyplývá, že VP1 proteiny MPyV pravděpodobně nejsou vhodné nosiče IL-15, protože nebyla pozorována žádná indukce proliferace vyvolaná námi připravenými proteinovými konstrukty. Na druhou stranu, výsledné hodnoty získané z proliferačního testu na buňkách CTLL-2 přesto nemusí být zcela dostatečné. Pokud došlo k vazbě IL-15 na virový nosič, mohl být ovlivněn způsob signalizace IL-15. Pokud by tomu tak bylo, je možné, že VP1 Δ C-IL15-HIS bude s buňkami interagovat mechanismem trans-prezentace a bude tedy ovlivňovat majoritně NK buňky, protože jak již bylo popsáno v kapitole 2.1 literárního úvodu (str. 4), IL-15 rovněž ovlivňuje proliferaci právě NK buněk (Huntington et al., 2009; Ogasawara et al., 1998; Ohteki et al., 1997; Stoklasek et al., 2006). Z časových důvodů se již nepodařilo připravené proteinové konstrukty charakterizovat vzhledem k jejich dalším aktivitám, tedy jejich schopnost indukovat proliferaci a aktivitu NK buněk. Je proto nutné další odborné testování vlastností připravených proteinových konstruktů, a to zejména na těchto buňkách. Ta by se testovala rovněž pomocí proliferačních testů, tak jak ji testovali například Huntington et al. (2009).

Rovněž by měla být testována schopnost proteinových konstruktů vázat se na povrch buněk. Pomocí imunofluorescenční mikroskopie bychom měli relativně snadno vizualizovat schopnost námi připravených proteinových konstruktů vázat se k receptorům na povrchu například buněk Jurkat nebo CTLL-2. Specifičtější testování vazebné afinity IL-15 k buněčnému povrchu může být stanoveno průtokovou cytometrií.

Zarážející je však skutečnost, že ani proteinový konstrukt IL15-HIS nevykazoval žádanou biologickou aktivitu. Nabízí se vysvětlení, které by opět mohlo souviset s glykosylací IL15-HIS. Bakulovirový expresní systém zaručuje, na rozdíl od bakteriálních systémů, N-glykosylaci proteinů (Shi a Jarvis, 2007). Ta však může v případě IL-15 mít negativní vliv na jeho aktivitu (Huang et al., 2018). Z časových důvodů bohužel nebylo možné analyzovat tuto možnost detailněji, pomocí hmotnostní spektroskopie a pomocí *in vitro* de-glykosylace (Huang et al., 2018). U komerčně dostupných, vysoce bioaktivních, rekombinantních IL-15 se většinou jedná o neglykosylované proteiny z *E. coli* expresního systému, které jsou izolovány pomocí HIS kotvy – ta tedy s největší pravděpodobností není

zodpovědná za nefunkčnost systému. Pokud by se ukázalo, že glykosylace může takto dramaticky ovlivnit aktivitu našich konstruktů, bylo by nutné převést celý systém do bakteriálního systému. Teprve pak by bylo možné definitivně rozhodnout o tom, zda VNS jsou schopné zlepšit biologické vlastnosti IL-15.

Přestože se nepodařilo připravit aktivní proteinové konstrukty, byly splněny hlavní cíle této diplomové práce. Byly vyprodukovány proteinové konstrukty VP1-HIS, VP1 Δ C-HIS a VP1 Δ C, které mohou sloužit jako vzorky pro další experimenty v rámci laboratoře. Taktéž bylo provedeno další testování a charakterizace VP1 proteinů zkrácených o 60 aminokyselin. Zároveň se podařilo analyzovat a otestovat další z přístupů v rámci cíle celého projektu laboratoře, kterým je vytvoření účinného nástroje založeného na polyomavirových strukturách pro stimulaci protinádorové imunitní odpovědi.

7 Souhrn

V této práci jsme si kladli za cíl vytvořit virové VP1 nanostruktury odvozené od MPyV, které by sloužily jako nosiče IL-15. Dále jsme chtěli ověřit jejich stabilitu, biologickou aktivitu a schopnost indukovat proliferaci buněk citlivých k IL-15.

Z rekombinantního plazmidu obsahující VP1 a IL-15 geny bylo úspěšně vytvořeno několik plazmidových vektorů pro konstrukci rekombinantních bakulovirů:

- Metodami genového inženýrství se úspěšně podařilo modifikovat rekombinantní plazmid (pFB-VP1-IL15-HIS) za vzniku dvou plazmidových vektorů obsahující geny pro IL-15 (pFB-VP1 Δ C-IL15-HIS a pFB-IL15-HIS) a tří plazmidů obsahující různě dlouhý gen pro VP1 protein (pFB-VP1-HIS, pFB-VP1 Δ C a pFB-VP1 Δ C-HIS).

V bakulovirovém expresním systému buněk SF9 bylo z rekombinantních bakulovirů úspěšně vyprodukováno pět proteinových konstruktů:

- Nepodařilo se vytvořit proteinový konstrukt s plnodélkovým VP1 proteinem (VP1-IL15-HIS), který měl být využit jako nosič IL-15, pravděpodobně z důvodu restrikce při tvorbě rekombinantního bakuloviru.
- Úspěšně byl vyprodukován fúzní VP1 Δ C-IL15-HIS proteinový konstrukt, který sloužil jako nosič IL-15 a jehož celkový výtěžek byl 53,38 mg/L kompletního média.
- Rovněž byly vyprodukovány kontrolní VP1 nanostruktury tvořené plnodélkovým VP1 nebo jeho o 60 aminokyselin zkrácenou variantou (VP1-HIS, VP1 Δ C-HIS a VP1 Δ C).
- Byl připraven samotný protein IL15-HIS, který byl využit jako další kontrolní varianta. Celkový výtěžek tohoto interleukinu činil 8,46 mg/L kompletního média.

Připravené proteinové konstrukty byly úspěšně charakterizovány:

- Připravené proteinové konstrukty byly úspěšně charakterizovány pomocí SDS-PAGE a imunologickou analýzou proteinů na membráně pomocí protilátek po Western blotu. Tímto způsobem bylo potvrzeno, že se jedná o správně připravené proteiny obsahující VP1/VP1 Δ C, IL-15 a HIS.
- Elektronovou mikroskopií byly vizualizovány VNS u VP1 Δ C-IL15-HIS, VP1 Δ C-HIS a VP1 Δ C. VLPs a tubulární agregáty byly vizualizovány u VP1-HIS.

Byla testována schopnost proteinových konstruktů indukovat proliferaci buněk:

- Na buňkách Jurkat a buňkách CTLL-2 nebylo *in vitro* prokázáno, že námi připravené proteinové konstrukty (VP1 Δ C-IL15-HIS a IL15-HIS) jsou schopny ovlivnit a indukovat proliferaci T-buněk citlivých k IL-15.

Seznam použité literatury:

- A Phase 1 Study of the Clinical and Immunologic Effects of ALT-803 in Patients With Advanced Solid Tumors (NCT01946789) - ClinicalTrials.gov
Dostupné z URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01946789>.
- Akbar, A.N., Borthwick, N.J., Wickremasinghe, R.G., Panayoitidis, P., Pilling, D., Bofill, M., Krajewski, S., Reed, J.C., Salmon, M. (1996): Interleukin-2 receptor common gamma-chain signaling cytokines regulate activated T cell apoptosis in response to growth factor withdrawal: selective induction of anti-apoptotic (bcl-2, bcl-xL) but not pro-apoptotic (bax, bcl-xS) gene expression., *Eur. J. Immunol.* 26: 294–299.
- ALT-803 Plus Nivolumab in Patients With Pretreated, Advanced or Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer (NCT02523469) - ClinicalTrials.gov
Dostupné z URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02523469>.
- An, K., Gillock, E.T., Sweat, J.A., Reeves, W.M., Consigli, R.A. (1999): Use of the baculovirus system to assemble polyomavirus capsid-like particles with different polyomavirus structural proteins: analysis of the recombinant assembled capsid-like particles. *J. Gen. Virol.* 80: 1009–1016.
- Anderson, D.M., Kumaki, S., Ahdieh, M., Bertles, J., Tometsko, M., Loomis, A., Giri, J., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A. (1995): Functional characterization of the human interleukin-15 receptor alpha chain and close linkage of IL15RA and IL2RA genes. *J. Biol. Chem.* 270: 29862–29869.
- Anguille, S., Lion, E., Bergh, J.V. den, Acker, H.H.V., Willemen, Y., Smits, E.L., Tendeloo, V.F.V., Berneman, Z.N. (2013): Interleukin-15 dendritic cells as vaccine candidates for cancer immunotherapy. *Hum. Vaccines Immunother.* 9: 1956–1961.
- Anguille, S., Smits, E.L.J.M., Cools, N., Goossens, H., Berneman, Z.N., Van Tendeloo, V.F.I. (2009): Short-term cultured, interleukin-15 differentiated dendritic cells have potent immunostimulatory properties. *J. Transl. Med.* 7: 109.
- Aposhian, H.V., Thayer, R.E., Qasba, P.K. (1975): Formation of nucleoprotein complexes between polyoma empty capsides and DNA. *J. Virol.* 15: 645–653.
- Araki, A., Hazama, S., Yoshimura, K., Yoshino, S., Iizuka, N., Oka, M. (2004): Tumor secreting high levels of IL-15 induces specific immunity to low immunogenic colon adenocarcinoma via CD8+ T cells. *Int. J. Mol. Med.* 14: 571–576.
- Aslanidi, G., Lamb, K., Zolotukhin, S. (2009): An inducible system for highly efficient production of recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors in insect Sf9 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106: 5059–5064.
- Baker, T.S., Caspar, D.L.D., Murakami, W.T. (1983): Polyoma virus ‘hexamer’ tubes consist of paired pentamers. *Nature* 303: 446–448.

- Bamford, R.N., Battiata, A.P., Burton, J.D., Sharma, H., Waldmann, T.A. (1996): Interleukin (IL) 15/IL-T production by the adult T-cell leukemia cell line HuT-102 is associated with a human T-cell lymphotropic virus type I region /IL-15 fusion message that lacks many upstream AUGs that normally attenuates IL-15 mRNA translation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 2897–2902.
- Bamford, R.N., Grant, A.J., Burton, J.D., Peters, C., Kurys, G., Goldman, C.K., Brennan, J., Roessler, E., Waldmann, T.A. (1994): The interleukin (IL) 2 receptor beta chain is shared by IL-2 and a cytokine, provisionally designated IL-T, that stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91: 4940–4944.
- Becker, T.C., Wherry, E.J., Boone, D., Murali-Krishna, K., Antia, R., Ma, A., Ahmed, R. (2002): Interleukin 15 Is Required for Proliferative Renewal of Virus-specific Memory CD8 T Cells. *J. Exp. Med.* 195: 1541–1548.
- Béhar, G., Solé, V., Defontaine, A., Maillasson, M., Quéméner, A., Jacques, Y., Tellier, C. (2011): Evolution of interleukin-15 for higher E. coli expression and solubility. *Protein Eng. Des. Sel. PEDS* 24: 283–290.
- Berard, M., Brandt, K., Paus, S.B., Tough, D.F. (2003): IL-15 Promotes the Survival of Naive and Memory Phenotype CD8+ T Cells. *J. Immunol.* 170: 5018–5026.
- Bergamaschi, C., Jalah, R., Kulkarni, V., Rosati, M., Zhang, G.-M., Alicea, C., Zolotukhin, A.S., Felber, B.K., Pavlakis, G.N. (2009): Secretion and biological activity of short signal peptide IL-15 is chaperoned by IL-15 receptor alpha in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 183: 3064–3072.
- Bergamaschi, C., Rosati, M., Jalah, R., Valentin, A., Kulkarni, V., Alicea, C., Zhang, G.-M., Patel, V., Felber, B.K., Pavlakis, G.N. (2008): Intracellular interaction of interleukin-15 with its receptor alpha during production leads to mutual stabilization and increased bioactivity. *J. Biol. Chem.* 283: 4189–4199.
- Berger, A., Colpitts, S.J., Seabrook, M.S.S., Furlonger, C.L., Bendix, M.B., Moreau, J.M., McKillop, W.M., Medin, J.A., Paige, C.J. (2019): Interleukin-15 in cancer immunotherapy: IL-15 receptor complex versus soluble IL-15 in a cancer cell-delivered murine leukemia model. *J. Immunother. Cancer* 7: 355.
- Berger, C., Berger, M., Hackman, R.C., Gough, M., Elliott, C., Jensen, M.C., Riddell, S.R. (2009): Safety and immunologic effects of IL-15 administration in nonhuman primates. *Blood* 114: 2417–2426.
- Bessard, A., Solé, V., Bouchaud, G., Quéméner, A., Jacques, Y. (2009): High antitumor activity of RLI, an interleukin-15 (IL-15)-IL-15 receptor alpha fusion protein, in metastatic melanoma and colorectal cancer. *Mol. Cancer Ther.* 8: 2736–2745.

- Bickert, T., Wohlleben, G., Brinkman, M., Trujillo-Vargas, C.M., Ruehland, C., Reiser, C.O.A., Hess, J., Erb, K.J. (2007): Murine polyomavirus-like particles induce maturation of bone marrow-derived dendritic cells and proliferation of T cells. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* 196: 31–39.
- Bolen, J.B., Anders, D.G., Trempy, J., Consigli, R.A. (1981): Differences in the subpopulations of the structural proteins of polyoma virions and capsids: biological functions of the multiple VP1 species. *J. Virol.* 37: 80–91.
- Brady, J.N., Winston, V.D., Consigli, R.A. (1977): Dissociation of polyoma virus by the chelation of calcium ions found associated with purified virions. *J. Virol.* 23: 717–724.
- Buck, C.B., Pastrana, D.V., Lowy, D.R., Schiller, J.T. (2005): Generation of HPV pseudovirions using transfection and their use in neutralization assays. *Methods Mol. Med.* 119: 445–462.
- Bulfone-Paus, S., Ungureanu, D., Pohl, T., Lindner, G., Paus, R., Rückert, R., Krause, H., Kunzendorf, U. (1997): Interleukin-15 protects from lethal apoptosis in vivo. *Nat. Med.* 3: 1124–1128.
- Buonaguro, L., Racioppi, L., Tornesello, M.L., Arra, C., Visciano, M.L., Biryahwaho, B., Sempala, S.D.K., Giraldo, G., Buonaguro, F.M. (2002): Induction of neutralizing antibodies and cytotoxic T lymphocytes in Balb/c mice immunized with virus-like particles presenting a gp120 molecule from a HIV-1 isolate of clade A. *Antiviral Res.* 54: 189–201.
- Burkett, P.R., Koka, R., Chien, M., Chai, S., Boone, D.L., Ma, A. (2004): Coordinate expression and trans presentation of interleukin (IL)-15 α and IL-15 supports natural killer cell and memory CD8⁺ T cell homeostasis. *J. Exp. Med.* 200: 825–834.
- Burkett, P.R., Koka, R., Chien, M., Chai, S., Chan, F., Ma, A., Boone, D.L. (2003): IL-15 α expression on CD8⁺ T cells is dispensable for T cell memory. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100: 4724–4729.
- Burton, J.D., Bamford, R.N., Peters, C., Grant, A.J., Kurys, G., Goldman, C.K., Brennan, J., Roessler, E., Waldmann, T.A. (1994): A lymphokine, provisionally designated interleukin T and produced by a human adult T-cell leukemia line, stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91: 4935–4939.
- Carmenate, T., Pacios, A., Enamorado, M., Moreno, E., Garcia-Martínez, K., Fuente, D., León, K. (2013): Human IL-2 mutein with higher antitumor efficacy than wild type IL-2. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 190: 6230–6238.
- Carson, W.E., Fehniger, T.A., Haldar, S., Eckhert, K., Lindemann, M.J., Lai, C.F., Croce, C.M., Baumann, H., Caligiuri, M.A. (1997): A potential role for interleukin-15 in the regulation of human natural killer cell survival. *J. Clin. Invest.* 99: 937–943.

- Carson, W.E., Giri, J.G., Lindemann, M.J., Linett, M.L., Ahdieh, M., Paxton, R., Anderson, D., Eisenmann, J., Grabstein, K., Caligiuri, M.A. (1994): Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J. Exp. Med.* 180: 1395–1403.
- Carson, W.E., Ross, M.E., Baiocchi, R.A., Marien, M.J., Boiani, N., Grabstein, K., Caligiuri, M.A. (1995): Endogenous production of interleukin 15 by activated human monocytes is critical for optimal production of interferon-gamma by natural killer cells in vitro. *J. Clin. Invest.* 96: 2578–2582.
- Česká republika a rakovina v číslech » Linkos.cz.
Dostupné z URL: <https://www.linkos.cz/narodni-onkologicky-program/co-musite-vedet/ceska-republika-a-rakovina-v-cislech/>.
- Chang, D., Cai, X., Consigli, R.A. (1993): Characterization of the DNA binding properties of polyomavirus capsid protein. *J. Virol.* 67: 6327–6331.
- Chao, C.-N., Yang, Y.-H., Wu, M.-S., Chou, M.-C., Fang, C.-Y., Lin, M.-C., Tai, C.-K., Shen, C.-H., Chen, P.-L., Chang, D., Wang, M. (2018): Gene therapy for human glioblastoma using neurotropic JC virus-like particles as a gene delivery vector. *Sci. Rep.* 8: 2213.
- Cheever, M.A. (2008): Twelve immunotherapy drugs that could cure cancers. *Immunol. Rev.* 222: 357–368.
- Chen, S., Huang, Q., Liu, J., Xing, J., Zhang, N., Liu, Y., Wang, Z., Li, Q. (2015): A targeted IL-15 fusion protein with potent anti-tumor activity. *Cancer Biol. Ther.* 16: 1415–1421.
- Chen, Y., Chen, B., Yang, T., Xiao, W., Qian, L., Ding, Y., Ji, M., Ge, X., Gong, W., 2017. Human fused NKG2D-IL-15 protein controls xenografted human gastric cancer through the recruitment and activation of NK cells. *Cell. Mol. Immunol.* 14: 293–307.
- ClinicalTrials.gov. Dostupné z URL: <https://clinicaltrials.gov/>
- Cloud-Clone Corporation, 2016. Active Interleukin 15 (IL15).
Dostupné z URL: [http://www.cloud-clone.com/manual/Active-Interleukin-15-\(IL15\)-APA061Hu01.pdf](http://www.cloud-clone.com/manual/Active-Interleukin-15-(IL15)-APA061Hu01.pdf)
- Conlon, K.C., Potter, E.L., Pittaluga, S., Lee, C.-C.R., Miljkovic, M.D., Fleisher, T.A., Dubois, S., Bryant, B.R., Petrus, M.N., Perera, L.P., Hsu, J., Figg, W.D., Peer, C.J., Shih, J.H., Yovandich, J.L., Creekmore, S.P., Roederer, M., Waldmann, T.A. (2019): IL-15 by continuous i.v. infusion to adult patients with solid tumors in a Phase I trial induced dramatic NK cell subset expansion. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 25: 4945–4954.
- Cui, G., Hara, T., Simmons, S., Wagatsuma, K., Abe, A., Miyachi, H., Kitano, S., Ishii, M., Tani-ichi, S., Ikuta, K. (2014): Characterization of the IL-15 niche in primary and secondary lymphoid organs in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111: 1915–1920.

- de Pinheiro, C.G.M., Pedrosa, M. de O., Teixeira, N.C., Ano Bom, A.P.D., van Oers, M.M., Oliveira, G.G. de S. (2016): Optimization of canine interleukin-12 production using a baculovirus insect cell expression system. *BMC Res. Notes* 9: 36.
- DeCaprio, J.A., Imperiale, M.J., Major, E.O. (2013): Polyomaviruses, in: Fields Virology. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 1633–1661.
- Döhner, K., Sodeik, B. (2005): The role of the cytoskeleton during viral infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 285: 67–108.
- Dower, W.J., Miller, J.F., Ragsdale, C.W. (1988): High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16: 6127–6145.
- Dubois, S., Magrangeas, F., Lehours, P., Raher, S., Bernard, J., Boisteau, O., Leroy, S., Minvielle, S., Godard, A., Jacques, Y. (1999): Natural splicing of exon 2 of human interleukin-15 receptor alpha-chain mRNA results in a shortened form with a distinct pattern of expression. *J. Biol. Chem.* 274: 26978–26984.
- Dubois, S., Patel, H.J., Zhang, M., Waldmann, T.A., Müller, J.R. (2008): Preassociation of IL-15 with IL-15R alpha-IgG1-Fc enhances its activity on proliferation of NK and CD8⁺/CD44^{high} T cells and its antitumor action. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 180: 2099–2106.
- Epardaud, M., Elpek, K.G., Rubinstein, M.P., Yonekura, A., Bellemare-Pelletier, A., Bronson, R., Hamerman, J.A., Goldrath, A.W., Turley, S.J. (2008): Interleukin-15/interleukin-15R alpha complexes promote destruction of established tumors by reviving tumor-resident CD8⁺ T cells. *Cancer Res.* 68: 2972–2983.
- Eriksson, M., Andreasson, K., Weidmann, J., Lundberg, K., Tegerstedt, K., Dalianis, T., Ramqvist, T. (2011): Murine polyomavirus virus-like particles carrying full-length human PSA protect BALB/c mice from outgrowth of a PSA expressing tumor. *PloS One* 6: 23828.
- Fehniger, T.A., Suzuki, K., Ponnappan, A., VanDeusen, J.B., Cooper, M.A., Florea, S.M., Freud, A.G., Robinson, M.L., Durbin, J., Caligiuri, M.A. (2001): Fatal leukemia in interleukin 15 transgenic mice follows early expansions in natural killer and memory phenotype CD8⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 193: 219–231.
- Felberbaum, R.S. (2015): The baculovirus expression vector system: A commercial manufacturing platform for viral vaccines and gene therapy vectors. *Biotechnol. J.* 10: 702–714.
- Forstová, J., Krauzewicz, N., Wallace, S., Street, A.J., Dilworth, S.M., Beard, S., Griffin, B.E. (1993): Cooperation of structural proteins during late events in the life cycle of polyomavirus. *J. Virol.* 67: 1405–1413.
- Fraiberk, M. (2017): Studium vlastností virových kapsidových proteinů a vývoj rekombinantních vakcín a diagnostických komponent založených na umělých virových strukturách. Dizertační práce, Univerzita Karlova, Praha.

- Fraiberk, M., Hájková, M., Krulová, M., Kojzarová, M., Drda Morávková, A., Pšikal, I., Forstová, J. (2017): Exploitation of stable nanostructures based on the mouse polyomavirus for development of a recombinant vaccine against porcine circovirus 2. *PLoS ONE* 12.
- Fried, H., Cahan, L.D., Paulson, J.C. (1981): Polyoma virus recognizes specific sialyligosaccharide receptors on host cells. *Virology* 109: 188–192.
- Gedvilaite, A., Dorn, D.C., Sasnauskas, K., Pecher, G., Bulavaite, A., Lawatscheck, R., Staniulis, J., Dalianis, T., Ramqvist, T., Schönrich, G., Raftery, M.J., Ulrich, R. (2006): Virus-like particles derived from major capsid protein VP1 of different polyomaviruses differ in their ability to induce maturation in human dendritic cells. *Virology* 354: 252–260.
- Gillock, E.T., Rottinghaus, S., Chang, D., Cai, X., Smiley, S.A., An, K., Consigli, R.A. (1997): Polyomavirus major capsid protein VP1 is capable of packaging cellular DNA when expressed in the baculovirus system. *J. Virol.* 71: 2857–2865.
- Giri, J.G., Ahdieh, M., Eisenman, J., Shanebeck, K., Grabstein, K., Kumaki, S., Namen, A., Park, L.S., Cosman, D., Anderson, D. (1994): Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *EMBO J.* 13: 2822–2830.
- Giri, J.G., Kumaki, S., Ahdieh, M., Friend, D.J., Loomis, A., Shanebeck, K., DuBose, R., Cosman, D., Park, L.S., Anderson, D.M. (1995): Identification and cloning of a novel IL-15 binding protein that is structurally related to the alpha chain of the IL-2 receptor. *EMBO J.* 14: 3654–3663.
- Grabstein, K.H., Eisenman, J., Shanebeck, K., Rauch, C., Srinivasan, S., Fung, V., Beers, C., Richardson, J., Schoenborn, M.A., Ahdieh, M. (1994): Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science* 264: 965–968.
- Greenstone, H.L., Nieland, J.D., de Visser, K.E., De Bruijn, M.L., Kirnbauer, R., Roden, R.B., Lowy, D.R., Kast, W.M., Schiller, J.T. (1998): Chimeric papillomavirus virus-like particles elicit antitumor immunity against the E7 oncoprotein in an HPV16 tumor model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95: 1800–1805.
- Gross, L. (1953): A Filterable Agent, Recovered from Ak Leukemic Extracts, Causing Salivary Gland Carcinomas in C3H Mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 83: 414–421.
- Gu, H., Maeda, H., Moon, J.J., Lord, J.D., Yoakim, M., Nelson, B.H., Neel, B.G. (2000): New Role for Shc in Activation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway. *Mol. Cell. Biol.* 20: 7109–7120.
- Guo, Y., Luan, L., Patil, N.K., Sherwood, E.R. (2017): Immunobiology of the IL-15-IL-15R α Complex as an Antitumor and Antiviral Agent. *Cytokine Growth Factor Rev.* 38: 10–21.

- Guo, Y., Luan, L., Rabacal, W., Bohannon, J.K., Fensterheim, B.A., Hernandez, A., Sherwood, E.R. (2015): IL-15 Superagonist-Mediated Immunotoxicity: Role of NK Cells and IFN- γ . *J. Immunol. Baltim. Md 1950 195*: 2353–2364.
- Guo, Z.S., Thorne, S.H., Bartlett, D.L. (2008): Oncolytic Virotherapy: Molecular Targets in Tumor-Selective Replication and Carrier Cell-Mediated Delivery of Oncolytic Viruses. *Biochim. Biophys. Acta 1785*: 217–231.
- Han, K., Zhu, X., Liu, B., Jeng, E., Kong, L., Yovandich, J.L., Vyas, V.V., Marcus, W.D., Chavaillaz, P.-A., Romero, C.A., Rhode, P.R., Wong, H.C. (2011): IL-15:IL-15 receptor alpha superagonist complex: high-level co-expression in recombinant mammalian cells, purification and characterization. *Cytokine 56*: 804–810.
- Herbst-Kralovetz, M., Mason, H.S., Chen, Q. (2010): Norwalk virus-like particles as vaccines. *Expert Rev. Vaccines 9*: 299–307.
- Hong, E., Usiskin, I.M., Bergamaschi, C., Hanlon, D.J., Edelson, R.L., Justesen, S., Pavlakis, G.N., Flavell, R.A., Fahmy, T.M. (2016): Configuration-dependent Presentation of Multivalent IL-15:IL-15R α Enhances the Antigen-specific T Cell Response and Anti-tumor Immunity. *J. Biol. Chem. 291*: 8931–8950.
- Hu, Q., Ye, X., Qu, X., Cui, D., Zhang, Lei, Xu, Z., Wan, H., Zhang, Lianshan, Tao, W. (2018): Discovery of a novel IL-15 based protein with improved developability and efficacy for cancer immunotherapy. *Sci. Rep. 8*: 1–11.
- Huang, H., Luo, Y., Baradei, H., Liu, S., Haenssen, K.K., Sanglikar, S., Kumar, S., Cini, J. (2018): A novel strategy to produce high level and high purity of bioactive IL15 fusion proteins from mammalian cells. *Protein Expr. Purif. 148*: 30–39.
- Huntington, N.D., Legrand, N., Alves, N.L., Jaron, B., Weijer, K., Plet, A., Corcuff, E., Mortier, E., Jacques, Y., Spits, H., Di Santo, J.P. (2009): IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation in vivo. *J. Exp. Med. 206*: 25–34.
- Hyde-DeRuyscher, R., Carmichael, G.G. (1988): Polyomavirus early-late switch is not regulated at the level of transcription initiation and is associated with changes in RNA processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85*: 8993–8997.
- Imada, K., Leonard, W.J. (2000): The Jak-STAT pathway. *Mol. Immunol. 37*: 1–11.
- Invitrogen - Guide to BEVS.
Dostupné z URL: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/bevtest.pdf>
- Jahanian-Najafabadi, A., Bouzari, S., Oloomi, M., Roudkenar, M.H., Mayr, L.M. (2012): Attempts to express the A1-GMCSF immunotoxin in the baculovirus expression vector system. *Biosci. Biotechnol. Biochem. 76*: 749–754.
- James, S.L., Nacy, C. (1993): Effector functions of activated macrophages against parasites. *Curr. Opin. Immunol. 5*: 518–523.

- Johnston, J.A., Bacon, C.M., Finbloom, D.S., Rees, R.C., Kaplan, D., Shibuya, K., Ortaldo, J.R., Gupta, S., Chen, Y.Q., Giri, J.D. (1995): Tyrosine phosphorylation and activation of STAT5, STAT3, and Janus kinases by interleukins 2 and 15. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92: 8705–8709.
- Kang, S.-M., Yoo, D.-G., Lipatov, A.S., Song, J.-M., Davis, C.T., Quan, F.-S., Chen, L.-M., Donis, R.O., Compans, R.W. (2009): Induction of Long-Term Protective Immune Responses by Influenza H5N1 Virus-Like Particles. *PLOS ONE* 4: 4667.
- Kaspar, M., Trachsel, E., Neri, D. (2007): The antibody-mediated targeted delivery of interleukin-15 and GM-CSF to the tumor neovasculature inhibits tumor growth and metastasis. *Cancer Res.* 67: 4940–4948.
- Kawano, M., Morikawa, K., Suda, T., Ohno, N., Matsushita, S., Akatsuka, T., Handa, H., Matsui, M. (2014): Chimeric SV40 virus-like particles induce specific cytotoxicity and protective immunity against influenza A virus without the need of adjuvants. *Virology* 448: 159–167.
- Kermer, V., Baum, V., Hornig, N., Kontermann, R.E., Müller, D. (2012): An antibody fusion protein for cancer immunotherapy mimicking IL-15 trans-presentation at the tumor site. *Mol. Cancer Ther.* 11: 1279–1288.
- Khatri, A., Husaini, Y., Russell, P.J. (2007): Murine CTLL-2 cells respond to mIL12: prospects for developing an alternative bioassay for measurement of murine cytokines IL12 and IL18. *J. Immunol. Methods* 326: 41–53.
- Kiessling, R., Klein, E., Pross, H., Wigzell, H. (1975): “Natural” killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur. J. Immunol.* 5: 117–121.
- Kim, P.S., Kwilas, A.R., Xu, W., Alter, S., Jeng, E.K., Wong, H.C., Schlom, J., Hodge, J.W. (2016): IL-15 superagonist/IL-15R α Sushi-Fc fusion complex (IL-15SA/IL-15R α Su-Fc; ALT-803) markedly enhances specific subpopulations of NK and memory CD8⁺ T cells, and mediates potent anti-tumor activity against murine breast and colon carcinomas. *Oncotarget* 7: 16130–16145.
- Kim, Y.S., Maslinski, W., Zheng, X.X., Stevens, A.C., Li, X.C., Tesch, G.H., Kelley, V.R., Strom, T.B. (1998): Targeting the IL-15 Receptor with an Antagonist IL-15 Mutant/Fc γ 2a Protein Blocks Delayed-Type Hypersensitivity. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 160: 5742–5748.
- Klebanoff, C.A., Finkelstein, S.E., Surman, D.R., Lichtman, M.K., Gattinoni, L., Theoret, M.R., Grewal, N., Spiess, P.J., Antony, P.A., Palmer, D.C., Tagaya, Y., Rosenberg, S.A., Waldmann, T.A., Restifo, N.P. (2004): IL-15 enhances the in vivo antitumor activity of tumor-reactive CD8⁺ T Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 1969–1974.

- Kobayashi, H., Dubois, S., Sato, N., Sabzevari, H., Sakai, Y., Waldmann, T.A., Tagaya, Y. (2005): Role of trans-cellular IL-15 presentation in the activation of NK cell-mediated killing, which leads to enhanced tumor immunosurveillance. *Blood* 105: 721–727.
- Krause, H., Jandrig, B., Wernicke, C., Bulfone-Paus, S., Pohl, T., Diamantstein, T. (1996): Genomic structure and chromosomal localization of the human interleukin 15 gene (IL-15). *Cytokine* 8: 667–674.
- Li, T.-C., Takeda, N., Kato, K., Nilsson, J., Xing, L., Haag, L., Cheng, R.H., Miyamura, T. (2003): Characterization of self-assembled virus-like particles of human polyomavirus BK generated by recombinant baculoviruses. *Virology* 311: 115–124.
- Liddington, R.C., Yan, Y., Moulai, J., Sahli, R., Benjamin, T.L., Harrison, S.C. (1991): Structure of simian virus 40 at 3.8-Å resolution. *Nature* 354: 278–284.
- Lieberman, L.A., Hunter, C.A. (2002): Regulatory pathways involved in the infection-induced production of IFN-gamma by NK cells. *Microbes Infect.* 4: 1531–1538.
- Liu, Z., Carmichael, G.G. (1993): Polyoma virus early-late switch: regulation of late RNA accumulation by DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90: 8494–8498.
- Lodolce, J.P., Boone, D.L., Chai, S., Swain, R.E., Dassopoulos, T., Trettin, S., Ma, A. (1998): IL-15 Receptor Maintains Lymphoid Homeostasis by Supporting Lymphocyte Homing and Proliferation. *Immunity* 9: 669–676.
- Losy, J., Niezgodna, A., Zaremba, J. (2002): IL-15 is elevated in sera of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Folia Neuropathol.* 40: 151–153.
- Marçais, A., Cherfils-Vicini, J., Viant, C., Degouve, S., Viel, S., Fenis, A., Rabilloud, J., Mayol, K., Tavares, A., Bienvenu, J., Gangloff, Y.-G., Gilson, E., Vivier, E., Walzer, T. (2014): The metabolic checkpoint kinase mTOR is essential for interleukin-15 signaling during NK cell development and activation. *Nat. Immunol.* 15: 749–757.
- Marks-Konczalik, J., Dubois, S., Losi, J.M., Sabzevari, H., Yamada, N., Feigenbaum, L., Waldmann, T.A., Tagaya, Y. (2000): IL-2-induced activation-induced cell death is inhibited in IL-15 transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 11445–11450.
- Masonic Cancer Center, University of Minnesota (2019): QUILT-2.021: Randomized Study of Single Course of Intraperitoneal (IP) ALT-803 Followed by Subcutaneous (SQ) Maintenance ALT-803 Versus Subcutaneous (SQ) Maintenance ALT-803 Only After 1st Line Chemotherapy for Advanced Ovarian, Fallopian Tube, and Primary Peritoneal Cancer (Clinical trial registration No. NCT03054909). clinicaltrials.gov.
- Mathios, D., Park, C.-K., Marcus, W.D., Alter, S., Rhode, P.R., Jeng, E.K., Wong, H.C., Pardoll, D.M., Lim, M. (2016): Therapeutic administration of IL-15 superagonist complex ALT-803 leads to long-term survival and durable antitumor immune response in a murine glioblastoma model. *Int. J. Cancer* 138: 187–194.
- Mattei, F., Schiavoni, G., Belardelli, F., Tough, D.F. (2001): IL-15 is expressed by dendritic cells in response to type I IFN, double-stranded RNA, or lipopolysaccharide and promotes dendritic cell activation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 167: 1179–1187.

- Mattern, C.F., Takemoto, K.K., DeLeva, A.M. (1967): Electron microscopic observations on multiple polyoma virus-related particles. *Virology* 32: 378–392.
- McDonald, P.P., Russo, M.P., Ferrini, S., Cassatella, M.A. (1998): Interleukin-15 (IL-15) induces NF-kappaB activation and IL-8 production in human neutrophils. *Blood* 92: 4828–4835.
- McInnes, I.B., Leung, B.P., Sturrock, R.D., Field, M., Liew, F.Y. (1997): Interleukin-15 mediates T cell-dependent regulation of tumor necrosis factor-alpha production in rheumatoid arthritis. *Nat. Med.* 3: 189–195.
- Mention, J.-J., Ben Ahmed, M., Bègue, B., Barbe, U., Verkarre, V., Asnafi, V., Colombel, J.-F., Cugnenc, P.-H., Ruemmele, F.M., McIntyre, E., Brousse, N., Cellier, C., Cerf-Bensussan, N. (2003): Interleukin 15: a key to disrupted intraepithelial lymphocyte homeostasis and lymphomagenesis in celiac disease. *Gastroenterology* 125: 730–745.
- Mirzaei, M., Xu, Y., Elias, C.B., Prakash, S. (2009): Nonviral Production of Human Interleukin-7 in *Spodoptera Frugiperda* Insect Cells as a Soluble Recombinant Protein. *J. Biomed. Biotechnol.* 2009.
- Miyazaki, T., Liu, Z.J., Kawahara, A., Minami, Y., Yamada, K., Tsujimoto, Y., Barsoumian, E.L., Permuter, R.M., Taniguchi, T. (1995): Three distinct IL-2 signaling pathways mediated by bcl-2, c-myc, and lck cooperate in hematopoietic cell proliferation. *Cell* 81: 223–231.
- Mock, J., Pellegrino, C., Neri, D. (2020): A universal reporter cell line for bioactivity evaluation of engineered cytokine products. *Sci. Rep.* 10: 3234.
- 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.
- Moreland, R.B., Montross, L., Garcea, R.L. (1991): Characterization of the DNA-binding properties of the polyomavirus capsid protein VP1. *J. Virol.* 65: 1168–1176.
- Mortier, E., Bernard, J., Plet, A., Jacques, Y. (2004): Natural, proteolytic release of a soluble form of human IL-15 receptor alpha-chain that behaves as a specific, high affinity IL-15 antagonist. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 173: 1681–1688.
- Mortier, E., Quémener, A., Vusio, P., Lorenzen, I., Boublik, Y., Grötzinger, J., Plet, A., Jacques, Y. (2006): Soluble interleukin-15 receptor alpha (IL-15R alpha)-sushi as a selective and potent agonist of IL-15 action through IL-15R beta/gamma. Hyperagonist IL-15 x IL-15R alpha fusion proteins. *J. Biol. Chem.* 281: 1612–1619.
- Müller, M., Zhou, J., Reed, T.D., Rittmüller, C., Burger, A., Gabelsberger, J., Braspenning, J., Gissmann, L. (1997): Chimeric papillomavirus-like particles. *Virology* 234: 93–111.

- Nishimura, H., Yajima, T., Naiki, Y., Tsunobuchi, H., Umemura, M., Itano, K., Matsuguchi, T., Suzuki, M., Ohashi, P.S., Yoshikai, Y. (2000): Differential roles of interleukin 15 mRNA isoforms generated by alternative splicing in immune responses in vivo. *J. Exp. Med.* 191: 157–170.
- Ochoa, M.C., Fioravanti, J., Rodriguez, I., Hervas-Stubbs, S., Azpilikueta, A., Mazzolini, G., Gúrpide, A., Prieto, J., Pardo, J., Berraondo, P., Melero, I. (2013): Antitumor immunotherapeutic and toxic properties of an HDL-conjugated chimeric IL-15 fusion protein. *Cancer Res.* 73: 139–149.
- Ogasawara, K., Hida, S., Azimi, N., Tagaya, Y., Sato, T., Yokochi-Fukuda, T., Waldmann, T.A., Taniguchi, T., Taki, S. (1998): Requirement for IRF-1 in the microenvironment supporting development of natural killer cells. *Nature* 391: 700–703.
- Ohteki, T., Ho, S., Suzuki, H., Mak, T.W., Ohashi, P.S. (1997): Role for IL-15/IL-15 receptor beta-chain in natural killer 1.1+ T cell receptor-alpha beta+ cell development. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 159: 5931–5935.
- Orengo, A.M., Di Carlo, E., Comes, A., Fabbi, M., Piazza, T., Cilli, M., Musiani, P., Ferrini, S. (2003): Tumor cells engineered with IL-12 and IL-15 genes induce protective antibody responses in nude mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 171: 569–575.
- Osterman, L.A. (1984): *Methods of Protein and Nucleic Acid Research: Immunoelectrophoresis, application of radioisotopes.* Springer-Verlag.
- Ota, N., Takase, M., Uchiyama, H., Olsen, S.K., Kanagawa, O. (2010): No requirement of trans presentations of IL-15 for human CD8 T cell proliferation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 185: 6041–6048.
- Paxton, R.J. (1996): Measurement of Interleukin 15. *Curr. Protoc. Immunol.* 18: 6.22.1-6.22.7.
- Perdreau, H., Mortier, E., Bouchaud, G., Solé, V., Boublik, Y., Plet, A., Jacques, Y. (2010): Different dynamics of IL-15R activation following IL-15 cis- or trans-presentation. *Eur. Cytokine Netw.* 21: 297–307.
- Pleckaityte, M., Bremer, C.M., Gedvilaite, A., Kucinskaite-Kodze, I., Glebe, D., Zvirbliene, A. (2015): Construction of polyomavirus-derived pseudotype virus-like particles displaying a functionally active neutralizing antibody against hepatitis B virus surface antigen. *BMC Biotechnol.* 15: 85.
- Rayment, I., Baker, T.S., Caspar, D.L.D., Murakami, W.T. (1982): Polyoma virus capsid structure at 22.5 Å resolution. *Nature* 295: 110–115.
- Richterová, Z., Liebl, D., Horák, M., Palková, Z., Stokrová, J., Hozák, P., Korb, J., Forstová, J. (2001): Caveolae are involved in the trafficking of mouse polyomavirus virions and artificial VP1 pseudocapsids toward cell nuclei. *J. Virol.* 75: 10880–10891.

- Romee, R., Cooley, S., Berrien-Elliott, M.M., Westervelt, P., Verneris, M.R., Wagner, J.E., Weisdorf, D.J., Blazar, B.R., Ustun, C., DeFor, T.E., Vivek, S., Peck, L., DiPersio, J.F., Cashen, A.F., Kylo, R., Musiek, A., Schaffer, A., Anadkat, M.J., Rosman, I., Miller, D., Egan, J.O., Jeng, E.K., Rock, A., Wong, H.C., Fehniger, T.A., Miller, J.S. (2018): First-in-human phase 1 clinical study of the IL-15 superagonist complex ALT-803 to treat relapse after transplantation. *Blood* 131: 2515–2527.
- Rubinstein, M.P., Kovar, M., Purton, J.F., Cho, J.-H., Boyman, O., Surh, C.D., Sprent, J. (2006): Converting IL-15 to a superagonist by binding to soluble IL-15R $\{\alpha\}$. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103: 9166–9171.
- Salunke, D.M., Caspar, D.L., Garcea, R.L. (1989): Polymorphism in the assembly of polyomavirus capsid protein VP1. *Biophys. J.* 56: 887–900.
- Schäfer, K., Müller, M., Faath, S., Henn, A., Osen, W., Zentgraf, H., Benner, A., Gissmann, L., Jochmus, I., 1999. Immune response to human papillomavirus 16 L1E7 chimeric virus-like particles: induction of cytotoxic T cells and specific tumor protection. *Int. J. Cancer* 81: 881–888.
- Schiedner, G., Morral, N., Parks, R.J., Wu, Y., Koopmans, S.C., Langston, C., Graham, F.L., Beaudet, A.L., Kochanek, S. (1998): Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity. *Nat. Genet.* 18: 180–183.
- Schluns, K.S., Williams, K., Ma, A., Zheng, X.X., Lefrançois, L. (2002): Cutting Edge: Requirement for IL-15 in the Generation of Primary and Memory Antigen-Specific CD8 T Cells. *J. Immunol.* 168: 4827–4831.
- Schüchner, S., Wintersberger, E. (1999): Binding of polyomavirus small T antigen to protein phosphatase 2A is required for elimination of p27 and support of S-phase induction in concert with large T antigen. *J. Virol.* 73: 9266–9273.
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J., Schreiber, R.D. (2001): IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410: 1107–1111.
- Shi, X., Jarvis, D.L. (2007): Protein N-Glycosylation in the Baculovirus-Insect Cell System. *Curr. Drug Targets* 8: 1116–1125.
- Smith, G.E., Ju, G., Ericson, B.L., Moschera, J., Lahm, H.W., Chizzonite, R., Summers, M.D. (1985): Modification and secretion of human interleukin 2 produced in insect cells by a baculovirus expression vector. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 8404–8408.
- Soman, G., Yang, X., Jiang, H., Giardina, S., Vyas, V., Mitra, G., Yovandich, J., Creekmore, S.P., Waldmann, T.A., Quiñones, O., Alvord, W.G. (2009): MTS dye based colorimetric CTLL-2 cell proliferation assay for product release and stability monitoring of interleukin-15: assay qualification, standardization and statistical analysis. *J. Immunol. Methods* 348: 83–94.

- Stages of Cancer, (2010): Cancer. Net.
Dostupné z URL <https://www.cancer.net/navigating-cancer-care/diagnosing-cancer/stages-cancer>.
- Stehle, T., Gamblin, S.J., Yan, Y., Harrison, S.C. (1996): The structure of simian virus 40 refined at 3.1 Å resolution. *Struct. Lond. Engl.* 1993 4: 165–182.
- Stehle, T., Harrison, S.C. (1996): Crystal structures of murine polyomavirus in complex with straight-chain and branched-chain sialyloligosaccharide receptor fragments. *Structure* 4: 183–194.
- Steinmetz, N.F. (2013): Viral Nanoparticles in Drug Delivery and Imaging. *Mol. Pharm.* 10: 1–2.
- Stojanovic, A., Cerwenka, A. (2011): Natural Killer Cells and Solid Tumors. *J. Innate Immun.* 3: 355–364.
- Stoklasek, T.A., Schluns, K.S., Lefrançois, L. (2006): Combined IL-15/IL-15R α immunotherapy maximizes IL-15 activity in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 177: 6072–6080.
- Suchanová, J., Spanielova, H., Forstová, J. (2015): Applications of Viral Nanoparticles Based on Polyomavirus and Papillomavirus Structures. pp. 303–362.
- Tagaya, Y., Bamford, R.N., DeFilippis, A.P., Waldmann, T.A. (1996): IL-15: a pleiotropic cytokine with diverse receptor/signaling pathways whose expression is controlled at multiple levels. *Immunity* 4: 329–336.
- Tagaya, Y., Kurys, G., Thies, T.A., Losi, J.M., Azimi, N., Hanover, J.A., Bamford, R.N., Waldmann, T.A. (1997): Generation of secretable and nonsecretable interleukin 15 isoforms through alternate usage of signal peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94: 14444–14449.
- Tang, F., Zhao, L., Jiang, Y., Ba, D., Cui, L., He, W. (2008): Activity of Recombinant Human Interleukin-15 against Tumor Recurrence and Metastasis in Mice. *Cell. Mol. Immunol.* 5: 189–196.
- Tegerstedt, K., Lindencrona, J.A., Curcio, C., Andreasson, K., Tullus, C., Forni, G., Dalianis, T., Kiessling, R., Ramqvist, T. (2005): A single vaccination with polyomavirus VP1/VP2Her2 virus-like particles prevents outgrowth of HER-2/neu-expressing tumors. *Cancer Res.* 65: 5953–5957.
- Tosic, V., Thomas, D.L., Kranz, D.M., Liu, J., McFadden, G., Shisler, J.L., MacNeill, A.L., Roy, E.J. (2014): Myxoma virus expressing a fusion protein of interleukin-15 (IL15) and IL15 receptor alpha has enhanced antitumor activity. *PLoS ONE* 9.
- Tourkova, I.L., Yurkovetsky, Z.R., Gambotto, A., Makarenkova, V.P., Perez, L., Balkir, L., Robbins, P.D., Shurin, M.R., Shurin, G.V. (2002): Increased function and survival of IL-15-transduced human dendritic cells are mediated by up-regulation of IL-15R α and Bcl-2. *J. Leukoc. Biol.* 72: 1037–1045.

- Trinchieri, G., Perussia, B. (1985): Immune interferon: a pleiotropic lymphokine with multiple effects. *Immunol. Today* 6: 131–136.
- Tsai, B., Gilbert, J.M., Stehle, T., Lencer, W., Benjamin, T.L., Rapoport, T.A. (2003): Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40. *EMBO J.* 22: 4346–4355.
- Turner, J.G., Rakhmilevich, A.L., Burdelya, L., Neal, Z., Imboden, M., Sondel, P.M., Yu, H. (2001): Anti-CD40 antibody induces antitumor and antimetastatic effects: the role of NK cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 166: 89–94.
- User Guide: T4 DNA Ligase, 5 Weiss U, 1000 Weiss U.
 Dostupné z URL: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FSLSG%2Fmanuals%2FMAN0011987_T4_DNA_Ligase_5_Weiss_1000_Weiss_U_UG.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogVDQgRE5BIExpZ2FzZSwgNSBXZWlzcYBVLCAxMDAwIFdlaXNzIFU=
- Van Acker, H.H., Anguille, S., De Reu, H., Berneman, Z.N., Smits, E.L., Van Tendeloo, V.F. (2018): Interleukin-15-Cultured Dendritic Cells Enhance Anti-Tumor Gamma Delta T Cell Functions through IL-15 Secretion. *Front. Immunol.* 9.
- Van den Bergh, J., Willemen, Y., Lion, E., Van Acker, H., De Reu, H., Anguille, S., Goossens, H., Berneman, Z., Van Tendeloo, V., Smits, E. (2015): Transpresentation of interleukin-15 by IL-15/IL-15R α mRNA-engineered human dendritic cells boosts antitumoral natural killer cell activity. *Oncotarget* 6: 44123–44133.
- Váňová, J., Hejtmánková, A., Žáčková Suchanová, J., Sauerová, P., Forstová, J., Hubálek Kalbáčová, M., Španielová, H. (2020): Influence of cell-penetrating peptides on the activity and stability of virus-based nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 576: 119008.
- Vorauer, K., Steindl, F., Jungbauer, A., Hahn, R., Katinger, H. (1996): Cytokine activity assay by means of proliferation measured in plane convex microtiter wells. *J. Biochem. Biophys. Methods* 32: 85–96.
- Waldmann, T.A., Lugli, E., Roederer, M., Perera, L.P., Smedley, J.V., Macallister, R.P., Goldman, C.K., Bryant, B.R., Decker, J.M., Fleisher, T.A., Lane, H.C., Sneller, M.C., Kurlander, R.J., Kleiner, D.E., Pletcher, J.M., Figg, W.D., Yovandich, J.L., Creechmore, S.P. (2011): Safety (toxicity), pharmacokinetics, immunogenicity, and impact on elements of the normal immune system of recombinant human IL-15 in rhesus macaques. *Blood* 117: 4787–4795.
- Ward, A., Anderson, M., Craggs, R.I., Maltby, J., Grahames, C., Davies, R.A., Finch, D., Pattison, D., Oakes, H., Mallinder, P.R. (2009): E. coli expression and purification of human and cynomolgus IL-15. *Protein Expr. Purif.* 68: 42–48.

- Wong, R.L., Liu, B., Zhu, X., You, L., Kong, L., Han, K.-P., Lee, H.-I., Chavaillaz, P.-A., Jin, M., Wang, Y., Rhode, P.R., Wong, H.C. (2011): Interleukin-15:Interleukin-15 receptor α scaffold for creation of multivalent targeted immune molecules. *Protein Eng. Des. Sel. PEDS* 24: 373–383.
- Wrangle, J.M., Velcheti, V., Patel, M.R., Garrett-Mayer, E., Hill, E.G., Ravenel, J.G., Miller, J.S., Farhad, M., Anderton, K., Lindsey, K., Taffaro-Neskey, M., Sherman, C., Suriano, S., Swiderska-Syn, M., Sion, A., Harris, J., Edwards, A.R., Rytlewski, J.A., Sanders, C.M., Yusko, E.C., Robinson, M.D., Krieg, C., Redmond, W.L., Egan, J.O., Rhode, P.R., Jeng, E.K., Rock, A.D., Wong, H.C., Rubinstein, M.P. (2018): ALT-803, an IL-15 superagonist, in combination with nivolumab in patients with metastatic non-small cell lung cancer: a non-randomised, open-label, phase 1b trial. *Lancet Oncol.* 19: 694–704.
- Wu, Z., Xu, Y. (2010): IL-15R alpha-IgG1-Fc enhances IL-2 and IL-15 anti-tumor action through NK and CD8⁺ T cells proliferation and activation. *J. Mol. Cell Biol.* 2: 217–22.
- Xu, W., Jones, M., Liu, B., Zhu, X., Johnson, C.B., Edwards, A.C., Kong, L., Jeng, E.K., Han, K., Marcus, W.D., Rubinstein, M.P., Rhode, P.R., Wong, H.C. (2013): Efficacy and mechanism-of-action of a novel superagonist interleukin-15: interleukin-15 receptor α Su/Fc fusion complex in syngeneic murine models of multiple myeloma. *Cancer Res.* 73: 3075–3086.
- Žáčková Suchanová, J. (2018): Targeting of viral nanoparticles to cancer specific receptors. Dizertační práce, Univerzita Karlova, Praha.
- Zackova Suchanova, J., Neburkova, J., Spanielova, H., Forstova, J., Cigler, P. (2017): Retargeting Polyomavirus-Like Particles to Cancer Cells by Chemical Modification of Capsid Surface. *Bioconjug. Chem.* 28: 307–313.
- Zhang, M., Yao, Z., Dubois, S., Ju, W., Müller, J.R., Waldmann, T.A. (2009): Interleukin-15 combined with an anti-CD40 antibody provides enhanced therapeutic efficacy for murine models of colon cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106: 7513–7518.
- Zhang, X., Sun, S., Hwang, I., Tough, D.F., Sprent, J. (1998): Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8⁺ T cells in vivo by IL-15. *Immunity* 8: 591–599.
- Zhao, L., Hu, B., Zhang, Y., Song, Y., Lin, D., Liu, Y., Mei, Y., Sandikin, D., Sun, W., Zhuang, M., Liu, H. (2016): An activation-induced IL-15 isoform is a natural antagonist for IL-15 function. *Sci. Rep.* 6.