

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra genetiky a mikrobiologie



Expres sTGF β RII-Fc-Jun z rekombinantního viru vakcinie

Zuzana Samková

Praha 2010

Vedoucí diplomové práce: **RNDr. Šárka Němečková, DrSc.**

Laboratoř rekombinantních vakcín, Oddělení experimentální virologie, Ústav hematologie a krevní transfúze (ÚHK)

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Šárky Němečkové, DrSc. a že všechny použité prameny byly řádně ocitovány.

V Praze dne 30. Dubna 2010

.....

Zuzana Samková

Na tomto místě bych chtěla nejdříve poděkovat své školitelce, RNDr. Šárce Němečkové, DrSc. za ochotu, pečlivost a poskytnutí cenných rad při vedení mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Kamile Žůrkové za veškerou její pomoc v laboratoři, poskytnutí cenných rad a za její milou společnost.

Dále bych ráda poděkovala RNDr. Ludě Kutinové za pomoc při výrobě rekombinantních vakcín, Mgr. Petru Hainzovi za pomoc při *in vivo* pokusech a RNDr. Katarině Babiarové za pomoc při detekci buněčné imunity.

V neposlední řadě děkuji celému kolektivu naší laboratoře za příjemné pracovní prostředí.

Tato diplomová práce vznikla v letech 2006-2010 v rámci grantového projektu IGA MZd NR9238.

Exprese sTGFβRII-Fc-Jun z rekombinantního viru vakcinie

TGFβ má při karcinogenezi dvojí roli. V počátku slouží jako nádorový supresor, během růstu nádoru se však jeho funkce může změnit na nádorový promotor a buňky nádoru i jeho okolí pak produkují velké množství TGFβ. Tento nádorový TGFβ poskytuje vhodné prostředí pro růst a šíření nádoru. Jedním ze způsobů, jak kontrolovat růst nádoru a metastáze, je blokování signální dráhy TGFβ v pokročilých stádiích karcinogeneze.

Připravili jsme rekombinantní virus vakcinie P13 exprimující rozpustný receptor typu II pro TGFβ fúzovaný k Fc fragmentu IgG a k fragmentu Jun (sTβRII-Fc-Jun) pod kontrolou H5 nebo E/L promotoru. Tento sTβRII-Fc-Jun by měl zvýšit účinek protinádorové virové vakcíny exprimující SigE7LAMP, tato vakcína se zkoumá pro využití při terapii karcinomů cervixu asociovaných s HPV-16.

Zkoumali jsme vazbu receptoru sTβRII-Fc-Jun na protein G, kdy jsme pomocí imunoblotu prokázali, že fragment Jun a fragment sTβRII nebrání fragmentu Fc ve vazbě na protein G.

Pomocí SDS-PAGE a imunoblotu jsme charakterizovali protein se sTβRII-Fc-Jun. sTβRII-Fc-Jun se ve velkém množství uvolňoval do média a v buněčných lyzátech jsme ho detekovali méně než receptoru sTβRII. Exprese sTβRII-Fc-Jun byla silnější pod kontrolou E/L promotoru než pod kontrolou H5 promotoru.

Dvojité rekombinanty P13-SigE7LAMP-H5-sTβRII-Fc-Jun a P13-SigE7LAMP-E/L-sTβRII-Fc-Jun vyvolávaly T buněčnou imunitní odpověď specifickou pro E7 peptid a VACV peptid, která byla stanovena pomocí testu ELISPOT pro IFN-γ.

Při *in vivo* pokusech jsme nepozorovali vliv koexprese sTβRII-Fc-Jun na účinnost virové vakcíny P13-SigE7LAMP-TK.

Klíčová slova: virus vakcinie, TGFβ, TβRII, Fc IgG1 fúzní proteiny, Jun, DNA vakcíny, terapie nádorů

Expression of sTGF β RII-Fc-Jun from recombinant vaccinia virus

TGF β has a biphasic role in tumorigenesis. In early phases it acts as tumor suppressor. However, in late phases when cells have escaped selectively from the antimitogenic response of TGF β , it may act as a promoter of tumor progression and invasion. One way of control tumor formation and progression is blocking of TGF β signalling pathways in late phases of tumorigenesis.

We have constructed recombinant vaccinia virus P13 expressing soluble TGF β type II receptor fused with the Fc fragment of IgG1 and with Jun fragment (sT β RII-Fc-Jun). This sT β RII-Fc-Jun is supposed to increase the effect of antitumor vaccinia virus vaccine expressing SigE7LAMP, which is investigated for the treatment of the HPV-16 associated cervical cancer.

Binding of sT β RII-Fc-Jun to protein G were tested by SDS-PAGE and by immunoblotting. We found that Jun fragment and sT β RII fragment do not block Fc binding site for protein G.

sT β RII-Fc-Jun was characterised using SDS-PAGE and immunoblot analysis. We observed that the amount of sT β RII-Fc-Jun was higher in cell supernatans of infected cells in comparison to cell lysates. In cell lysates we observed higher amount of sT β RII than sT β RII-Fc-Jun. The expression of sT β RII-Fc-Jun was stronger under the control of E/L promoter than under the control of H5 promoter.

The T cell response was determined by ELISPOT-IFN- γ assay. We observed T cell response against E7 and VACV antigen induced in mice by immunization with P13-SigE7LAMP-H5-sT β RII-Fc-Jun and P13-SigE7LAMP-E/L-sT β RII-Fc-Jun.

We did not observe the effect of sT β RII-Fc-Jun coexpression on the therapeutic anti-tumor effect of immunization with P13-SigE7LAMP-TK.

Key Words: vaccinia virus, TGF β , T β RII, Fc IgG1 fusion proteins, Jun, DNA vaccine, cancer therapy

Seznam zkratk

AAV	Adeno-asociovaný virus
ADCC	Na protilátkách závislá buněčná cytotoxicita
ALK5	Aktivinu podobná kináza
APC	Antigen prezentující buňky
CEV	S buňkou asociovaný obalený virion
CDC	Na komplementu závislá cytotoxicita
CDK	Cyklin dependentní kináza
Co-Smads	Běžné-zprostředkovávající Smads
CTGF	Růstový faktor pojivových tkání
CTL	Cytotoxické T lymfocyty
DNR	Dominantní negativní receptory
EEV	Extracelulární obalený virion
EGF	Epidermální růstový faktor
EGFR	Receptor pro epidermální růstový faktor
EMT	Epiteliální- mezenchymální transformace
ERK	Extracelulární signál-regulující kináza
Fc	Fc fragment IgG
FcRn	Neonatální Fc-receptor
FcγR	Receptor pro Fc fragment
GDEPT	Gene-direct enzyme pro-drug therapy
HLA- A201	Lidský leukocytární antigen A201
HPV-16	Lidský papilomavirus typu 16
HRP	Křenová peroxidáza
IEVs	Intracelulární obalené viriony
IgG1	Imunoglobulin G1
IMV	Intracelulární maturovaný virion
ITR	Invertované koncové repetice
IVs	Nematurované viriony
JNK	c-Jun NH ₂ -terminální kináza
LAP	Latentně asociovaný protein
LTBP	Latentní TGFβ- vazebný protein

MAPK	p38 mitogenem-aktivovaná protein kináza
MOI	Multiplicita infekce
MVA	Modifikovaný virus Ankara
MHC _{gp I}	Hlavní histokompatibilní komplex-glykoprotein I
MHC _{gp II}	Hlavní histokompatibilní komplex-glykoprotein II
MMPs	Metaloproteinázy
NK	Přirození zabíječi
NPHI	Nukleozid fosfohydroláza I
PDGF	Růstový faktor krevních destiček
PI ₃ K	Fosfatidylinositol-3 kináza
pRB	Retinoblastoma protein
p53	Protein 53
ROS	Reaktivní kyslíky (radikály)
R-Smads	Receptorem-regulované Smads
SARA	SMAD kotva pro aktivaci receptorem
sTβRII	Rozpustný receptor typu II pro transformující růstový faktor β
TGF _α	Transformující růstový faktor α
TGF _β	Transformující růstový faktor β
TH ₁	Pomocné T lymfocyty 1
TH ₂	Pomocné T lymfocyty 2
TK	Tymidin kináza
TβRI	Receptor typu I pro transformující růstový faktor β
TβRII	Receptor typu II pro transformující růstový faktor β
sTβRII-Fc-Jun	Fúzní protein rozpustného TβRII-Fc-Jun
TβRIII	Receptor typu III pro transformující růstový faktor β
VEGF	Vaskulární endoteliální růstový faktor
VGf	Virový růstový faktor
VACV	Vaccinia virus
WR	Western Reserve

Obsah

1. Úvod.....	11
2. Přehled literatury.....	13
2.1. Virus vakcinie	13
2.1.1. Úvod	13
2.1.2. Struktura	13
2.1.3. Životní cyklus.....	14
2.1.4. Transkripce.....	16
2.1.5. Replikace	17
2.1.6. Interakce s hostitelskou buňkou	18
2.1.6.1. Cytopatický efekt	18
2.1.6.2. VACV vs. imunitní systém.....	18
2.1.7. Rekombinantní vektory odvozené od VACV	19
2.2. Receptor typu II pro transformující růstový faktor β (T β RII)	21
2.2.1. Charakteristika TGF β	21
2.2.2. Charakteristika TGF β receptorů.....	22
2.2.3. Role TGF β při nádorové transformaci.....	24
2.2.3.1. Mutace v TGF β signální dráze	24
2.2.3.2. Potlačení protinádorové imunitní odpovědi	25
2.2.3.3. Podpora angiogeneze.....	26
2.2.4. Terapie nádorů pomocí blokování TGF β signální dráhy	27
2.3. Fc-IgG1 fúzní proteiny	29
2.3.1. Charakteristika Fc fragmentu IgG1	29
2.3.2. Fc fúzní proteiny.....	30
3. Materiál a metody	32
3.1. Materiál.....	32
3.1.1. Chemikálie.....	32
3.1.2. Enzymy	34
3.1.3. Standardy molekulových hmotností	34
3.1.4. Komerční soupravy	34
3.1.5. Roztoky a pufrы	35
3.1.6. Kultivační média.....	36
3.1.7. Protilátky	38
3.1.8. Syntetické oligonukleotidy.....	38
3.1.9. Plazmidy	38

3.1.10. Virové kmeny	38
3.1.11. Bakteriální kmeny	39
3.1.12. Buněčné linie.....	39
3.1.13. Pokusná zvířata	39
3.1.14. Speciální přístroje.....	40
3.2. Metody.....	40
3.2.1. Práce s DNA.....	40
3.2.1.1. Příprava kompetentních bakterií Escherichia coli	40
3.2.1.2. Transformace kompetentních bakterií plazmidem	41
3.2.1.4. Minipreparace plazmidové DNA- Alkalická metoda	41
3.2.1.5. Minipreparace plazmidové DNA- Boiling metoda.....	42
3.2.1.6. Maxipreparace plazmidové DNA- Alkalická metoda	42
3.2.1.7. Horizontální gelová elektroforéza	43
3.2.1.8. Štěpení DNA restrikčními enzymy a defosforylace štěpené DNA.....	43
3.2.1.9. Izolace DNA z gelu- pomocí DNA Lego kitu	43
3.2.1.10. Rychlá ligace- pomocí Rapid DNA Ligation kit	44
3.2.1.11. Klasická ligace	44
3.2.1.12. Purifikace plazmidové DNA izopyknickou centrifugací v CsCl.....	44
gradientu.....	44
3.2.1.13. Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA v roztoku	45
3.2.1.14. Srážení DNA	45
3.2.2 Práce s viry	45
3.2.2.1. Rekombinace do viru vakcinie	45
3.2.2.2. Selektce rekombinantních virů	46
3.2.2.3. Plaková purifikace	46
3.2.2.4. Příprava virové DNA pro PCR detekci rekombinant	47
3.2.2.5. Amplifikace DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR)	48
-pro detekci rekombinantních virů	48
3.2.2.6. Příprava rychlého virového koncentrátu.....	48
3.2.2.7. Plaková titrace	49
3.2.2.8. Sonikace viru	49
3.2.3. Práce s tkáňovými kulturami.....	49
3.2.3.1. Kultivace tkáňových kultur	49
3.2.3.2. Zmrazování buněk do tekutého dusíku.....	50
3.2.3.3. Rozmrazování buněk z tekutého dusíku	50
3.2.3.4. Příprava buněčných lyzátů a médií pro SDS- PAGE	50
3.2.4. Práce s proteiny	51
3.2.4.1. SDS- Polyakrylamidová elektroforéza (SDS-PAGE)	51
3.2.4.2. Western Blot.....	51
3.2.4.3. Srážení proteinů.....	52

3.2.5. Testování buněčné imunitní odpovědi	52
3.2.5.1. Imunizace myší	52
3.2.5.2. Zpracování slezin	52
3.2.5.3. Stimulace splenocytů <i>in vitro</i>	53
3.2.5.4. Elispot pro IFN- γ	53
3.2.6. Protinádorové testy <i>in vivo</i>	53
4. Výsledky	55
4.1. Příprava rekombinantního viru vakcinie exprimujícího sT β RII-Fc-Jun protein.....	55
4.1.1. Klonování genu sT β RII-Fc-Jun	55
4.1.2. Příprava rekombinantního viru.....	58
4.2. Charakteristika sT β RII-Fc-Jun	60
4.2.1. Ověření vazby sT β RII-Fc-Jun na protein G	60
4.2.2. Porovnání exprese sT β RII-Fc-Jun a sT β RII pod různými promotory-detekce rozdílné velikosti receptorů	62
4.2.3. Exprese sT β RII-Fc-Jun a sT β RII pod různými promotory- detekce množství rekombinantního receptoru v médiích a lyzátech infikovaných buněk.....	63
4.3. Imunizační pokusy.....	64
4.3.1. Testování buněčné imunitní odpovědi po imunizaci virovými vakcínami	64
4.4. Pokusy <i>in vivo</i>	69
4.4.1. Účinek sT β RII-Fc-Jun na funkci protinádorové vakcíny při terapii TC-1 nádorů	69
5. Diskuze	73
5.1. Příprava rekombinantních virů	73
5.2. Charakteristika sT β RII-Fc-Jun	74
5.3. Imunizační pokusy.....	76
5.4. Pokusy <i>in vivo</i>	77
5.5. Immunoprecipitace sT β RII-Fc-Jun	79
5.6. Příprava sT β RII-Fc- Optimalizace PCR	79
6. Souhrn.....	81
7. Seznam použité literatury.....	82

1. Úvod

Rozvinuté nádory obsahují kromě maligních buněk i buňky nemaligní, jako jsou nádorové myofibroblasty, endoteliální a zánětlivé buňky, které tvoří okolí nádoru. Tyto buňky produkují velký počet růstových a regulačních faktorů, které mají pozitivní vliv na progresi nádorů a vytváří imunosupresivní prostředí, jež brání rozpoznání nádorových antigenů a znesnadňuje imunoterapii nádorů.

Jedním z těchto faktorů je TGF β produkovaný buňkami nádoru i buňkami nádorového okolí. TGF β slouží v časných stádiích karcinogeneze jako nádorový supresor, během růstu nádoru se však jeho funkce změní a stane se z něj nádorový promotor podporující imunosupresi, růst a šíření nádoru. Tento nádorový TGF β je možné neutralizovat zvýšenou lokální expresí rozpustného receptoru sT β RII, což má za následek zlepšení podmínek pro funkci protinádorových NK a T buněk.

Rekombinantní virus vakcinie patří mezi dobře prověřené vektory. Jeho výhody spočívají ve vysoké hladině exprese, časově omezené expresi transgenů, nízkému riziku inserce do hostitelského genomu a stimulaci humorální i buněčné imunity. Při terapii nádorů se tyto vektory používají pro indukci protilátek a T buněčné odpovědi proti nádorovým antigenům a také pro expresi faktorů ovlivňujících imunitní odpověď.

Oddělení experimentální virologie na Ústavu hematologie a krevní transfúze (ÚHK) se zabývá vývojem genetických vakcín pro terapii nádorů vyvolaných lidským papilomavirem 16 (HPV-16). Pro indukci imunitní odpovědi se ukázaly jako velmi účinné rekombinantní viry vakcinie obsahující gen pro E7 protein HPV-16. Pro zvýšení imunitní odpovědi lze do rekombinantního viru vložit vedle genu pro E7 protein i gen modulující okolí nádoru. Tímto genem může být sT β RII fúzovaný k Fc-Jun. Fc fragment IgG1 umožňuje zvýšení exportu produktu z buněk a vytvoření homodimeru pro lepší vazbu s ligandem. Jun (fragment z c-Jun) údajně blokuje vazbu sT β RII-Fc k Fc receptorům.

Cíle práce:

- Konstrukce rekombinantního VACV nesoucí gen pro sT β RII-Fc-Jun pod kontrolou E/L nebo H5 promotoru
- Charakterizace sT β RII-Fc-Jun
- Testování T-buněčné imunitní odpovědi specifické pro E7 peptid a VACV peptid

- Vliv koexpresce sTβRII-Fc-Jun na účinnost virové vakcíny P13-SigE7LAMP-TK při regresi nádorů *in vivo*.

2. Přehled literatury

2.1. Virus vakcinie

2.1.1. Úvod

Virus vakcinie (VACV) patří do skupiny poxvirů. Jsou to velké DNA viry replikující se v cytoplazmě buněk obratlovců i bezobratlých. Z lidských patogenů mají největší význam virus variola a virus molluscum contagiosum. Variola, zvaná též virus černých neštovic, byla rozšířena po celém světě, první zmínky o jejím výskytu jsou z roku 1122 př.n.l. z Číny. V roce 1980 byly černé neštovice světovou zdravotnickou organizací prohlášeny za eradikované (HENDERSON a MOSS 1999). V dnešní době se však stále pracuje na výrobě nové a bezpečné vakcíny proti poxvirům, protože hrozí zneužití viru černých neštovic v oblasti terorismu a také se objevují případy, kdy se lidé v oblastech Afriky nakazili zvířecími poxviry.

VACV byl jako první ze zvířecích virů mikroskopicky pozorován, přesně titrován, fyzicky purifikován a chemicky analyzován (MOSS 2001). Přesný původ VACV je neznámý.

2.1.2. Struktura

Zralé viriony mají tvar cihly o rozměru 350×270 nm. Povrchová, 30 nm silná vrstva ohraničená membránou obaluje homogenní bikonkávní core, po jehož stranách se vyskytují laterální tělíška. Existují tři druhy infekčních virových partikulí: IMV (intracelulární maturovaný virion), EEV (extracelulární obalený virion) a CEV (s buňkou asociovaný obalený virion).

Genom tvoří lineární dsDNA o velikosti kolem 190 kbp, která je na obou koncích kovalentně spojená. Obsahuje 10 kbp dlouhé invertované koncové repetice (ITR). Na koncích ITR se vyskytuje vlásenka, která je variabilní v délce delecí, repeticí a transpozicí. Otevřené čtecí rámce se nepřekrývají a zpravidla se vyskytují buď v centrální oblasti, pokud jsou vysoce konzervované a spojené s esenciálními replikačními funkcemi, nebo v koncových částech, pokud jsou variabilní a produkty jejich genů jsou spojené s interakcí s hostitelem. Infekční virová partikule obsahuje transkripční enzymy, které zajišťují syntézu a modifikaci mRNA.

2.1.3. Životní cyklus

Přestože VACV byl jako první z virů izolován a pozorován pod mikroskopem, jeho vstup do buňky není zcela objasněn. IMV vstupuje do buněk po fúzi s plazmatickou membránou nebo pomocí invaginačních váčků. EEV vstupuje do buněk endocytózou po disrupci vnější membrány, při které dojde k uvolnění IMV a k jeho fúzi s plazmatickou membránou. Vstup CEV se podobá EEV, pouze zůstává připojen na plazmatickou membránu rodičovské buňky a jeho šíření usnadňují aktinové mikrokylky.

VACV má široký hostitelský okruh a infikuje savčí buňky rozdílných typů, z čehož se usuzuje, že jeho receptor je exprimován většinou buněk a je vysoce konzervován či že existují rozdílné receptory na různých buňkách (CHUNG et al. 1998). Kandidáty na VACV receptor jsou proteoglykany, receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR) či chemokinový receptor. Bylo prokázáno, že se VACV A27L membránový protein váže na heparan sulfát (CHUNG et al. 1998). Dále bylo prokázáno, že se VACV D8L obalový protein váže na chondroitin sulfát (HSIAO et al. 1999). VACV kóduje VGF (virový růstový faktor), který je homologní k EGF (epidermální růstový faktor) a k TGF α (transformující růstový faktor α) (BULLE 1988). Bylo prokázáno, že obsazení EGFR inhibuje VACV infekci (EPPSTEIN 1985). Buňky infikované VACV produkují dva povrchové proteiny A33 a A36, které zabraňují superinfekci buňky a umožňují rychlejší šíření viru (DOCEUL et al. 2010).

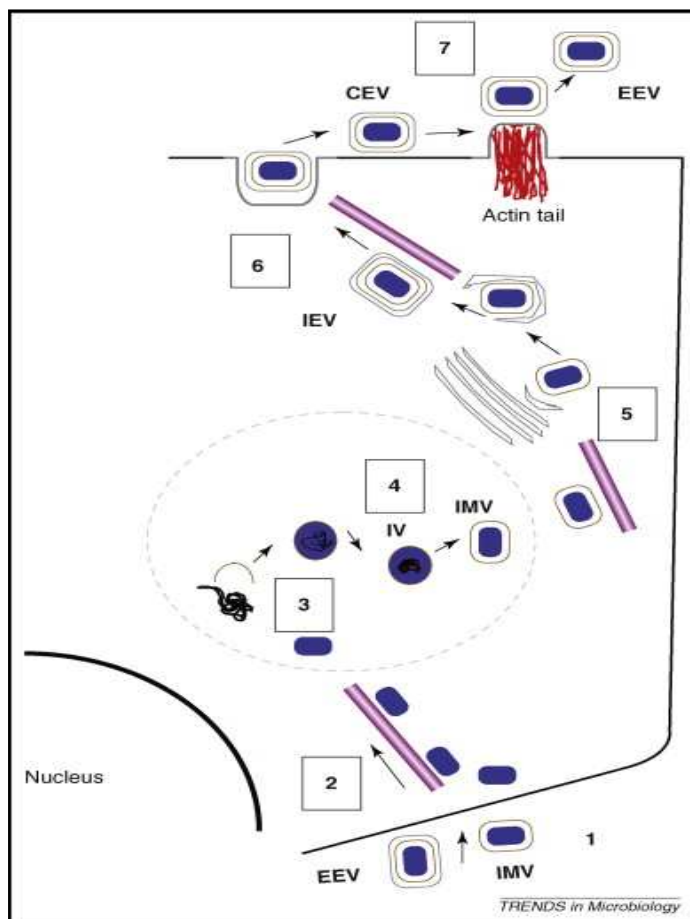
Po vstupu do cytoplazmy je virové core transportováno k blízkosti jádra, kde dochází k syntéze časně mRNA a k druhému rozbalení pomocí virem kódovaného proteinu. Poté dochází k replikaci virové DNA a k transkripci intermediárních a pozdních mRNA.

Formování virionu začíná tvorbou pŕlměsíčných membránových útvarů. O původu této membrány se vedou spory. Podle první hypotézy vznikla tato membrána *de novo* nejasným mechanismem, protože nebyla nalezena podobnost s žádnou z buněčných membrán. Jednou z možností vzniku této membrány je její syntéza na hydrofobním proteinovém lešení (honeycomb lattice), které bylo pozorováno deep-etch skenovacím elektronovým mikroskopem (HEUSER 2005). Podle druhé hypotézy je tato membrána odvozena z endoplazmatického retikula či Golgiho aparátu.

Pŕlměsíčné útvary se uzavřou do kruhovitěho tvaru za vzniku nematurovaných virionů (IVs) s hustou nukleoproteinovou hmotou vloženou do granulární matrix. Kulaté IVs se mění na intracelulární maturované viriony (IMVs) ve tvaru cihly.

IMVs se pohybují od místa vzniku k okraji buňky po mikrotubulech pomocí A27L membránového proteinu (SANDERSON et al. 2000). IMVs se uvolňují z buňky pouze po její lyzi, ale některé partikule jsou obaleny dalšími membránami odvozenými od trans-Golgi či pozdních endozómů, které obsahují virové proteiny. Tímto obalením vznikají intracelulární obalené viriony (IEVs) s 4 obalovými vrstvami.

IEVs jsou transportovány k periférii buňky po mikrotubulech za využití kinezi-
nu-1 (RIETDORF et al. 2001), tento proces vyžaduje VACV protein F12 (Zhang et al. 2000, EIJL et al. 2002) a je také ovlivněn proteinem A36 (RIETDORF et al. 2001, HERRERO-MARTÍNEZ et al. 2005). VACV protein F12 se svojí strukturou podobá lehkému řetězci kinezinu (MORGAN et al. 2010). IEVs fúzí s plazmatickou membránou a ztracují jednu vnější membránu. Uvolněné viriony se nazývají extracelulární obalené viriony (EEVs), nebo zůstávají asociované s buněčným povrchem a nazývají se s buňkou asociované obalené viriony (CEVs). CEVs umožňují přímé šíření z buňky do buňky pomocí aktinových klků, zatímco EEVs umožňují šíření viru na delší vzdálenosti (znázorněno na obrázku č.1). IMV a EEV obsahují rozdílné virové membránové proteiny a váží se na rozdílné buněčné receptory, čímž se zvyšuje okruh hostitelských buněk. Při maturaci jsou důležité biochemické modifikace (proteolýza, vznik disulfidických můstků, fosforylace).



Obrázek č.1: Přehled životního cyklu VACV

1) Virus vstupuje do buňky, dochází ke ztrátě vnější membrány a uvolnění virového core do cytoplazmy. 2) Virové core postupuje dále do buňky po mikrotubulech. 3) Dochází k transkripci časných mRNA, k rozbalení virového core a k DNA replikaci. 4) Vznikají nematurované viriony (IV), které se mění na IMV, ty se z buňky uvolňují po její lyzi. 5) Některé IMV jsou obaleny dalšími membránami odvozenými od časných endozómů či trans-Golgi, čímž dochází ke vzniku IEV. 6) IEV jsou transportovány po mikrotubulech k okraji buňky. 7) Vnější IEV membrána splyne s plazmatickou membránou a na povrch buňky se dostanou CEV, které mohou zůstat asociované s buňkou nebo se z povrchu buňky uvolní za vzniku EEV (Převzato z ROBERTS a SMITH 2008).

2.1.4. Transkripce

Enzymy pro transkripci genů jsou syntetizovány též v pozdní fázi infekce a zabaleny do virové partikule, proto může transkripce časných genů začít ihned po vstupu viru do buňky. Časné mRNA kódují enzymy a faktory pro transkripci intermediárních genů, syntézu DNA a interakci s hostitelskou buňkou. Při časně transkripci se přepíše cca polovina všech virových genů (ODA a JOKLIK 1967).

Promotor pro transkripci časných genů má sekvenci AAAAAATGAAAAAA/TA. Iniciace transkripce začíná 12-17 nukleotidů od promoto-

ru ve směru transkripce a je ATP dependentní. Transkripce končí 20- 50 bp za terminačním signálem TTTTNT a vyžaduje capping enzymy a NPHI (nukleozid fosfohydroláza I) (CHRISTEN et al. 1998). Virová RNAPol se podobá eukaryotické, skládá se z osmi podjednotek o velikosti 7- 147 kDa. S RNAPol asociuje protein RAP94 ve spojení s VETF. VETF (heteromerní protein skládající se ze 2 podjednotek) se váže na promotory časných genů a zajišťuje ATPázovou aktivitu. VETF a RAP94 jsou funkčními analogy buněčných proteinů TFIId a TFIIIf. Capping enzymový komplex je důležitý pro terminaci transkripce, vznik čepičky (cap) na 5' konci mRNA a plní funkci RNA trifosfatázy, RNA guanyltransferázy a RNA metyltransferázy. Enzym katalyzující vznik koncového polyA je heterodimer skládající se z 55 kDa a 39 kDa podjednotek VP55 a VP39.

Intermediární geny jsou exprimovány po replikaci virové DNA díky produktům časných genů. Bylo identifikováno 7 intermediárních genů, jejichž produkty jsou nutné pro expresi pozdních genů. Promotor obsahuje sekvenci TAAAT. Transkripce vyžaduje nově syntetizovanou RNA polymerázu bez RAP94 podjednotky a časné transkripční faktory. RNA pol nerozpoznává terminační signál, proto je 3' konec intermediárních mRNA heterogenní. Na transkripci intermediárních genů se podílí také buněčný protein VITF-2, u něhož dosud není znám mechanismus přesunu z jádra do cytoplasmy.

K transkripci pozdních genů dochází po expresi intermediárních genů. Produkty pozdních genů jsou stavební proteiny virionu a transkripční faktory pro geny časné. Promotor se podobá promotoru intermediárních genů. Transkripce vyžaduje nově syntetizovanou RNAPol bez RAP94 podjednotky a intermediární transkripční faktory. Na 5' konci pozdních mRNA je čepička s polyA-zaváděcí sekvencí vzniklou klouzáním RNAPol na TAAAT sekvenci promotoru.

2.1.5. Replikace

DNA replikace probíhá v cytoplazmě hostitelských buněk v blízkosti organizačního centra mikrotubulů. Začíná po transkripci časných genů cca 1-2 hodiny po infekci. VACV kóduje enzymy metabolismu DNA, mezi které patří tymidinkináza, tymidylát-kináza, ribonukleotid-reduktáza a dUTPáza.

Přesný mechanismus replikace není doposud znám, jedním z možných modelů je, že DNA replikace začíná zlomem v jedné či obou koncových vlásenkách, následuje přidávání nukleotidů na volný 3' konec, vytěšňování řetězce a vznik intermediárních kontaktemerů, které jsou spojeny zdvojenou vlásenkou a jejich rozštěpení je pravděpo-

dobně zajištěno virovou topoisomérázou 1 a nicking-joining enzymem (K4L) (ECKERT et al. 2005).

Virová DNA pol má celkovou hmotnost cca 110 kDa a kromě funkce polymerázy má také asociovanou 3' exonukleázovou aktivitu. Mezi další virové proteiny účastnící se replikace DNA patří DNA-nezávislá nukleozid trifosfatáza (D5R), serin-threonin kináza (B1R), uracil DNA glykosyláza (D4R), H5R a A20R genové produkty formující proteinový komplex (ISHII a MOSS 2002).

Uvnitř buněk infikovaných VACV dochází ve velké míře k homologní rekombinaci. Enzym katalyzující rekombinaci není dodnes znám, ale virem kódovaná DNA polymeráza má při rekombinaci významnou roli (GAMMON a EVANS 2009). Díky nerovnoměrnému crossing-overu dochází k variabilitě v počtu tandemových repetit, k delecím a translokacím. Homologní rekombinace se využívá při tvorbě rekombinantních vektorů odvozených od VACV.

2.1.6. Interakce s hostitelskou buňkou

2.1.6.1. Cytopatický efekt

V infikovaných buňkách dochází k morfologickým a metabolickým změnám, které se nazývají cytopatický efekt. Mezi morfologické změny patří změna v permeabilitě membrány či změny v cytoskeletu vedoucí k zakulacení buněk a ke vzniku syncytií. VACV také indukuje pohyb infikovaných buněk (SANDERSON et al. 1998). Přibližně 24 hodin po infekci dochází k lyzi infikovaných buněk.

2.1.6.2. VACV vs. imunitní systém

Hostitelský imunitní systém může zastavit šíření virové infekce mnoha mechanismy, kterým se viry snaží čelit různými způsoby. Bezprostředně po proniknutí viru do organismu se aktivují nespecifické imunitní reakce zahrnující interferony, komplement, cytokiny a NK buňky. Aktivace NK buněk pomocí poxvirů není stále dostatečně prozkoumána, ale nedávné výsledky ukazují, že VACV může přímo aktivovat TLR2 receptory NK buněk, což je nezbytné pro jejich správnou funkci (MARTINEZ et al. 2010). Následně dojde k aktivaci cytotoxických T lymfocytů a také k tvorbě protilátek.

Virové obranné mechanismy se dají rozdělit do 3 tříd. Mezi první patří produkce virokinů, které napodobují cytokiny a jiné regulační molekuly imunitního systému. Do druhé třídy patří produkce viroreceptorů, které se podobají buněčným receptorům, ale

ztratily transmembránovou kotvící sekvenci. Do třetí třídy patří intracelulární proteiny, které interferují s buněčnými signálními drahami.

Protein	Typ modulace	Mechanismus
A18R	Inhibice syntézy IFN	Regulace produkce dsRNA
B18R	IFN receptor	Rozpustný IFN α/β receptor
VH1	Inhibice IFN signalizace	Fosfatáza ruší aktivaci Stat1
E3L	Blokace funkce proteinů indukovaných IFN	Vazba dsRNA a blokace Pkr
A46R A52R	Inhibice TLR4 a Il-1 signální transdukce	Strukturně podobné Toll-like a Il-1 receptorům

Tabulka č.1: Příklad VACV proteinů modulujících imunitní systém hostitele

Infekce VACV inhibuje také maturaci dendritických buněk blokováním signální transdukční kaskády či cytokinové stimulace, snižuje počet MHCgp I na povrchu buněk a ovlivňuje apoptózu infikovaných buněk genem SPI-2/ B13R2 (serpin, homolog CrmA), který má vliv na aktivitu kaspáz.

2.1.7. Rekombinantní vektory odvozené od VACV

V dnešní době není hlavní překážkou genové terapie nedostatek terapeutických genů, ale nedostatek vhodného systému pro doručení těchto genů do cílových buněk. Nejlepším systémem pro přenos terapeutických genů jsou dnes viry, které mohou být manipulovány k expresi těchto genů či ke specifické replikaci v hostitelských buňkách. Pro přechodnou transgenní expresi se používají virové vektory odvozené od adenovirů či VACV a pro trvalou transgenní expresi vektory odvozené od retrovirů či AAV (adeno-associated virus).

VACV byl téměř 200 let používán na vakcinaci proti černým neštovicím a dnes je jednou z nejlépe charakterizovaných virových vakcín. VACV má řadu výhodných vlastností jako jsou - široký hostitelský okruh, vysoká míra exprese, kapacita pro vkládání velkého množství DNA (25 kbp), nedochází k vložení do hostitelského genomu, relativně snadné vytvoření a izolace rekombinantních virů. Tyto vlastnosti vedly k využití VACV jakožto expresního vektoru. Rekombinantní VACV mají vlastnosti živých oslabených vakcín, prezentují antigeny přirozeným způsobem a stimulují humorální i buněčnou imunitu. CTL aktivita je ovlivněna volbou promotoru, při použití pozdních promotorů stimulují antigeny protilátkovou odpověď, ale nedochází k asociaci

proteinů s MHCgpI pro rozeznání CTL, protože VACV inhibuje syntézu buněčných proteinů, mezi které patří i proteiny důležité pro vznik komplexu MHCgpI- antigen na povrchu buňky. Při použití časných promotorů dochází k aktivaci cytotoxických T lymfocytů.

Genom VACV obsahuje 200 genů, z nichž přibližně 30% není esenciálních pro replikaci viru *in vitro*, ale mohou ovlivnit virulenci *in vivo*. Při tvorbě rekombinantních virů nelze přímo zavést cizí DNA do genomu VACV, protože je příliš velký a purifikovaná virová DNA je neinfekční. Vhodné buňky je nutno transfekovat purifikovaným plazmidem a koinfikovat rodičovským virem. Přenos cizího genu z plazmidu do viru probíhá homologní rekombinací uvnitř infikovaných buněk. Exprese genu musí být řízena virovým promotorem, protože VACV si kóduje vlastní polymerázu. Pro vysoký stupeň exprese se používá promotor pozdních genů kódující hlavní strukturní proteiny (např. 11 kD protein), umělé promotory či hybridní systém založený na T7 RNA polymeráze. Inzerční místa se nacházejí nejvíce na koncích genomu, centrální oblast je více konzervovaná a obsahuje esenciální geny, ale i zde se nachází několik neesenciálních genů vhodných pro inzerci. Nejvíce se pro rekombinaci využívá gen pro tymidin kinázu (TK).

Mezi nejvíce používané kmeny VACV pro vznik rekombinantních vektorů patří laboratorní kmen Western Reserve (WR), vakcinační kmeny Kodaň, Wyeth, Lister, oslabené deriváty Lister, NYBH a Modifikovaný virus Ankara (MVA).

K přípravě bezpečných vakcín se deletují či inaktivují geny, které ovlivňují virulenci. Např. u kmene Kodaň dala delece 18 genů vznik vysoce oslabenému typu NYVAC. Jiným přístupem pro vznik vysoce oslabených vakcín je pasážování *in vitro*, např. MVA má mnohonásobné delece díky více než 500 pasážím na buňkách kuřecích embryí (MAYR et al. 1978). Využívá se také vložení cizího genu do TK VACV, což vede ke snížení virulence.

Rekombinantní VACV se také využívají při terapii nádorů. Vyvíjejí se buď nádorové vakcíny, jejichž imunostimulační vlastnosti iniciují imunitní odpověď proti nádorovým buňkám, nebo onkolytické viry, které jsou specificky cíleny do nádorových buněk. Onkolytické viry se mohou používat v kombinaci s malými molekulami, a nebo se v poslední době také zkoumá využití komplementační virové terapie kombinující dva různé viry např. VACV a virus vezikulární stomatitidy (Le BOEUF and BELL 2010). Využití VACV jako vektoru pro genovou terapii je např. zvýšení imunogenicity transfekovaných buněk melanomu, kdy rekombinantní virus exprimoval fúzní produkt

ER cílového signálu a HLA-A201 vazebného 27-35 peptidu, infekce buněk melanomu tímto rekombinantním virem měla za následek zvýšení CTL odpovědi *in vitro* (SCHUTZ et al. 2001). Dalším příkladem je rekombinantní VACV exprimující protein p53, který po transfekci do gliomových buněk způsoboval vysoký stupeň apoptózy (TIMIRYASOVA et al. 2001).

Divoký VACV není specifický pouze vůči nádorovým buňkám, pro zvýšení této specifity musí být modifikován. Jednou z možností zvýšení pro-nádorové specifity je delece TK genu. TK je konstitutivně exprimována v nádorových buňkách, zatímco v ostatních buňkách vzniká pouze během S a G₂ fáze buněčného cyklu.

Mezi další protinádorové metody patří „Gene-direct enzyme pro-drug therapy“ (GDEPT). Tato terapie zahrnuje naklonování enzymu do viru cíleného na nádory, poté je doručena pro-drug, kterou tento enzym aktivuje, tím dojde k uvolnění cytotoxické látky do okolí nádoru. Mezi dva nejvýznamnější systémy patří herpes simplex virus tymidin kináza-ganciclovirový systém a cytosin deamináza-5-fluorocytosinový systém, kdy je gen pro cytosin deaminázu vložen do VACV (převzato z THORNE et al. 2005).

2.2. Receptor typu II pro transformující růstový faktor β (T β RII)

2.2.1. Charakteristika TGF β

Transformující růstový faktor β (TGF β) byl poprvé identifikován v kultuře transformovaných myších fibroblastů a pojmenován podle schopnosti podporovat na podložce nezávislý růst buněčných linií (DE LARCO a TODARO 1978).

Skupina TGF β se skládá z cca 30 strukturně podobných proteinů, do které patří izoformy TGF β , růstové diferenciační faktory, morfogenetické proteiny kostí, aktiviny, inhibiny a neurotrofní faktory. TGF β je multifunkční regulátor, inhibuje buněčný růst, způsobuje apoptózu, stimuluje produkci extracelulární matrix, reguluje proliferaci, migraci buněk a ovlivňuje buňky imunitního systému. Deregulace jeho signální dráhy způsobuje mnoho lidských onemocnění, mezi které patří fibrózy, autoimunitní onemocnění a vznik nádorů.

Jsou známy 3 lidské izomery TGF β (TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3), které sdílejí 75% homologie v aminokyselinové sekvenci, ale vykonávají rozdílné funkce. Monomerní formu TGF β tvoří 4 antiparalelní β -řetězce a 3 intramolekulární disulfidické můstky tvořící cystinový uzel. Monomery jsou spojeny přes N-terminální cystein do funkčního homodimeru či heterodimeru.

TGF β je kódován ve formě prekurzoru, který obsahuje N-koncový signální peptid (20-30 AMK) pro sekreci z buněk, centrální oblast nazývaná se latentně asociovaný protein (LAP) a 112-114 AMK C-terminální oblast, ze které se proteolytickým štěpením stane maturovaná TGF β molekula. Během sekrece je LAP odštěpen od TGF β , ale zůstává k TGF β nekovalentně asociován. Komplex LAP-TGF β se kovalentně váže k latentnímu TGF β -vazebnému proteinu (LTBP) (TAIPALE et al.1995). Komplex LAP-TGF β -LTBP se váže na extracelulární matrix (HYTTIAINEN et al. 1998). LTBP plní v komplexu funkci lokalizace (váže se k extracelulární matrix), LAP funkci detekce (spouští se přes něj aktivační mechanismus) a TGF β funkci efektoru. Aktivátory TGF β mohou být proteázy, integrin $\alpha_v\beta_6$, reaktivní kyslíky (ROS) a nízké pH (převzato z ANNES et al. 2003).

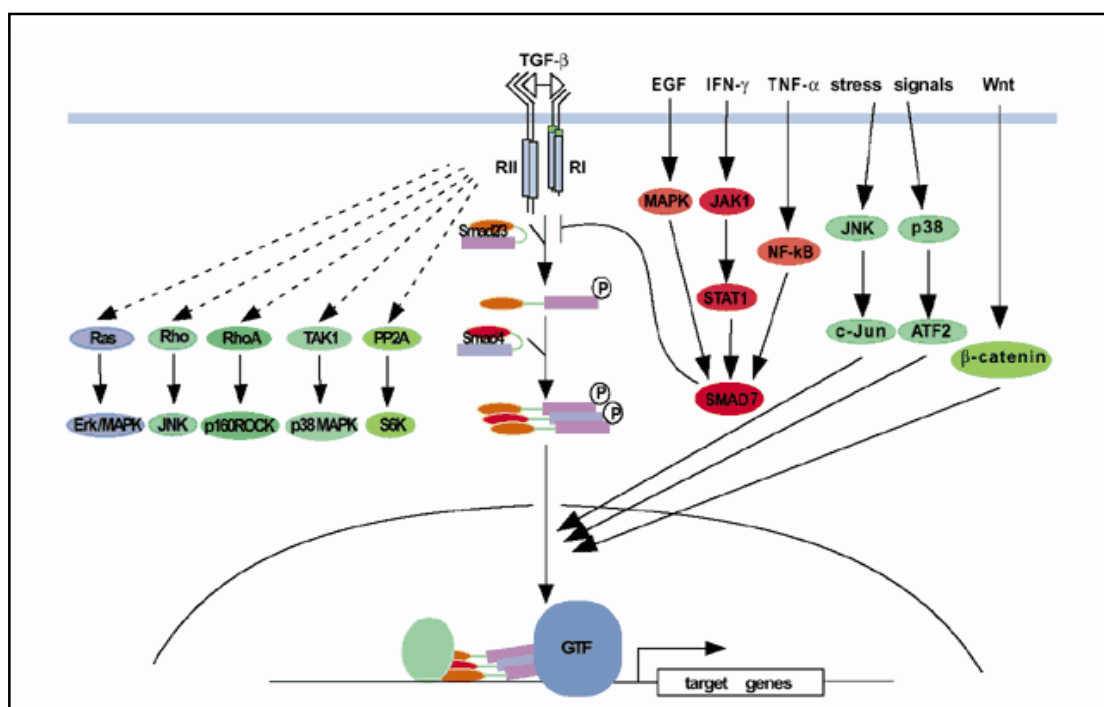
2.2.2. Charakteristika TGF β receptorů

Existují tři typy TGF β receptorů. TGF β 1 a TGF β 3 se váží s vysokou afinitou ke všem třem typům receptorů, zatímco TGF β 2 se váže s vysokou afinitou pouze k T β RIII. Typ I (T β RI) a typ II (T β RII) jsou transmembránové serin/threonin kinázy, vazbou TGF β se spojí do multimerních receptorů, nejčastěji heterotetramerů. T β RI má na rozdíl od T β RII v transmembránové doméně oblast bohatou na glycin a serin (GS doména). Mezi T β RIII patří betaglykan a endoglin, jež postrádají kinázovou aktivitu a mají pouze regulační vlastnosti. Betaglykan pomáhá T β RI a T β RII rozpoznávat TGF β . Endoglin se převážně nachází na proliferujících endoteliálních buňkách, jeho přesná funkce není známá, ale má vliv na signalizaci přes TGF β receptory (LEBRIN et al. 2004).

První objevená TGF β signální dráha vede přes Smad proteiny. Začíná vazbou TGF β na T β RII, který fosforyluje GS oblast na T β RI. Aktivní ALK5 (activin-like kinase) T β RI fosforyluje R-Smads (receptorem-regulované Smads- Smad2 a Smad3) a uvolňuje je z cytoplazmatických kotvících proteinů jako je např. SARA (SMAD kotva pro aktivaci receptorem). Fosforylované R-Smads tvoří heteromultimerní komplex s co-Smads (běžné-zprostředkovávající Smads - Smad4) a vstupují pomocí importinu β do jádra, kde ovlivňují transkripci cílových genů (znázorněno na obrázku č.2). Mezi cílové geny patří např. INK4B kódující p15 (Li et al. 1995) a WAF1 kódující p21 (El-bendary et al. 1994). p15 a p21 jsou inhibitory cyklin dependentní kinázy (CDK). Inhibice CDK blokuje fosforylaci pRB (retinoblastoma protein), čímž dojde k zastavení buněčného cyklu v G1 fázi.

Smad signální dráha je regulována na mnoha úrovních, jednou z regulací je zpětnovazebná inhibice, kdy Smad komplex aktivuje geny pro inhibiční Smad (Smad6, Smad7), které blokují vazebné místo pro R-Smad na aktivovaném T β RI. Smad7 váže také ubiquitin-ligázu Smurf, která směřuje receptory do proteazómu. Inhibiční Smad mohou být aktivovány také extracelulárními ligandy (např. INF- γ). Na inhibici a regulaci signalizace se dále podílí řada intracelulárních faktorů.

Mezi další signální dráhy patří ERK (extracelulární signál-regulující kináza), JNK (c-Jun NH₂-terminální kináza), MAPK (p38 mitogenem-aktivovaná protein kináza), PI₃K (fosfatidylinositol-3 kináza) a Rho GTPáza (převzato z Derynck et al. 2001), (znázorněno na obrázku č.2).



Obrázek č.2: TGF β signalizace

Po aktivaci receptoru vazbou TGF β dojde k přechodné interakci Smad2 a Smad3 s T β RI, kterou stabilizuje protein SARA. T β RI fosforyluje C konec Smad2 a Smad3, které se poté uvolní z receptoru a vytvoří heteromerní komplex se Smad4. Tento komplex translokuje do jádra, kde ovlivňuje expresi řady genů. Smad7 inhibuje aktivaci Smad2 a Smad3. Exprese Smad7 je indukována stimulací jedné z mnoha signálních drah, např. v odpovědi k EGF, IFN- γ , TNF- α . Smad signální dráhu reguluje několik dalších signálních drah, např. stresovými signály aktivovaná JNK a p38 MAP kinázová signalizace či β -catenin signalizace indukovaná Wnt proteiny. TGF β také indukuje aktivaci Ras, RhoB, RhoA, TAK1 a protein fosfatázy 2A, které vedou k aktivaci několika MAPK drah (převzato z DERYNCK et al. 2001).

2.2.3. Role TGF β při nádorové transformaci

TGF β má při karcinogenezi dvojí roli, v časně fázi slouží jako nádorový supresor, během růstu nádoru přestanou být nádorové buňky citlivé k inhibičním signálům TGF β díky mutační inaktivaci nebo deregulaci nějaké z části TGF β signální dráhy a samy buňky produkují velká množství TGF β . Tento TGF β potom slouží jako nádorový promotor, stimuluje angiogenezi, imunosupresi a syntézu extracelulární matrix, která poskytuje nádoru vhodné mikroprostředí pro rychlý růst a metastáze. Také způsobuje epiteliální-mezenchymální transformaci (EMT), při které dochází ke ztrátě epiteliálních vlastností buněk a změně na migrační fenotyp (převzato z GOTZMANN et al. 2004), (znázorněno na obrázku č.3). Je známo, že TGF β signální dráha vedoucí přes Smad proteiny vede k supresi nádorů, zatímco TGF β signální dráhy nezávislé na Smad proteinech podporují karcinogenezi (převzato z NAGARAJ a DATTA 2010).

Dvojí role TGF β byla jasně prokázána pokusem, kdy vysoká exprese TGF β v keratinocytech zpočátku inhibovala vznik nádorů vyvolaných chemickým karcinogenem, ale později způsobovala progresi nádoru (CUI et al. 1996).

2.2.3.1. Mutace v TGF β signální dráze

Signální dráha TGF β , která vede k inhibici růstu a apoptotóze, je u nádorů přerušena mutacemi. Ve většině případů se jedná o mutace sporadické, řídce se objevují i mutace germinální vedoucí k nádorovým predispozicím. U většiny nádorů ale zůstávají nějaké komponenty TGF β signální dráhy funkční a mohou významně ovlivňovat karcinogenezi.

Mutace v T β RI se u nádorů nacházejí jen velmi zřídka. Mutovaný T β RI se vyskytuje u nádorů hlavy a krku, kdy dochází k hypermetylaci DNA (MUNOZ-ANTONIA et al. 2009).

T β RII je často mutován ve specifické mikrosatelitní sekvenci u colorektálních nádorů a nádorů žaludku, k mutaci dochází inzercí či delecí 1-2 adeninů v 10 bp polyadeninovém traktu v extracelulární doméně T β RII (LU et al. 1996). Tato mutace vede ke snížení stability mRNA, a pokud dojde k translaci, vznikne zkrácený neaktivní receptor. Mutace v T β RII se nacházejí např. také u nádorů prsu (SUN et al. 1994), plic (DE JONGE et al. 1997), krku a hlavy (GARRIGUE-ANTAR et al. 1995).

Geny pro Smad2 a Smad4 se nacházejí na chromozomu 18q21, tato oblast často prodělává alelické ztráty v mnoha typech nádorů. Smad4 je homozygotně deletován v 50% pankreatických nádorů (v 90% případů se tyto mutace vyskytují na chromozomu

18q), v 10% všech colorektálních nádorů a ve 30 % metastázických colorektálních nádorů, kde ztráta Smad4 vede ke změně funkce TGF β z nádorového supresoru na nádorový promotor (MIYAKI et al. 1999, ZHANG et al. 2009). U jiných nádorů byl mutovaný Smad4 nalezen s menší frekvencí.

Mutovaný Smad2 byl nalezen např. u nádorů colorektálních (EPPERT et al. 1996), nádorů plic (UCHIDA et al. 1996) a děložního čípku (MALIEKAL et al. 2003). Ztráta exprese Smad3 byla pozorována u nádorů žaludku a T buněčné lymfoblastické leukémie (převzato z LEVY a HILL 2006). Při pokusu na myších vedl mutovaný Smad3 ke vzniku colorektálních nádorů (KU et al. 2007).

Nadměrná exprese inhibičního Smad7 byla pozorována u nádorů endometria a štítné žlázy (převzato z MASSAGUE 2008).

2.2.3.2. Potlačení protinádorové imunitní odpovědi

Sekrece TGF β nádorovými buňkami či buňkami okolí nádoru potlačuje protinádorovou imunitní odpověď. Hlavním cílem jsou T lymfocyty, které mohou během imunitní odpovědi diferencovat v cytotoxické T lymfocyty (CTL) či pomocné T lymfocyty (Th₁ a Th₂). U TGF β 1 deficientních myší se objevily spontánně aktivované T lymfocyty a tyto myši umíraly na masivní záněty orgánů (DIEBOLD et al. 1995).

Jeden z prvních pokusů, dokazujících potlačení CTL produkcí TGF β , bylo zjištění, že buňky fibrosarkomu sekretující TGF β jsou rezistentní k CTL (TORRE-AMIONE et al. 1990). Thomas a Massaqué (2005) zjistili, že TGF β potlačuje vznik granzymu A, granzymu B, perforinu, FasL a IFN γ , to znamená molekul důležitých pro cytotoxickou odpověď. Nejdůležitější je ale inhibice proliferace T lymfocytů díky snížení exprese interleukinu 2. Je také známo, že TGF β má pozitivní vliv na vývoj regulačních T lymfocytů (T_{reg}). V nádorech bylo působením TGF β zjištěno zvýšené množství T_{reg}, které potlačovaly aktivitu CTL a NK buněk (WOLF et al. 2003, CURIEL et al. 2004).

Dalším imunosupresivním působením TGF β je snížení aktivace T lymfocytů díky negativnímu efektu na antigen prezentující buňky (APC), např. inhibuje maturaci dendritických buněk během imunitní odpovědi (STROBL a KNAPP 1999). TGF β inhibuje expresi MHCgp II inhibicí exprese transaktivátorů II. třídy přes Smad3-dependentní mechanismus (DONG et al. 2001). Také CD8⁺ T lymfocyty produkují pod vlivem TGF β velké množství IL-17, který brání apoptóze nádorových buněk (NAM et

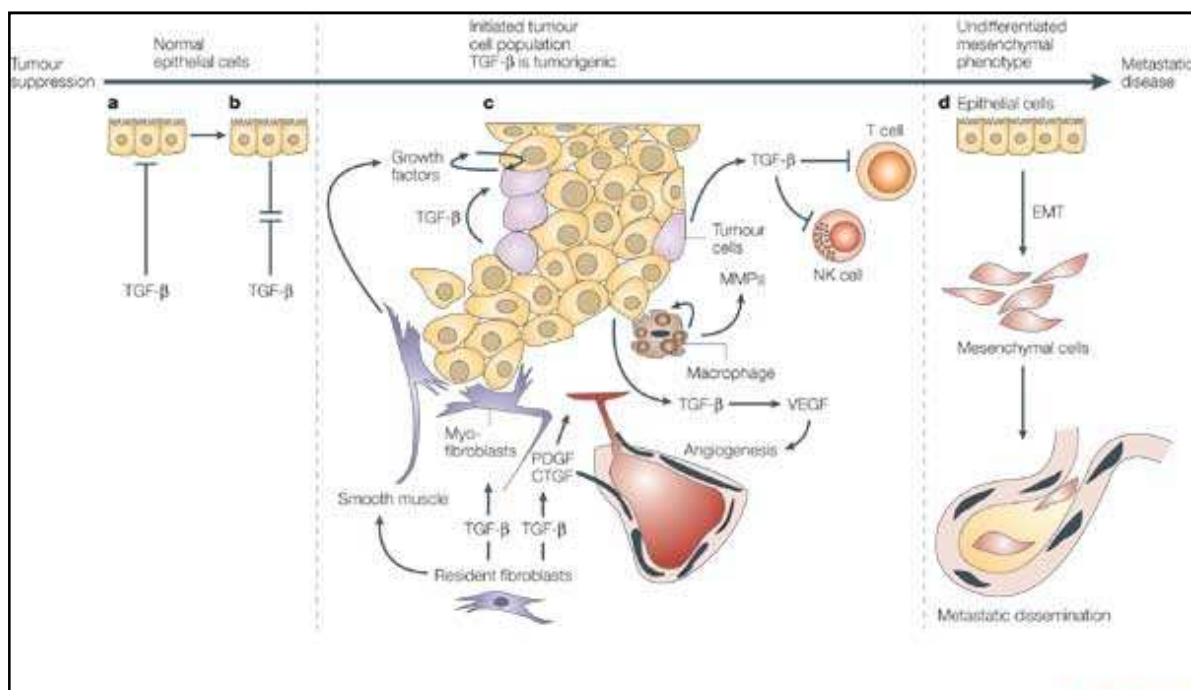
al. 2008a). IL-17 má v karcinogenezi komplikovanou roli, vedle pronádorových funkcí může sloužit i jako nádorový supresor (KRYCZEK et al. 2009).

TGF β může zastavit stimulované B lymfocyty v G1 fázi buněčného cyklu (BOUCHARD et al. 1994) a inhibovat přesmyk membránově vázaných imunoglobulinů na imunoglobuliny sekretované (KEHRL et al. 1991).

Hlavním zdrojem velkého množství TGF β v okolí nádoru jsou Gr-1⁺CD11b⁺ nematurované myeloidní buňky (GHIRINGHELLI et al. 2005, YANG et al. 2008).

2.2.3.3. Podpora angiogeneze

Angiogeneze je nezbytná pro růst nádorů, jejich invazi a metastáze. TGF β podporuje expresi několika angiogenních faktorů jako jsou např. VEGF (vaskulární endoteliální růstový faktor) a CTGF (růstový faktor pojivových tkání). Při studiích několika nádorů byl prokázán pozitivní vliv TGF β na angiogenezi, např. rozpustné T β Rs, které vychytávaly TGF β u myši s nádorem prsní žlázy, snižovaly vznik metastáz v plicích (BANDYOPADHYAY et al. 1999, MURAOKA et al. 2002).



Obrázek č.3: Role TGFβ v nádorovém okolí

a) Normální epiteliální buňky jsou citlivé k inhibičním signálům TGFβ, ale může dojít k iniciaci karcinogeneze a následně ke ztrátě citlivosti k TGFβ. b) Dojde ke zvýšené expresi TGFβ a ke změně jeho funkce, z nádorového supresoru se stane nádorový promotor. c) Pronádorový efekt TGFβ zahrnuje zvýšenou syntézu VEGF (vaskulární endoteliální růstový faktor) vedoucí k angiogenezi, potlačení funkce T a NK buněk, zvýšení produkce PDGF (růstový faktor krevních destiček) a CTGF (růstový faktor pojivových tkání) a produkci MMPs (metaloproteinázy), které přispívají k degradaci extracelulární matrix a invazi nádorových buněk. d) TGFβ přispívá k EMT (epiteliální-mezenchymální transformace) nádorových buněk umožňující migraci, extravazaci a šíření metastáz. Terapie cílená na TGFβ signální dráhu moduluje tyto pronádorové efekty TGFβ v buňkách nádoru a jeho okolí. (převzato z Yingling et al. 2004).

2.2.4. Terapie nádorů pomocí blokování TGFβ signální dráhy

Jedním ze způsobů, jak kontrolovat růst nádoru a metastáze, je blokování TGFβ signální dráhy v pokročilých stádiích karcinogeneze. Používání TGFβ antagonistů je však riskantní díky dvojí roli TGFβ. U nádorů, kde stále slouží jako nádorový supresor, může dojít k urychlení růstu a vzniku metastáz. Tato terapie vyžaduje pečlivý výběr pacientů, měřítkem může být např. množství TGFβ v plazmě, nádorová exprese TβRII či nádorové predispozice.

V preklinických i klinických pokusech se dnes zkoumají rozpustné receptory, dominantní negativní receptory, monoklonální protilátky a antisense oligonukleotidy, které jsou přímo cílené na TGFβ, či malé molekuly inhibující funkce receptorových kináz.

První rozpustný receptor vznikl v roce 1989, kdy CAPON et al. vytvořili fúzní protein CD4:Fc. Rozpustný TGF β receptor byl poprvé vytvořen v roce 1998 a byl fúzovaný k Fc fragmentu (KOMESLI et al. 1998). Použití rozpustné extracelulární domény T β RII (sT β RII) při terapii mnoha nádorů myši vedlo ke snížení metastáz a inhibici angiogeneze. Např. transgenní myši exprimující fúzní protein sT β RII-Fc po intravenózním podání izogenních melanomových buněk nevyvinuly na rozdíl od kontrolních myší metastáze. Navíc celoživotní exprese sT β RII u těchto myší neovlivnila jeho regulační roli v normálních tkáních (YANG et al. 2002). sT β RII má přibližně 10krát nižší afinitu k TGF β než T β RII (LIN et al. 1995), což může být způsobeno monomerní formou rozpustného receptoru. Používá se tedy chimerický protein sT β RII-Fc, který má stejné vlastnosti jako přirozený receptor. Tento chimerický protein postrádá transmembránovou doménu T β RII, ale obsahuje cysteinové zbytky pantové oblasti těžkého řetězce IgG, díky nimž může být sekretován z buněk ve formě dimeru, viz kapitola 2.3. Nevýhodou použití sT β RII pro terapii nádorů je, že tento receptor je schopný vázat ze tří hlavních izoform TGF β pouze TGF β 1 a TGF β 3.

Dominantní negativní receptory (DNR) jsou zkráceny o intracelulární doménu a inhibují Smad signální dráhu, ale nemají vliv na p38MAPK, Rho-Rac, Erk či Jnk signální dráhu (převzato z ARTEAGA 2006). V modelu exprimujícím DNRII transgen v lidské buněčné linii nádoru prsu bylo pozorováno snížení metastáz (TANG et al. 2003), ale u nádoru kůže (GO et al. 1999) a prostaty (TU et al. 2003) byly metastáze zvýšeny.

Monoklonální protilátky proti TGF β redukují růst nádoru a metastáz díky obnovení imunitní odpovědi (ARTEAGA et al. 1993) či inhibicí angiogeneze. Po podání monoklonálních protilátek dochází v okolí nádoru ke zvyšování koncentrace aktivovaných CD8⁺ buněk produkujících perforiny, granzymy B a Fas ligandy (NAM et al. 2008b). Nevýhodou monoklonálních protilátek je však špatné pronikání do nádorových tkání.

Používání antisense TGF β vedlo v mnoha nádorech k obnovení imunitní odpovědi a pacienti byli více vnímaví k různým typům léčby (převzato z IYER et al. 2005). Např. v modelu ovariálního teratomu u myší vedlo podání antisense TGF β a IL12 k vyléčení 69% myší od nádoru (DORIGO et al. 1998). Výzkum antisense TGF β se nyní již nachází ve III. fázi klinických studií.

TGF β signální dráha se dá také blokovat pomocí malých inhibitorů kináz. Jejich funkcí je ATP-kompetitivní inhibice Alk5 (převzato z ARTEAGA 2006). Tato metoda je však méně selektivní než např. protilátky či antisense RNA.

Další metodou, jak blokovat TGF β , je například použití rekombinantního inhibitu-A, který snižuje expresi betaglykanu důležitého pro přenos TGF β signálu (LOOYENGA et al. 2010).

Inhibice TGF β signální dráhy, která pozitivně působí na šíření nádorů, má dobré výsledky v mnoha pokusech. Ovšem pro vznik bezpečných protinádorových léčiv bude nutné lépe objasnit změnu funkce TGF β v průběhu karcinogeneze.

2.3. Fc-IgG1 fúzní proteiny

2.3.1. Charakteristika Fc fragmentu IgG1

Fc fragment IgG se skládá z CH2 a CH3 domény těžkého řetězce IgG a z pantové oblasti (znázorněno na obrázku č.4). Lidské IgG se dělí na podtřídy IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. Myší IgG se dělí na podtřídy IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3. Jednotlivé podtřídy se liší počtem cystinových můstků v pantové oblasti a detaily struktury jednotlivých domén. Fc fragment lze z IgG uvolnit pomocí enzymu papainu.

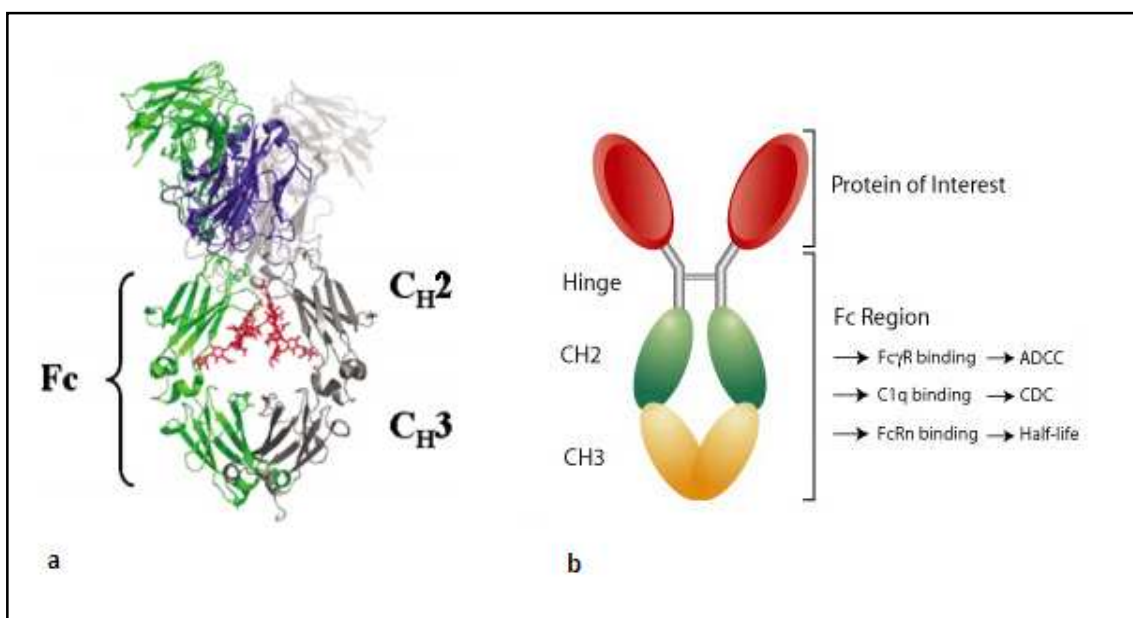
Fc fragment vyvolává na protilátkách závislou buněčnou cytotoxicitu (ADCC) a na komplementu závislou cytotoxicitu (CDC). Při ADCC se Fc fragment váže na receptor (Fc γ R), které se nachází na povrchu NK buňek, B lymfocytů, makrofágů, monocytů, neutrofilů a granulocytů, což vede k fagocytóze či lyzi cílové buňky. Signalizace přes Fc γ R může vést také k apoptóze cílových buněk. Při CDC se na Fc fragment váže C1 protein, dojde k sestavení komplementové kaskády a ke smrti buňky. Podtřídy IgG se liší schopností aktivovat ADCC a CDC. Lidský IgG1 zprostředkovává silnou ADCC i CDC, proto je vhodný pro terapeutické použití proti patogenům a nádorovým buňkám (převzato z <http://www.invivogen.com/family.php?ID=164#fcregion>). Myší Fc fragment IgG1 zprostředkovává pouze mírnou CDC a neaktivuje ADCC.

Fc fragment může být upravován za účelem snížení či zvýšení ADCC a CDC. Vazba IgG na Fc γ R či na C1 protein závisí na zbytcích v pantovém regionu a v CH2 doméně. Např. substituce v lidském IgG1 za IgG2 zbytky v pozici 233-236 a za IgG4 zbytky v pozici 327,330,331 snižuje ADCC i CDC. Bylo také provedeno mnoho mutací v CH2 doméně, např. mutace E333A zvyšovala ADCC i CDC (převzato z <http://www.invivogen.com/family.php?ID=164#fcregion>).

Glykosylace v konzervovaných asparaginových zbytcích CH2 domény je nezbytná pro vazbu na Fc γ R (SHIELDS et al. 2001), např. snížení množství fukózy vedlo ke zvýšení ADCC (SHIELDS et al. 2002).

2.3.2. Fc fúzní proteiny

Fc fragment se v genovém inženýrství používá pro vznik Fc fúzních proteinů, kterým uděluje řadu výhod. V dnešní době lze koupit několik druhů plazmidových vektorů pro konstrukci těchto proteinů. Tyto chimerické proteiny se skládají z efektorové oblasti proteinu (např. rozpustné receptory) fúzované k Fc fragmentu IgG (znázorněno na obrázku č.4).



Obrázek č.4: Znázornění IgG1 (a) a Fc IgG1 fúzního proteinu (b)

a) Lidské IgG1 se skládá ze 2 Fab fragmentů vázajících se přes pantovou oblast k Fc fragmentu. Fc fragment se skládá z CH2 a CH3 domén těžkého řetězce IgG a z pantové oblasti. **b)** Při tvorbě fúzních proteinů je protein našeho zájmu fúzován k Fc fragmentu. Pantová oblast je flexibilní spojka mezi dvěma částmi Fc fúzního proteinu a díky ní může každá část molekuly fungovat nezávisle (převzato z ANDERSEN a SANDLIE 2009, <http://www.invivogen.com/family.php?ID=184#fcregion>).

Jednou z výhod Fc fúzních proteinů je jejich snadná purifikace afinitní chromatografií pomocí proteinu A či proteinu G. Protein A silně váže všechny lidské IgG kromě IgG3. Protilátky se váží na protein A i G za neutrálních podmínek a mohou být vymyty například použitím pufru o nízkém pH (převzato z GHOSE et al. 2005).

Mezi další výhody patří zvýšení životnosti v cirkulačním systému díky vazbě k FcRn (neonatální Fc-receptor), který je exprimován na povrchu epiteliálních buněk a chrání Fc fragment před lyzozomální degradací. FcRn je příbuzný s MHCgp I a účastní se přenosu IgG z matky na dítě a regulace množství IgG v séru. K vazbě IgG na FcRn dochází v kyselém prostředí endozómu a IgG-FcRn je poté recyklován z lyzozómu zpět do cirkulace. Takto recyklovaný IgG má zvýšenou životnost v porovnání s ostatními proteiny v séru (převzato z GHETIE and WARD 2000). Úpravy Fc fragmentů pro lepší vazbu k FcRn zvyšují životnost IgG, což má řadu výhod (snížení dávek a nižší cena produktů) pro fúzní proteiny i terapeutické protilátky. Například mutace v IgG1 umožňující lepší vazbu k FcRn při pH 6 vykazuje 4x delší životnost v cirkulačním systému (DALL'ACQUA et al. 2006).

Fc fragment uděluje fúzním proteinům schopnost indukovat ADCC a CDC, které však mohou být pro některé terapeutické účely nežádoucí a potlačeny úpravami Fc fragmentu, viz kapitola 2.3.1.

Fc fragment také zvyšuje export fúzních proteinů z buněk a zajišťuje vznik homodimeru, což má např. u sTβRII-Fc za následek lepší vazbu ligandu. Protein je translatován jako monomer a tvoří disulfidické můstky díky cysteinovým zbytkům na Fc fragmentu, čímž vzniká aktivní homodimer, který je sekretován z buněk.

V dnešní době se na trhu vyskytuje 5 druhů farmaceutik využívajících výhod Fc fúzních proteinů. Strategie využívající fúzi rozpustného cytokinového receptoru k Fc fragmentu má také řadu preklinických i klinických úspěchů. Používají se např. rozpustné TNFR-Fc při léčbě řady zánětlivých onemocnění (převzato z GATTO 2006). Stejný přístup využívající sTβRII-Fc se zkoumá pro blokování TGFβ při léčbě řady nemocí a terapii nádorů, kdy dochází k potlačení vzniku metastáz. Také rekombinantní scFv protilátky fúzované k Fc fragmentu se chovají jako přirozené protilátky a mohou být využity ve více druhů organismů (MOUTEL et al. 2009).

3. Materiál a metody

3.1. Materiál

3.1.1. Chemikálie

Chemikálie:	Výrobce:
Aceton	Lachema
Agaróza GTG SeaKem	FCM
Agaróza LE SeaKem	FCM
Akrylamid	Serva
Amonium persulfát	Serva
Ampicilin	Amersham
Antibiotika (penicilin + streptomycin)	Sevapharma
Bacto-agar	Difco
Bovinní sérový albumin (BSA)	Sigma
Bromfenolová modř (BFB)	Serva
Bromdeoxyuridin (BUdR)	Sigma
Butanol	Lachema
Deoxycholát	Sigma
Dihydrogenfosforečnan draselný	Lachema
Dimetyl sulfoxid	Sigma
Disodná sůl kyseliny dietyltetraoctové (EDTA)	Sigma
Dodecylsíran sodný	Sigma
Etanol 96%	Lachema
Ethidium bromid (EtBr)	Sigma
Fenol	Sigma
Fetální bovinní sérum (FBS)	PAA
Fosforečnan sodný	Lachema
Gentamicin	Sigma
Glukóza	Sigma
Glycerol	Sigma
Glycin	Reanal
HISTOPAQUE 1077	Sigma

Hydrogenfosforečnan sodný	Lachema
Hydrogenuhlíčan sodný 7,5%	Sevapharma
Hydroxid sodný	Lachema
Hydroxychinolin	Fluka Chemie
Chloramfenikol	Léčiva
Chlorid cesný	Sigma
Chlorid sodný	Lachema
Chlorid vápenatý	Sigma
Chloroform	Lachema
LB Broth	Amersham
L-glutamin	Sigma
N,N,N',N' - Tetrametylendiamin (TEMED)	Serva
Neutrální červeň	Sigma
Octan draselný	Sigma
Octan sodný	Sigma
Persulfát amonný (APS)	Serva
Polyetylglykol 6000, 8000 (PEG)	Sigma
Polyoxyetylsorbitan monolaurát (Tween 20)	Sigma
Ponceau-s	Sigma
RPMI- 1640	Sigma
Sacharóza	Sigma
Síran hořečnatý	Sigma
Tris-(hydroxymetyl)-aminometan (Tris)	Sigma
Trypsin (2%)	Sevapharma
Verzen	Sevapharma
dNTP's	Sigma
2- merkaptoetanol	Serva
4-(2-Hydroxyetyl)-1-piperazinetansulfonová kyselina (HEPES)	Sigma

3.1.2. Enzymy

Proteináza K	Amersham
Ribonukleáza A (Rnáza A)	Amersham
Shrimp alkalická fosfatáza (SAP kináza)	Progema
Taq DNA polymeráza	BioLabs
T4-DNA ligáza	Boehringer

Restrikční endonukleázy

EcoRI	BioLabs
HindIII	BioLabs
SalI	BioLabs
XbaI	BioLabs
XhoI	BioLabs

Pufry

NEBuffer EcoRI	BioLabs
NEBuffer 2	BioLabs
NEBuffer 3	BioLabs
10x SAP pufr	Progema
10x Taq polymeráza pufr	BioLabs
10x T4-ligáza pufr	Boehringer

3.1.3. Standardy molekulových hmotností

Marker High	1500 – 10000 bp	Fermentas
Marker Low	80 – 1031 bp	Fermentas
Protein Marker	Broad Range	Biolabs
6x Loading (nanášecí) pufr		Fermentas

3.1.4. Komerční soupravy

DNA Lego kit	Top-Bio
ECL Detection Reagents Kit	Amersham
Rapid DNA Ligation Kit	Roche

3.1.5. Roztoky a pufry

Acetátový pufr (0,1 M)	37 ml kyselina octová (0,2 M); 88 ml octan sodný (0,2 M); 750 ml H ₂ O; pH 5
Blokovací roztok pro western blot	1x PBS; 5% sušené mléko
Blotovací roztok	40 ml 10x blotovací pufr; 100 ml etanol; 360 ml H ₂ O
Blotovací pufr 10x	14 mM Tris; 39 mM glycin; 1,3 mM SDS
Fenol-chloroform- isoamylalkohol	25 dílů fenol; 24 dílů chloroform; 1 díl isoamylalkohol; dvě zrnka hydroxychinolinu; smíchat a nechat ustát
Fosfátový pufr HeBs (2x)	0,1 M Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O; pH 9 0,28 M NaCl; 0,5 M HEPES; 1,5 M Na ₃ PO ₄ ; pH 7,1; v ddH ₂ O
Roztok pro SDS-PAGE dělicí gel (10%)	3 ml 30% akryl-bisakrylamid mix (29 g akrylamid + 1 g N',N'- bisakrylamid); 4 ml H ₂ O; 2,5 ml Tris (1,5 M, pH 8,8); 100 µl 10% SDS; 100 µl 10% amonium persulfát; 20 µl TEMED
Roztok pro SDS-PAGE zaostřovací gel (5%)	1ml 30% akryl-bisakrylamid mix; 4 ml H ₂ O; 750 µl Tris (1M, pH 6,8); 60 µl 10% SDS; 60 µl 10% amonium persulfát; 10 µl TEMED
Laemmli pufr	60 mM Tris-HCl, pH 6,8; 25% glycerol; 2% SDS; 14,4 mM 2-merkaptoetanol; 0,1 % bromfenol blue
Lyzační pufr NP 40	50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 150 mM NaCl; 1% NP40
Lyzovací roztok s proteinázou K	50 mM Tris-Cl, pH 8,0; 1% SDS; 5 mM EDTA, pH 8,0; proteináza K 200 µg/ml
Médium A	LB; 10 mM MgSO ₄ ; 0,2 % glukóza (roztok přefiltrovat)
Médium B	LB; 12% PEG; 36% glycerol; 12 mM MgSO ₄ ; 5µl NaOH (do pH 7,5); (roztok přefiltrovat)
PBS	17 mM KH ₂ PO ₄ ; 50 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,5 M NaCl; pH 7,4

Promývací pufr pro western blot	0,2% Tween v PBS
RIPA pufr	150 mM NaCl; 1% NP40; 50 mM Tris, pH 8,3; 1% SDS; 0,5% deoxycholát
Roztok EtBr	10 000x ředěný v TAE
SDS-PAGE pufr	25 mM Tris; 250 mM glycin; 0,1% SDS; pH 8
SOC médium	20 g Tryptone; 5 g kvasinkový extrakt; 10 mM NaCl; 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM MgSO ₄ ; pH 6 – 7; doplnit do 1 litru dest. H ₂ O
Sol I.	50 mM glukóza; 25 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA, pH 8
Sol II.	0,2 M NaOH; 1% SDS
Sol III.	120 ml 5 M octan draselný; 23 ml ledová kyselina octová; doplnit do 200 ml vodou
STE pufr	10 mM Tris-HCl; 0,1 M NaCl; 1 mM EDTA-NaOH; pH 8,0
STET pufr	8% sacharóza; 5% Triton A-100; 50 mM EDTA-NaOH; 50 mM Tris-HCl; pH 8
TAE pufr	40 mM Tris-HCl, pH 7,5; 5 mM acetát sodný; 1 mM EDTA-NaOH, pH 8,0
TE pufr	10 mM Tris-HCl, pH 8; 1 mM EDTA-NaOH
Tris-HCl (1M)	12,1 g Tris-báze, doplnit do 100 ml H ₂ O, pH upravit HCl podle potřeby
TRN pufr	10 – 20 µg upravené Rnázý A na 1 ml TE
Vyvolávací pufr pro ELISPOT	5% aminoetylkarbazol v 0,1 M acetátovém pufru
30% akrylamidový mix	29 g akrylamid; 1 g N,N-bisakrylamid

3.1.6. Kultivační média

Kultivační média pro bakterie

LB médium	10 g Bacto-trypton; 5 g Bacto yeast extract; 5 g NaCl; doplnit do 1 litru deionizovanou H ₂ O; autoklávovat
LB agar	2% bactoagar v LB médiu

Selekce transformovaných bakterií pomocí ampicilinu - 100 µg/ml LB

Média pro tkáňové kultury

D-MEM	50 ml D-MEM 10x (Sigma) 24,6 ml NaHCO ₃ 1 ml antibiotika (50 000 m. u. penicilin + 50 mg/ml streptomycin) 292 mg L-glutamin 2 mg kyselina listová 1 ml pyruvát sodný (110 mg/ml) 50 ml FBS (fetální bovinní sérum; PAA) Doplnit vodou pro tkáňové kultury do 500 ml
EPL	100 ml EPL 4x (Sevapharma) 8,5 mg VIT-MEM (Sevapharma) 0,8 ml antibiotika (50 000 m. u. penicilin + 50 mg/ml streptomycin) 4,8 ml NaHCO ₃ 7,5% Doplnit vodou pro tkáňové kultury do 400 ml
Roztok Verzen/Trypsin	400 ml Verzen 10 ml Trypsin 2%
10% RPMI pro lymfocyty	50 ml roztok RPMI 1640 10x (Sigma) 5 ml L- glutamin (200 mM zásobní roztok) 13,5 ml NaHCO ₃ 0,5 ml kyselina listová (1mg/ml) 50 ml FBS 2 ml gentamicin 1,65 ml β-merkaptoetanol (1000x zředěný) 10 ml HEPES (20 mM) Doplnit H ₂ O pro tkáňové kultury do 500 ml

3.1.7. Protilátky

Primární protilátky:

- Goat- α -hT β RII- IgG (RD systém, USA)
- Myší IFN- γ (BD Bioscience Pharmingen)

Sekundární protilátky:

- Rabbit- α -Goat IgG (H+L), (Jackson ImmunoResearch, USA)
- Biotinylovaná kryší protilátka proti myším IFN- γ (BD Bioscience Pharmingen)
- Avidin značený peroxidázou (Avidin- HRP), (BD Bioscience Pharmingen)

Protein G navázaný na agaróze (Fast flow-*Streptococcus*), (Sigma)

3.1.8. Syntetické oligonukleotidy

- Primer Mut (upstream primer)
5'- CATGGG TCG CGG ACT TCT CAG AGG CCTGT -3' (Generi- BioTech)
- Primer StuI (down stream primer)
5'- TAAGGC CTG CAA CTAGTC AGG ATTGCTGGT- 3' (Generi- BioTech)

3.1.9. Plazmidy

- pFastBac-T β RII-Fc-Jun (Poskytnutý od Dariusz Kowalczyk, Zaklad Diagnostyki i Immunologii Nowotworow, Wielkopolskie Centrum Onkologii, Garbary 15, 61-866 Poznan)
- pBlueScript II KS+ (Stratagene)
- pSC59-H5 (NĚMEČKOVÁ et al. 2002)

3.1.10. Virové kmeny

- **Vakcinia virus, kmen Praha, klon P13**
P13 je odvozen od Sevax VARIE vakcíny proti černým neštovicím (kmen Praha) a je vysoce imunogenní (Kutinová et al. 1995).
- **P13-H5-sT β RII, P13-E/L-sT β RII**
Rekombinantní VACV nesoucí gen pro sT β RII (478 bp) pod kontrolou H5 nebo E/L promotoru byly v naší laboratoři připraveny již dříve (CHLANDA 2006).

3.1.11. Bakteriální kmeny

- *Escherichia coli XL1-Blue*

3.1.12. Buněčné linie

CV-1

Původ: Kočkodan obecný

Tkáň: ledviny

Buněčný typ: fibroblasty

BSC- 40

Původ: Kočkodan Obecný

Tkáň: ledviny

Buněčný typ: fibroblasty

HeLa

Původ: člověk

Tkáň: děložní čípek

Buněčný typ: karcinom

RAT-2 (buňky postrádající tymidin kinázu)

Původ: potkan

Tkáň: embryo

Buněčný typ: fibroblasty

TC-1:

Původ: myš

Tkáň: plíce

Buněčný typ: buněčná linie odvozená z primárních epiteliálních buněk myšího kmene

C57BL/6 kotransformovaných geny E6 a E7 z HPV-16 a onkogenem

c-Ha-*ras*

3.1.13. Pokusná zvířata

Myši kmene: C57BL/6, samice, stáří 6 týdnů (ANLAB)

3.1.14. Speciální přístroje

Přístroj:	Výrobce:
Centrifuga - Labofuge 400R	Heraeus Instruments
Centrifuga - Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments
CO ₂ inkubátor	Sanyo
Elektroforéza Mini-PROTEAN II	BioRad Laboratories
Laminární box - Hera Safe	Heraeus Instruments
Mikroskop Axiovert 200M	Zeiss
Mikroskop MEOPTA DN 817 BI	Meopta
pH meter PHM 83 Autocal	Eutech Instruments
Sonikátor MSE- Soniprep 150	MSE Scientific Instruments
Spektrofotometr BIOMATE 3	THERMO Electron Corp.
Thermo-cycler UNOII	Biometra
Trans-Blot SD Semi- Drytransfer Cell	BioRad Laboratories
Ultracentrifuga L8-70M	Beckman
UV transilluminátor Gel Doc 2000	BioRad Laboratories
Vertikální elektroforéza Mighty Small II SE	BioRad Laboratories
Vodní lázeň	Memmert
Vyvolávací přístroj Ecomat 2400	Ecomat
Zdroj napětí - Power pac 200	Biorad

3.2. Metody

3.2.1. Práce s DNA

3.2.1.1. Příprava kompetentních bakterií *Escherichia coli*

Do 2 ml LB média se seškrábne malá část zásobního inokula bakterií *E.Coli* XL1- Blue. Kultivuje se přes noc na třepačce (200 rpm, 37°C). Do 50 ml Média A se zaočkuje 1 ml narostlého bakteriálního inokula. Nechá se inkubovat na třepačce při teplotě 37°C, dokud absorbance při 600nm nedosáhne 0,4-0,5 (bakteriální kultura dosáhla logaritmické fáze růstu). Poté se chlazením na ledu zastaví růst bakterií. Bakteriální kultura se centrifuguje (1500g, 4°C, 10 minut). Slije se supernatant a pelet se chladí 10 minut na ledu. Pelet se resuspenduje v 0,5 ml Média A a poté se přidá 2,5 ml Média B. Rozdělí se do zkumavek po 100 µl. Kompetentní bakterie se uchovávají na -70°C.

3.2.1.2. Transformace kompetentních bakterií plazmidem

K připraveným kompetentním bakteriím se přidá 1 μ l plazmidu nebo ligační směsi (přibližně 50 ng DNA), pracuje se na ledu. Nechá se inkubovat 1 hodinu na ledu. Směs se dá do termobločku na 42°C po dobu 40 sekund. Poté se hned přenesení na led na dobu 2 minut. Přidá se 80 μ l sterilního SOC média a nechá se kultivovat na třepačce (200 rpm, 37°C, 1 hodina), tento krok se může vynechat, pokud pracujeme s dobře se kopírujícím plazmidem. Transformanty se v několika různých objemech vysejí na Petriho misky s LB agarem a selekčním antibiotikem (ampicilin- 100 μ g/ml LB agaru). Nechá se přes noc inkubovat v termostatu. Z vybraných kolonií se mohou připravit bakteriální konzervy, nebo se mohou rovnou párátkem vypíchnout do 5 ml LB s ampicilinem a nechat přes noc třepat a poté dále zpracovávat. Pro usnadnění rozpoznání bakteriálních kolonií nesoucích rekombinantní plazmid se využívá metody α -komplementace. Na Petriho misky se před vysetím bakterií nanese roztok X-Gal a IPTG, kolonie nesoucí rekombinantní plazmid lze poté odlišit barevně (bílé) od netransformovaných kolonií (modré). Metoda se provedla podle návodu v knize Molecular Cloning a Laboratory Manual (Sambrook a Russell 2001).

3.2.1.3. Příprava bakteriálních konzerv

Narostlé bakterie na Petriho miskách, či v LB médiu se smísí s LB médiem a s glycerolem tak, aby výsledná koncentrace glycerolu byla 15 %. Takto připravené bakterie mohou být dlouhodobě uchovávány na -70°C.

3.2.1.4. Minipreparace plazmidové DNA- Alkalická metoda

Bakteriální kolonie narostlé v 5ml LB média s antibiotikem se centrifugují (13 970g, 4°C, 10 minut). Pelet se rozpustí ve 100 μ l vychlazené Sol I. Pracuje se na ledu. Přidá se 200 μ l Sol II, lehce se promíchá a buňky se nechají 10 minut lyzovat. Sol II se neutralizuje 150 μ l vychlazené Sol III a nechá se 5 minut působit na ledu. Poté se bakteriální suspenze centrifuguje (12 000g, 4°C, 5 minut). Plazmidová DNA se nachází v supernatantu. Supernatant se promíchá s fenol- chloroformem v poměru 1:1, poté se centrifuguje (12 000g, 4°C, 2 minuty), čímž dojde k oddělení zbytků proteinů od plazmidové DNA. K supernatantu (horní vodné fázi) se přidají dva objemy 96% etanolu a 0,1 objemu 3M octanu sodného pH 5,2. Plazmidová DNA se nechá vysrážet jednu hodinu na -20°C. Plazmidová DNA se poté získá z roztoku pomocí centrifugace (12 000g, 4°C, 15 minut). Pelet se opláchne 1ml 70% etanolu a centrifuguje se

(12 000g, 4°C, 10 minut). Odejme se supernatant, zbytky etanolu se nechají odpařit a pelet se rozpustí v 50-100 µl TE pufru. Získaný plazmid se poté ověří pomocí restriktivního štěpení a horizontální gelové elektroforézy.

3.2.1.5. Minipreparace plazmidové DNA- Boiling metoda

Tato metoda umožňuje velmi rychlou izolaci plazmidů. Narostlé bakteriální kolonie na Petriho miskách se párátkem přenesou do 100 µl STET pufru, resuspendují se a nechají se 45 sekund povařit. Povařené vzorky se nechají vychladnout a poté se centrifugují (14 000g, 20°C, 5 minut). Párátkem se odejme sediment zlyzovaných bakterií a k supernatantu se přidá 1 objem izopropanolu. Zvortexuje se a nechá se vysrážet jednu hodinu na -20°C. Poté se vzorky centrifugují (14 000g, 4°C, 10 minut). Pelet se opláchne 1ml 70% etanolu a centrifuguje se (12 000g, 4°C, 10 minut). Odejme se supernatant, zbytky etanolu se nechají odpařit a pelet se rozpustí v 20-50 µl TE pufru.

3.2.1.6. Maxipreparace plazmidové DNA- Alkalická metoda

Bakteriální kolonie narostlá na Petriho misce se přenesou do 2 ml LB média s antibiotikem, nechá se inkubovat 10 hodin na třepačce (200 rpm, 37°C). Narostlá kultura se přenesou do 500 ml LB média s antibiotikem a nechá se inkubovat přes noc (200 rpm, 37°C). Pokud se pracuje s nízkokopiovým plazmidem, přidá se po 8 hodinách inkubace chloramfenikol (170 µg/ml média) a nechá se inkubovat na třepačce dalších 10 hodin.

Narostlá kultura se poté centrifuguje (4500g, 4°C, 10 minut). Pracuje se na ledu. Pelet (bakterie) se rozpustí ve 100 ml PBS a centrifuguje se dalších 10 minut. Poté se přidá 10 ml vychlazeného Sol I a nechá se inkubovat 5 minut na ledu. Přidá se 20 ml Sol II a nechá se inkubovat 5 minut při pokojové teplotě. Poté se přidá 15 ml Sol III, promíchá se a nechá se inkubovat 10 minut na ledu. Centrifuguje se (4500g, 4°C, 10 minut). Supernatant se přefiltruje přes gázu. K přefiltrovanému supernatantu se přidá 0,6 objemu izopropanolu a nechá se 10 minut při pokojové teplotě, poté se centrifuguje (4500g, 20°C, 10 minut). Pelet se rozpustí v 1 ml TE pufru, přidá se 5 µl Rnázy A (10 µg/µl) a nechá se inkubovat 1 hodinu při 37°C. Poté se směs deproteinuje pomocí 1 objemového fenol- chloroformu a centrifuguje se (13 790g, 20°C, 5 minut). K supernatantu (horní vodné fázi) se přidají 2 objemy 95% etanolu a 0,1 objemu 3M octanu sodného pH 5,2. Plazmidová DNA se nechá vysrážet 1 hodinu na -20°C, poté se centrifuguje (13970g, 4°C, 30 minut). Pelet se opláchne 70% etanolem a centrifuguje (13 970g, 4°C, 10 minut). Odejme se supernatant, zbytky etanolu se nechají odpařit a

pelet se rozpustí ve 100-500 μ l TE pufru. Získaný plazmid se poté ověří pomocí restričního štěpení a horizontální gelové elektroforézy.

3.2.1.7. Horizontální gelová elektroforéza

Agaróza (SeaKem LE) v TAE pufru se rozežřeje v mikrovlnné troubě. Koncentrace agarózy se volí podle velikosti dělených fragmentů (1- 3% gel pro fragmenty do 1 000 bp a 0,5- 0,7% pro fragmenty o velikosti 1000- 10000 bp). Vlažný gel se nalije do bločku s hřebínkem a na vodorovném povrchu se nechá ztuhnout. Gel se přenesse do elektroforetického přístroje a zalije se TAE puftrem. Odstraní se hřebínek. Do první jamky se nanese standard molekulových hmotností a do dalších jamek se nanáší vzorky DNA obarvené 6x Loading puftrem. Přístroj se zapojí do zdroje elektrického napětí a vzorky se nechají putovat při napětí 70-100V. Gel se obarví v roztoku Ethidiumbromidu (10 000x zředěný) a obarvená DNA se vizualizuje pomocí UV záření.

3.2.1.8. Štěpení DNA restričními enzymy a defosforylace štěpené DNA

Štěpení restričními enzymy se provádělo za podmínek doporučených výrobcem (BioLabs), reakce probíhala 1 hodinu při 37°C. Po naštěpení se DNA fragmenty defosforylovaly pomocí Shrimp alkalické fosfatázy (SAP). Ke štěpící reakci se přidá SAP a SAP pufr a nechá se další 1 hodinu na 37°C. Poté je SAP tepelně inaktivována (65°C, 15 minut). Reakční podmínky závisí na koncentraci DNA konců, typu konců (tupé či přesahující) a na molekulární hmotnosti DNA. Standardně se používá 1 jednotka SAP na defosforylaci 1 pmol 5'přesahujících konců, či 1 jednotka SAP na defosforylaci 0,2 pmol tupých konců.

3.2.1.9. Izolace DNA z gelu- pomocí DNA Lego kitu

Elektroforéza probíhá na gelu připraveném z GTG nízkotající agarózy. Z gelu se vyřízne proužek s námi požadovanou DNA a zváží se. Přidají se 3 objemové díly DNA vazebného pufru a vzorek se inkubuje 5-10 minut při 55°C, dokud nedojde k rozpuštění agarózy. Před odběrem DNA vazebných partikulí se zásobní lahev dobře promíchá. 100 μ l DNA vazebných partikulí se přepipetuje (pomocí pipety s ustříženou špičkou, aby nedošlo k jejich porušení) do 1,5 ml zkumavky a stočí se 2 minuty na mikrofuze. Odstraní se supernatant a na stočené kuličky se nanese rozpuštěná agaróza s naší DNA. Protřepává se 2 minuty a centrifuguje se na mikrofuze. Odstraní se supernatant. Pelet se promyje 2x 1 ml promývacího pufru. Poté se k peletu přidá 30 μ l elučního pufru přede-

hřátého na 50°C, stočí se 1 minutu na mikrofuze (dojde k uvolnění DNA do supernatantu). Supernatant se ihned odebere do nových zkumavek. Takto získanou DNA lze bezprostředně použít pro další aplikace.

3.2.1.10. Rychlá ligace- pomocí Rapid DNA Ligation kit

Fragment a vektor se resuspenduje v 10 µl 1x dilučního DNA pufru. Ke směsi se přidá 10 µl 5x T4 ligačního pufru a 1 µl T4 ligázy. Reakce probíhá 15 minut při pokojové teplotě. Ligace probíhá v molárním poměru vektor: fragment= 1:2. Maximální množství vektoru je 50 ng, množství fragmentu se řídí daným molárním poměrem. Celkové množství DNA je maximálně 200 ng na 10 µl směsi.

3.2.1.11. Klasická ligace

Klasická ligace probíhá za následujících podmínek:

Vektor DNA	1x molární množství (max. 20 ng)
Fragment DNA	2x molární množství
10x T4 lig. pufr	2µl
T4 DNA ligáza	1µl
Objem doplnit ddH ₂ O do 20 µl	

Inkubace 16 hodin při 20°C (ligace tupých konců), při 4°C (ligace kohezních konců).

3.2.1.12. Purifikace plazmidové DNA izopyknickou centrifugací v CsCl gradientu

Plazmidová DNA získaná maxipreparací se rozpustí v 10 ml TE pufru. Na každý gram roztoku plazmidové DNA se přidá 1.01 g CsCl, zahřeje se na 30°C a lehce se promíchává, dokud nedojde k rozpuštění CsCl. Poté se přidá na každých 5 gramů původního DNA roztoku 100 µl Ethidiumbromidu (10 mg/ml). Hustota se upraví na 1,55 g/ml přidáním CsCl. Roztok se centrifuguje ve VTi 65 rotoru (194000g, 25°C, 16 hodin, bez brzdění). Po centrifugaci se odebere spodní proužek viditelný pod UV lampou (obsahuje cirkulární DNA) pomocí jehly na injekční stříkačce.

Získanou cirkulární DNA je potřeba přečistit od Ethidiumbromidu. K získané DNA se přidá 1 objem vodou a NaCl nasyceného n-butanolu a zvortexuje se. Směs se nechá v klidu stát, až dojde k oddělení organické a vodní fáze. Odejme se horní (organická) fáze a přidá se čerstvý butanol, tento krok se opakuje 5x. DNA se z roztoku získá

pomocí srážení etanolem. K DNA roztoku se přidají 3 objemy H₂O a 8 objemů (z původního DNA roztoku před přidáním H₂O) 96% etanolu, nechá se vysrážet 15 minut při 4°C. Poté se to centrifuguje (3500g, 4°C, 30 minut).

Pelet se resuspenduje v 500 µl 70% etanolu, centrifuguje se (13970g, 4°C, 10 minut). Odejme se supernatant, zbytek etanolu se nechá odpařit a pelet se rozpustí v H₂O. Takto připravený plazmid lze použít na rekombinaci do viru vakcinie.

3.2.1.13. Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA v roztoku

Podle gelové elektroforézy se odhadne koncentrace DNA a naředí se do různých koncentrací (maximálně však 50 µg dsDNA na 1 ml roztoku). Absorbance se měří na spektrofotometru BIOMATE 3 při vlnové délce 260 nm. Koncentrace dsDNA je 50 µg/ml při absorbanci rovné 1. Tato závislost je lineární do hodnoty absorbance 2.

3.2.1.14. Srážení DNA

K roztoku DNA se přidají 3 objemy vychlazeného 96% etanolu a 0,1 objemu 3M octanu sodného, promíchá se. Roztok se nechá srážet přes noc při -20°C. Poté se centrifuguje (14000g, 4°C, 30 minut). Pelet se opláchne 70% etanolem, odejme se supernatant, zbytky etanolu se nechají vypařit a pelet se rozpustí v TE pufru.

3.2.2 Práce s viry

3.2.2.1. Rekombinace do viru vakcinie

Pro rekombinaci do VACV se používá plazmid pSC59-H5, kde je gen, který chceme vložit do VACV, vložen do genu pro tymidinkinázu (TK), lze ho tedy pomocí homologní rekombinace přenést do genu pro TK VACV.

Gen pro sTβRII-Fc-Jun pod kontrolou H5 nebo E/L promotoru se vloží do viru P13, čímž vzniknou viry P13-H5-sTβRII-Fc-Jun a P13-E/L-sTβRII-Fc-Jun. Pro vznik virů P13-SigE7LAMP-H5-sTβRII-Fc-Jun a P13-SigE7LAMP-E/L-sTβRII-Fc-Jun se gen sTβRII-Fc-Jun vloží do rekombinantního viru P13-SigE7LAMP-TK⁻.

5 ml buněk CV-1 se nasadí na Petriho misky (300 000 b/ml) a nechá se narůst do druhého dne. 25 µg plazmidové DNA přečištěné přes CsCl gradient se naředí H₂O do objemu 50 µl a smíchá se se 175 µl 2x koncentrovaného HeBs. Poté se smíchá 100 µl viru (nejméně 2x10⁷ pfu/ml) se 700 µl H₂O a 88,8 µl CaCl₂, tento roztok se rozdělí po 175 µl a pomalu se přikapává 225 µl roztoku DNA s HeBs. Nechá se inkubovat 30 mi-

nut při pokojové teplotě. Přidá se 350 µl média D-MEM a nanese se po 375 µl na dvě Petriho misky s narostlými buňkami a slitým médiem, označí se jako paralely A a B. Po 2 hodinách v CO₂ inkubátoru při 37°C se přidají 3 ml média a nechá se inkubovat dalších 20 hodin. Poté se buňky 3x zamrazí a rozmrazí, aby se uvolnil intracelulární virus. Virová suspenze se centrifuguje (2000 rpm, 4°C, 20 minut). Supernatant obsahující virus se zamrazí.

3.2.2.2. Selekcce rekombinantních virů

Pro selekci rekombinantních virů se používá TK⁻ selekce, jelikož gen pro sTβRII-Fc-Jun byl vložen do genu pro TK. Pro selekci se používají buňky bez TK (Rat-2).

Rat-2 buňky se nasadí na Petriho misky v 5 ml média (200 000b/ml). Buňky se nechají růst 48 hodin v CO₂ inkubátoru při 37°C. Poté se slijí médium a buňky se infikují 200 µl suspenze s rekombinantními viry v několika ředěních. Virus se nechá adsorbovat 2 hodiny při 37°C, každých 20 minut se s miskami lehce zakývá, aby se buňky uprostřed nevysušily. Infikované buňky se přelijí 5 ml směsí agaru a média se selekčním činidlem (rozvařený tkáňový agar 2%, 2x koncentrované médium EPL, 1 ml BUdR na 100 ml směsí agar/EPL). Při přelivu selekčním médiem je nutné vypnout světlo v laminárním boxu, jinak se činidlo deaktivuje. Po 3-5 dnech inkubace se plaky obarví směsí agar, médium, neutrální červeň a nechají se minimálně 4 hodiny inkubovat.

Plaky se vypíchnou pomocí pasteurových pipet a rovnou se infikují do 24- jamkových panýlků s narostlými Rat-2 buňkami (150 000b v 0,5 ml) a přidá se BUdR (100x naředit). Pokud je druhý den vidět pěkný cytopatický efekt, buňky s virem se zpracují plakovou purifikací viz kapitola 3.2.2.3., pomocí které se získá čistý klon rekombinantního viru.

3.2.2.3. Plaková purifikace

Na Petriho misky se nasadí 5 ml Rat-2 buněk (200 000b/ml), buňky se nechají růst 48 hodin v CO₂ inkubátoru při 37°C. Pro první plakovou purifikaci se buňky infikují 200 µl virové suspenze získané selekcí rekombinantních virů viz kapitola 3.2.2.2. v ředěních 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ a nechají se inkubovat 24 hodin v CO₂ inkubátoru při 37°C. Poté se infikované buňky přelijí směsí agaru a média se selekčním činidlem viz kapitola 3.2.2.2. Po 3 dnech inkubace se plaky přebarví směsí agar, médium, neutrální červeň. Z terminálního ředění se přenesou dva plaky do 1 ml EPL média a zamrazí se na -60°C.

Při druhé plakové purifikaci se postupuje stejně jako při první, pouze se buňky infikují jedním ze zmražených plaků v ředění 10^{-1} a 10^{-2} . Druhý plak zůstává zmražen jako záloha.

Při třetí plakové purifikaci se postup opakuje, ale infikované buňky se přelijí pouze směsí agar, médium bez BUdR.

Do kultivačních lahví (25 cm^2) se nasadí po 5 ml suspenze buněk CV1 (200 000b/ml). Druhý den se buňky infikují 0,5 ml virového materiálu. Zcela degenerovaná kultura se 3x zamrazí a rozmazí, centrifuguje se (2000 rpm, 4°C , 20 minut) a supernatant se rozplní do 7 ampulí. Každá rekombinanta dostane své číslo podle centrálního seznamu rekombinant.

3.2.2.4. Příprava virové DNA pro PCR detekci rekombinant

Buňky Rat-2 se nasadí na 24- jamkový panýlek, tak aby do druhého dne narostly přibližně z 80% konfluentně. Buňky se infikují 100 μl virové suspenze, po 1 hodině v CO_2 inkubátoru při 37°C se přidá 900 μl média EPL a panýlky se umístí do inkubátoru na dalších 20 hodin. Po 20 hodinách inkubace by měl být patrný cytopatický efekt ve všech buňkách.

Poté se odsaje médium, buňky se opláchnou 1 ml studeného PBS a přidá se 500 μl lyzovacího roztoku s proteinázou K. Panýlky se nechají přes noc v inkubátoru. Zlyzovaný materiál se odsaje do zkumavek, inkubuje se 10 minut při 90°C , čímž dojde k inaktivaci proteinázy K. Poté se přidá 500 μl směsi fenol: chloroform: izoamylalkohol (24:24:1), zvertexuje se a centrifuguje se (12 000 g, 24°C , 3 minuty). Horní fáze se vysráží 1 ml 96% etanolu a 50 μl 3M octanu sodného pH 5,2. Nechá se vysrážet 1 hodinu na -20°C , poté se centrifuguje (12 000g, 4°C , 30 minut). Pelet se resuspenduje v 70% etanolu a centrifuguje (12 000g, 4°C , 30 minut). Pelet se suší 30 minut při 24°C , poté se resuspenduje v 30 μl H_2O a zamrazí se na -20°C .

3.2.2.5. Amplifikace DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR)

-pro detekci rekombinantních virů

Připraví se reakční směs o celkovém objemu 10 μ l.

DNA	1 μ l virové DNA (nebo 1ng plazmidu)
Primer 1	0,5 μ M
Primer 2	0,5 μ M
dNTP's	200 μ mol
Taq pufr (10x konc.)	1 μ l
Taq polymeráza	1 μ l (5 units/ μ l)
H ₂ O	do 10 μ l celkem

Zkumavky s reakční směsí a negativní kontrolou (směs bez přidání templátové DNA) se vloží do termo-cycleru a spustí se námi nastavený program:

- | | | |
|--------------------------|-----------------|------------|
| 1. Počáteční denaturace | 94°C/ 2 minuty | } 25 cyklů |
| 2. Denaturace | 94°C/ 15 sekund | |
| 3. Navázání primerů | 60°C/ 15 sekund | |
| 4. Syntéza DNA | 72°C/ 45 sekund | |
| 5. Závěrečná syntéza DNA | 72°C/ 10 minut | |
| 6. Chlazení | 4°C | |

3.2.2.6. Příprava rychlého virového koncentrátu

Buňky BSC-40 se nechají narůst na Roux lahvích do plné konfluencie. Buňky se infikují virem ve 2 ml média EPL, MOI je 0,1. Infikované buňky se nechají 2 hodiny při 37°C, každých 30 minut se láhve protřepávají, aby nedošlo k vysušení buněk. Poté se přidá 80 ml EPL média a buňky se nechají inkubovat při 37°C. Pokud je patrný cytopatický efekt u 50% buněk, slije se 50 ml média a láhve se nechají dalších 24 hodin v inkubátoru. Buňky se seškrábou do zbytku média a centrifugují se (300 g, 4°C, 10 minut). Pelet se resuspenduje v 10 ml média a buňky se homogenizují pomocí sonikátoru, sonifikace se provádí 3x 1 minutu. Sonifikovaný materiál se centrifuguje (780g, 4°C, 20 minut). Jádra buněk se centrifugací oddělí do peletu a supernatant obsahuje námi požadované viry. Supernatant se rozplní po 1 ml a je skladován při -70°C.

Touto metodou se získá nepurifikovaný virus, který obsahuje většinou IMV (in-tracelulární maturovaný virion) částice a zbytky buněčných membrán.

3.2.2.7. Plaková titrace

Pomocí plakové titrace se zjistí množství funkčních virionů (počet plaky tvořících jednotek- Pfu).

1×10^6 CV-1 buněk v 5 ml média EPL se nasadí na Petriho misky. Po 24 hodinách se slije médium a buňky se infikují 200 μ l virové suspenze v ředění médiem EPL 10^{-6} , 10^{-7} a 10^{-8} ve dvou paralelách. Virus se nechá adsorbovat 2 hodiny při 37°C, každých 20 minut se s miskami lehce zakývá, aby se buňky uprostřed nevysušily. Infikované buňky se přelijí 5 ml směsí agarů a média. Po 3-5 dnech inkubace se plaky obarví směsí agar, médium, neutrální červeně a nechají se minimálně 4 hodiny inkubovat. Spočítají se plaky.

Hodnota Pfu se počítá z množství plaků na misce, ředění a objemu viru použitého pro infekci- **Pfu= množství plaků x ředění x 5**. Číslo 5 odpovídá objemu viru použitého pro infekci, v našem případě 200 μ l.

3.2.2.8. Sonikace viru

Trn se sterilizuje 3 minuty v 12% roztoku jodonalu. Sonikátor se nastaví na stupeň 6. Zbytek jodonalu se utře sterilní buničitou vatou a trn se sonikuje v destilované vodě 1 minutu, pak 1 minutu v absolutním etanolu a 30 sekund volně na vzduchu. Zkumavka s roztokem viru se opatrně otevře a víčko se zalepí parafilmem. Zkumavka se nasadí na trn sonikátoru tak, že trn se nedotýká dna ani stěn. Parafilmem upevněná zkumavka se chladí ledem a roztok se sonikuje 3 x 1 minutu na stupeň 6. Po práci se trn sterilizuje stejným postupem jako na začátku

3.2.3. Práce s tkáňovými kulturami

3.2.3.1. Kultivace tkáňových kultur

Buňky se kultivují při 37°C v CO₂ inkubátoru. Buňky se pasážují 2-3x týdně, k uvolnění adherentních buněk se používá roztok verzen/trypsin. Pro kultivaci HeLa a TC-1 buněk se používá médium D-MEM. Pro kultivaci buněk CV-1, BSC-40 a Rat-2 se používá médium EPL.

3.2.3.2. Zmrazování buněk do tekutého dusíku

1,5x 10⁶ stočených buněk (300 g, 4°C, 10 minut) se rozpustí v 1 ml média s 10% FBS a 10% DMSO. Buňky ve zkumavce se šroubovacím uzávěrem se vloží do nádoby s izopropanolem a nechají se přes noc na -70°C, poté se přenesou do tekutého dusíku.

3.2.3.3. Rozmrazování buněk z tekutého dusíku

Buňky se z tekutého dusíku přenesou do vodní lázně o teplotě 37°C. Buňky se nechají rozmraznout, přenesou se do 25 cm² láhve se 4 ml předeřátého média a nechají se v inkubátoru při 37°C. Druhý den se vymění médium.

3.2.3.4. Příprava buněčných lyzátů a médií pro SDS- PAGE

Buňky CV-1 a HeLa se nasadí na 24- jamkový panýlky (150 000b/jamku). Druhý den buňky dosáhnou plné konfluence, odsaje se médium a buňky se infikují 100 µl virové suspenze s MOI 3. Infikované buňky se nechají inkubovat 30 minut při 37°C, aby došlo k absorpci viru. Každých 10 minut se panýlky jemně kývá, aby nedošlo k vysušení buněk. Poté se odsaje médium a přidá se 0,5 ml nového bezsérového média. Infikované buňky se inkubují při 37°C, odběry buněk a médií se dělaly po dobu 30 hodin v intervalech po 6 hodinách včetně času 0.

Buněčné média se opatrně odebrala od buněk a zamrazila. V intervalu 24 a 30 hodin inkubace (kdy se již buňky začaly uvolňovat do média) se odebraná média centrifugovala (900g, 4°C, 15 minut). Supernatant se zamrazil a pelet se přidal k buňkám na panýlky. Buňky se na sucho zamrazily na panýlkách.

Média i buňky se připraví na SDS-PAGE. Z médií se odebere 30 µl a přidá se 10 µl Laemmli pufru, zkumavky se překryjí parafilmem a 5 minut se povaří. Poté se uchovávají na -20°C. Buněčné lyzáty se připraví lyzí v NP40 pufru, díky kterému jádra trochu popraskají, ale DNA se zcela neuvolní. Kdyby se použil RIPA pufr, vzorky by byly příliš gelovité. Pracuje se na ledu, na buňky se nanese 100 µl NP40 pufru a nechá se 15 minut působit. Poté se buňky lehce seškrábnou špičkou pipety a přenesou se do zkumavky, nechá se dalších 15 minut inkubovat na ledu. Poté se zlyzované buňky centrifugují (13 000g, 4°C, 10 minut). Odebere se supernatant a přidá se k němu 25 µl Laemmli pufru. Zkumavky se překryjí parafilmem a vzorky se 5 minut povaří.

3.2.4. Práce s proteiny

3.2.4.1. SDS- Polyakrylamidová elektroforéza (SDS-PAGE)

Sestaví se aparatura pro přípravu polyakrylamidového gelu, do které se nalije roztok pro dělicí gel a převrství se butanolem. Gel se nechá ztuhnout, vylije se butanol a gel se opláchne destilovanou H₂O. Na dělicí gel se nalije roztok pro zaostřovací gel a nasadí se do něj hřebínek. Po ztuhnutí zaostřovacího gelu se sklíčka s gelem přenesou do přístroje pro vertikální elektroforézu a zalijí se SDS-PAGE puforem. Vyndá se hřebínek a nanese se vzorky považené v Laemmli pufru, do jedné z jamek se nanese standard molekulových hmotností. Přístroj se zapojí do zdroje elektrického napětí a vzorky se nechají putovat zaostřovacím gelem při napětí 70 V a dělicím gelem při napětí 100 V. Proteiny rozdělené pomocí elektroforézy se dále analyzují pomocí Western Blotu.

3.2.4.2. Western Blot

Nitrocelulózová membrána Hybond-C Extra (Amersham) a gel po SDS-PAGE se nechají inkubovat 15 minut v blotovacím pufru za neustálého kývání. Dva filtrační papíry (Extra Thick Filter Paper, Biorad) se upraví na velikost našeho gelu po SDS-PAGE. Na anodu blotovacího přístroje (Trans Blot SD Semi- Drytransfer Cell) se na sebe poskládá: filtrační papír navlhčený v blotovacím pufru, nitrocelulózová membrána, gel a navlhčený filtrační papír. Každá vrstva se uhladí pomocí pasterovy pipety, aby došlo k odstranění vzduchových bublin. Blotovací přístroj se uzavře katodou, připojí se ke zdroji elektrického napětí a proteiny se nechají přenášet na membránu při 120 mA 1 hodinu.

Proteiny přenesené na membránu se nyní detekují imunologicky. Membrána se může obarvit v Ponceau-s pro zjištění přítomnosti proteinů, tento krok je možné vynechat. Membrána se inkubuje 1 hodinu v 50 ml blokovacího roztoku, čímž dojde k vysycení volných vazebných míst na membráně. Membrána se poté zataví do fólie společně s roztokem 5 ml primární protilátky (Goat- α -hT β R_{II} 1:2000 ředěné v 5% odtučněném mléce v PBS) a nechá se 1 hodinu inkubovat při pokojové teplotě na kývačce (lze také přes noc při 4°C). Membrána se 5x 5 minut promyje v promývacím pufru, čímž dojde k vymytí nespecificky navázané protilátky. Membrána se poté zataví do fólie společně s roztokem 5 ml sekundární protilátky konjugované s HRP (Rabbit- α -Goat 1: 5000 ředěné v 5% odtučněném mléce v PBS) a nechá se 1 hodinu inkubovat na kývačce při pokojové teplotě. Membrána se 5x5 minut promyje v promývacím pufru.

Membrána se 5 minut inkubuje v 1 ml roztoku připraveného z ECL Detection Reagents Kit. Membrána se zabalí do fólie a vloží se do kazety s vyvolávacím filmem Hyperfilm ECL (Amersham). Nechá se exponovat. Pro vyvolání filmu se používá přístroj Ecomat 2400.

3.2.4.3. Srážení proteinů

K 200 μ l média odebraného od buněk infikovaných rekombinantními viry se přidá 200 μ l acetonu. Nechá se srážet přes noc při -70°C . Poté se vzorky centrifugují 5 minut na mikrofuze. Odstraní se supernatant a pelet se nechá vysušit. Pelet se rozpustí v 20 μ l Tris (50 mM, pH=8).

3.2.5. Testování buněčné imunitní odpovědi

3.2.5.1. Imunizace myši

Pro imunizaci se používají myši kmene C57Bl/6 stáří 6 týdnů. Těmto myším se podají DNA vakcíny pomocí genové pistole (BioRAD). Podává se jedna dávka vakcíny- 3×10^6 PFU v PBS (celkový objem 500 μ l) na 1 myš. Po 12 dnech se provádějí odběry slezin.

3.2.5.2. Zpracování slezin

Z usmrcených imunizovaných myší se vypreparují sleziny. Každá slezina se dá do zkumavky s 1 ml 2% RPMI (připravené jako 10% RPMI pro lymfocyty). Pracuje se na ledu. Každá slezina se v laminárním boxu vyndá na sterilní sítko a rozdrtí se pomocí pístu z injekční stříkačky. Homogenizovaná směs se resuspenduje v 5 ml 2% RPMI s 2% FBS a přenese se do 15 ml falkonky. Falkonky se zvortexují, podvrství se 5 ml Histopaque 1077 a centrifugují se (560g, 4°C , 10 minut). Centrifugací dojde k oddělení lymfocytů od erytrocytů. Nejdříve se z povrchu odsají 1-2 ml tekutiny pro lepší odběr mezifáze. Poté se odebere 5ml mezifáze obsahující lymfocyty do falkonky s 5 ml vychlazeného 2% RPMI. Centrifuguje se (300g, 4°C , 10 minut). Pelet se resuspenduje a 2x promyje v 5 ml 2% RPMI, centrifuguje se (300g, 4°C , 5 minut). Pelet se poté resuspenduje v 2 ml 10% RPMI pro lymfocyty. Buňky se 20x naředí a spočítají.

3.2.5.3. Stimulace splenocytů *in vitro*

Pro stanovení počtu buněk produkujících IFN- γ se splenocyty používají „*ex vivo*“, kdy se stanovení provede hned po izolaci, nebo se splenocyty kultivují 5 dní v přítomnosti stimulujícího peptidu (VACV peptid, E7 peptid) a poté se testují.

Buňky na restimulaci se nasadí na 96 jamkové destičky v množství 5×10^6 buněk/jamku v 1ml 10% RPMI pro lymfocyty. Pracuje se v paralelách. K buňkám se přidá VACV peptid v koncentraci 0,01 $\mu\text{g/ml}$ a k dalším buňkám se přidá 0,0025 $\mu\text{g/ml}$ E7 peptidu a nechá se 5 dní inkubovat při 37°C v CO₂ inkubátoru.

3.2.5.4. Elispot pro IFN- γ

Na 96 jamkové destičky s nitrocelulózovým dnem MAHA 45 (Millipore) se v laminárním boxu nanese monoklonální protilátka anti-mouse IFN- γ , na jamku se nanese 50 μl protilátky ředěné 1:200 ve fosfátovém pufru. Nechá se inkubovat ve vlhké komůrce přes noc při 4°C. Jamky se promyjí 4x 200 μl sterilního PBS a membrána jamek se vysytí 50 μl 10% RPMI, nechá se kultivovat 1 hodinu při pokojové teplotě. Poté se do jamek nanese 100 μl 10% RPMI, 100 μl buněk v počtu $0,5 \times 10^6$ buněk/jamku a peptid o dané koncentraci (1 $\mu\text{g/ml}$ VACV peptidu a 0,025 $\mu\text{g/ml}$ E7 peptidu), pracuje se v paralelách. Destička se nechá inkubovat 20 hodin při 37°C v CO₂ inkubátoru. Poté se odstraní buněčná suspenze. Jamky se promyjí 4x 200 μl PBS a 4x 200 μl PBS s 0,05% TWEEN 20. Poté se na jamky nanese 50 μl 250x v PBS ředěné biotinylované protilátky proti myšimu IFN- γ a nechá se 4 hodiny inkubovat při pokojové teplotě (lze i přes noc při 4°C ve vlhké komůrce). Poté se jamky promyjí 4x 200 μl PBS s 0,05% TWEEN 20. Do jamek se přidá 50 μl avidinu značeného peroxidázou (Avidin- HRP) ředěného 1000x v PBS s 0,05% TWEEN 20. Nechá se 2 hodiny inkubovat při 37°C v CO₂ inkubátoru. Poté se jamky promyjí 3x 200 μl PBS. Do jamek se nanese 60 μl vyvolávacího pufru a destička se nechá 15 minut ve tmě. Jamky se 5x promyjí pod vodou z kohoutku a nechají se při pokojové teplotě vysušit do druhého dne. Lymfocyty produkující IFN- γ jsou na membráně jamek patrné jako tečky a spočítají se pomocí programu ELISCAN, pokud jich je malé množství lze je spočítat pomocí lupy (Nikon).

3.2.6. Protinádorové testy *in vivo*

Myším (samice) kmene C57BI/6 stáří 6 týdnů se subkutánně vpíchnou nádorové buňky TC-1 (6×10^4 buněk/ myš). Po 9 dnech se myši očkují virovými vakcínami (1×10^6

PFU/ 0,5 ml). Jako negativní kontrola se pro očkování použije PBS. Růst nádorů se poté měří v intervalech 3-4 dní po dobu 54 dní. Pokud je nádor menší než 4 mm², považuje se za negativní. Pokud je nádor větší než 1,5 cm², je myš narkotizována a usmrcena. Na konci pokusu se myši narkotizují a usmrtí.

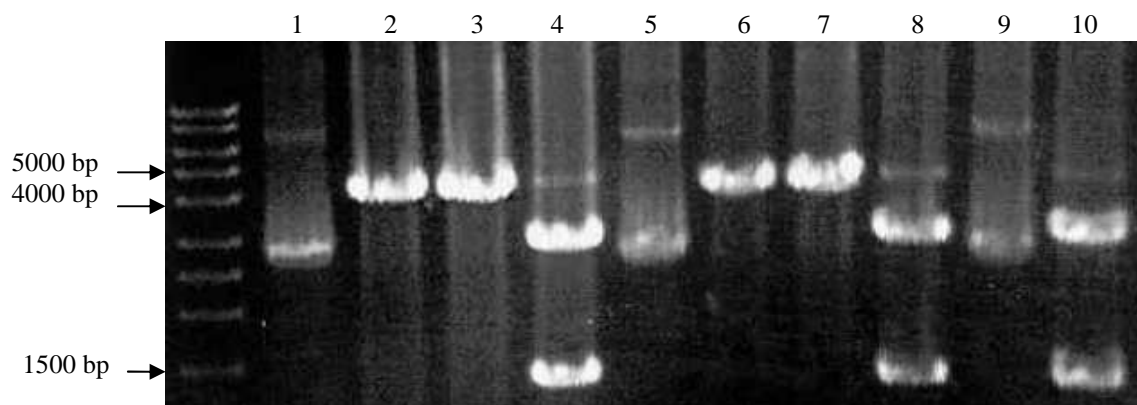
4. Výsledky

4.1. Příprava rekombinantního viru vakcinie exprimujícího sTβRII-Fc-Jun protein

4.1.1. Klonování genu sTβRII-Fc-Jun

Plazmid pFastBac-sTβRII-Fc-Jun nám laskavě poskytl Dariusz Kowalczyk (Základ Diagnostiky i Immunologii Nowotworow, Wielkopolskie Centrum Onkologii, Garbary 15, 61-866 Poznan). Tento plazmid jsme štěpili restrikcími endonukleázami EcoRI a HindIII, čímž došlo k vyštěpení fragmentu sTβRII-Fc-Jun (1400 bp). Stejnými restrikcími endonukleázami jsme také naštěpili plazmid pBluescript II SK⁺. Velikost vyštěpeného fragmentu sTβRII-Fc-Jun a linearizovaného plazmidu jsme ověřili elektroforeticky a izolovali z gelu pomocí DNA Lego kitu. Úspěšnost izolace jsme ověřili elektroforeticky. Určili jsme koncentraci DNA a linearizovaný plazmid jsme ligovali s inzertem sTβRII-Fc-Jun pomocí Rapid DNA Ligation kitu. Vznikl plazmid pBluescript-sTβRII-Fc-Jun.

Bakterie *Escherichia coli* XLI-Blue jsme transformovali ligační směsí. Pro rozpoznání rekombinantních klonů jsme využili metody odlišného zbarvení transformovaných kolonií (bílé) od netransformovaných kolonií (modré). Plazmidovou DNA jsme izolovali minipreparací (alkalickou metodou). Úspěšnost minipreparace jsme ověřili elektroforeticky. Poté jsme vybrané vyizolované DNA štěpili enzymy HindIII a EcoRI pro ověření, zda dochází ke zpětnému vyštěpení inzertu. U 3 klonů došlo ke zpětnému vyštěpení sTβRII-Fc-Jun (znázorněno na obrázku č.5).

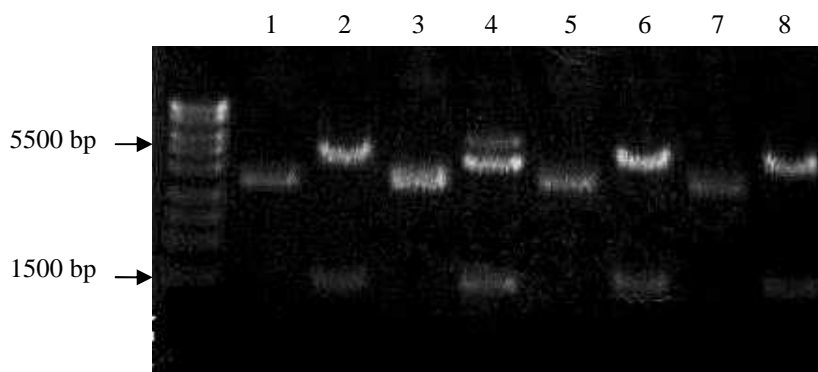


Obrázek č.5. Elektroforetická analýza- kontrola zpětného vyštěpení sTβRII-Fc-Jun z plazmidu pBluescript-sTβRII-Fc-Jun

1) klon č.1 neštěpený pBluescript-sTβRII-Fc-Jun 2) klon č.1 štěpený EcoRI 3) klon č.1 štěpený HindIII 4) klon č.1 štěpený EcoRI a HindIII- došlo k vyštěpení fragmentu sTβRII-Fc-Jun 5) klon č.2 neštěpený pBluescript-sTβRII-Fc-Jun 6) klon č.2 štěpený EcoRI 7) klon č.2 štěpený HindIII 8) klon č.2 štěpený EcoRI a HindIII- došlo k vyštěpení fragmentu sTβRII-Fc-Jun 9) klon č.3 neštěpený pBluescript-sTβRII-Fc-Jun 10) klon č.3 štěpený EcoRI aHindIII- došlo k vyštěpení fragmentu sTβRII-Fc-Jun.

Z klonu č.1 jsme enzymy EcoRI a XhoI vyštěpili fragment obsahující gen pro sTβRII-Fc-Jun, izolovali jsme jej z gelu pomocí DNA Lego kitu, úspěšnost izolace jsme ověřili elektroforeticky a určili jsme koncentraci DNA. Plazmid pSC59-H5 (plazmid pro rekombinaci do viru vakcinie) jsme štěpili enzymy EcoRI a XhoI. Linearizovaný plazmid jsme izolovali z gelu pomocí DNA Lego kitu, úspěšnost izolace jsme ověřili elektroforeticky, určili jsme koncentraci plazmidové DNA a plazmid jsme defosforylovali. Tento linearizovaný defosforylovaný plazmid jsme ligovali s vyizolovaným genem pro sTβRII-Fc-Jun pomocí Rapid DNA Ligation kitu. Vznikl plazmid pSC59-E/L-sTβRII-Fc-Jun.

Ligační směsí jsme transformovali bakterie *Escherichia coli XLI-Blue*. Plazmidovou DNA jsme z klonů izolovali minipreparací (alkalickou metodou). Úspěšnost minipreparace jsme ověřili pomocí elektroforézy. Vybrané vyizolované plazmidové DNA jsme štěpili enzymy EcoRI a XhoI pro ověření zpětného vyštěpení inzertu. U všech klonů došlo ke zpětnému vyštěpení sTβRII-Fc-Jun (znázorněno na obrázku č. 6).

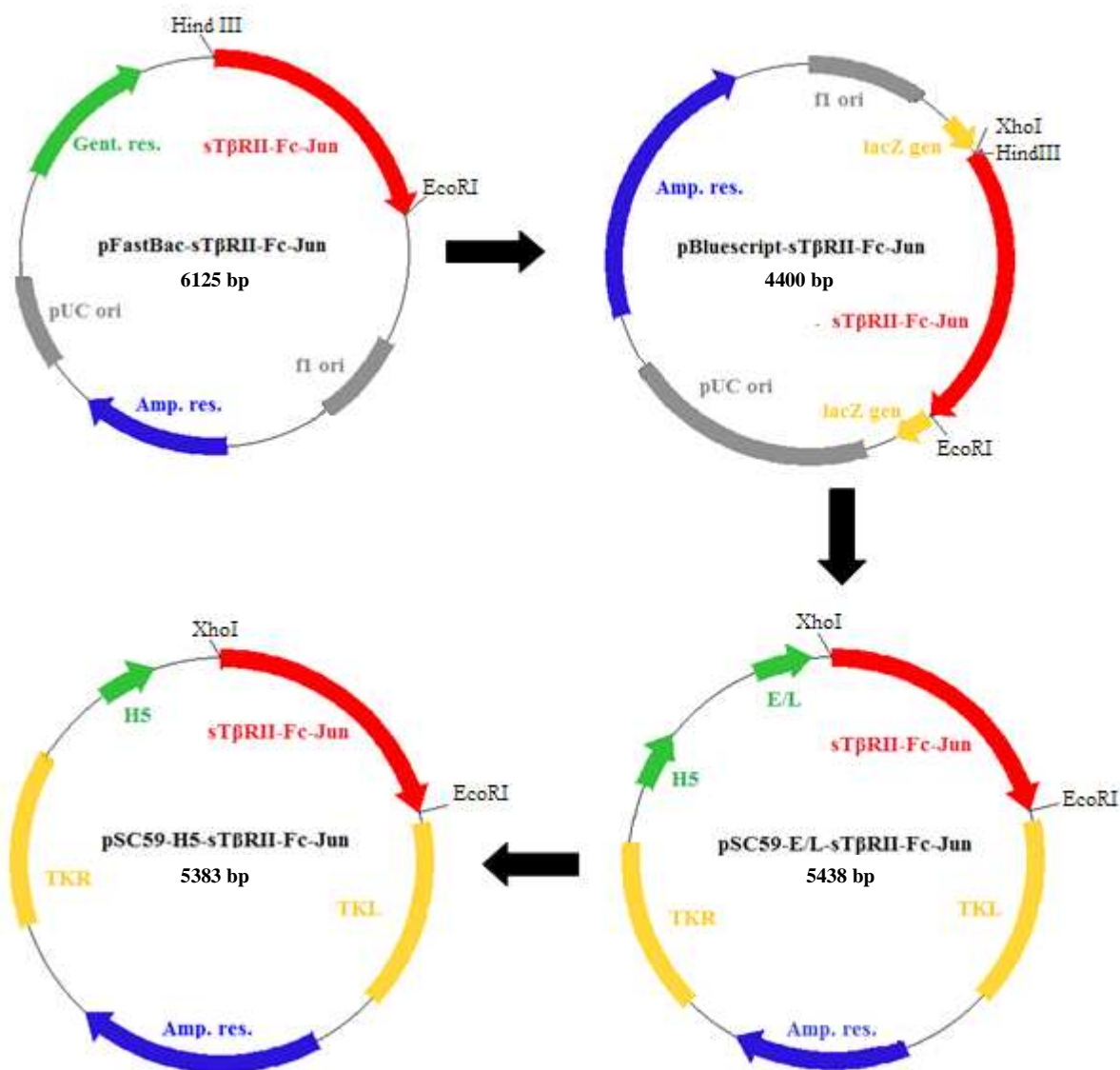


Obrázek č.6. Elektroforetická analýza- kontrola zpětného vyštěpení sTβRII-Fc-Jun z plazmidu pSC59-E/L-sTβRII-Fc-Jun

1) klon č.1 neštěpený pSC59-E/L-sTβRII-Fc-Jun 2) klon č.1 štěpený EcoRI a XhoI- vyštěpení sTβRII-Fc-Jun 3) klon č.2 neštěpený pSC59-E/L-sTβRII-Fc-Jun 4) klon č.2 štěpený EcoRI a Xho I- vyštěpení sTβRII-Fc-Jun 5) klon č.3 neštěpený pSC59-E/L-sTβRII-Fc-Jun 6) klon č.3 štěpený EcoRI a XhoI- vyštěpení sTβRII-Fc-Jun 7) klon č.4 neštěpený pSC59-E/L-sTβRII-Fc-Jun 8) klon č.4 štěpený EcoRI a XhoI- vyštěpení sTβRII-Fc-Jun.

Pro přípravu pSC59-H5-sTβRII-Fc-Jun jsme plazmid pSC59-E/L-sTβRII-Fc-Jun štěpili enzymy XhoI a Sall. Tyto enzymy vyštěpí z plazmidu E/L promotor, mají stejnou štěpící palindromickou sekvenci, je tedy možné plazmid zpět ligovat a touto ligací dojde ke zrušení štěpícího místa. Po štěpení enzymy jsme plazmid izolovali z gelu a ligovali pomocí Rapid DNA Ligation kitu. Průběh klonování je znázorněn na obrázku č.7.

Plazmidy pSC59-E/L-sTβRII-Fc-Jun a pSC59-H5-sTβRII-Fc-Jun jsme namnožili v bakteriích *Escherichia coli XLI-Blue*, vyizolovali maxipreparací a úspěšnost maxipreparace jsme ověřili elektroforeticky. Plazmidy jsme purifikovali izopyknickou centrifugací v CsCl gradientu. Takto purifikovaná plazmidová DNA byla připravená pro rekombinaci do viru vakcinie.



Obrázek č.7. Znázornění klonování sTβRII-Fc-Jun

Z plazmidu pFastBac-sTβRII-Fc-Jun jsme pomocí enzymů EcoRI a HindIII vyštěpili fragment sTβRII-Fc-Jun (1400 bp). Fragment byl vložen do plazmidu pBluescript, z něhož byl poté vyštěpen pomocí enzymů EcoRI a XhoI. sTβRII-Fc-Jun byl poté vložen do plazmidu pSC59 za E/L promotor. Pro vznik plazmidu pSC59-H5-sTβRII-Fc-Jun byl z plazmidu pSC59-E/L-sTβRII-Fc-Jun vyštěpen E/L promotor pomocí enzymů XhoI a Sall.

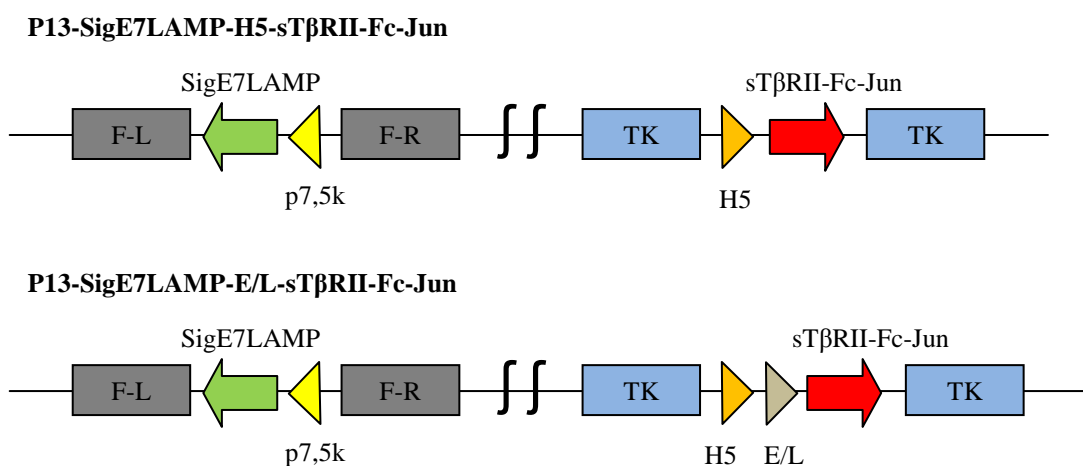
4.1.2. Příprava rekombinantního viru

Pro vznik rekombinantních VACV jsme použili plazmidy pSC59-E/L-sTβRII-Fc-Jun a pSC59-H5-sTβRII-Fc-Jun. Gen pro sTβRII-Fc-Jun pod kontrolou H5 nebo E/L promotoru jsme pomocí homologní rekombinace vložili do neesenčního genu pro tymidinkinázu virů P13 a P13-SigE7LAMP. Udělali jsme selekci rekombinant. Vlože-

ním genu sTβRII-Fc-Jun do genu pro TK, získají rekombinantní viry TK⁻ fenotyp a mohou být selektovány při množení viru na TK⁻ buněčné linii. Viry bez funkční TK nemohou využít selekční činidlo 5-bromdeoxyuridin (BUdR). BUdR je analogem tymidinu a pokud je fosforylovaný TK viru, je vkládán do DNA a je letální pro replikaci viru. TK⁻ rekombinantní viry mohou inkorporovat pouze nově syntetizovaný tymidin a množí se i v přítomnosti BUdR. Selekční kroky se musí několikrát opakovat, protože VACV může tvořit spontánní TK⁻ mutanty, které projdou selekčním tlakem. TK⁻ rekombinanty mají nižší virulenci (BULLER et al 1985).

Udělalí jsme plakovou purifikaci rekombinant. Rekombinantní VACV jsme ověřili pomocí PCR. Takto získané viry jsme titrovali pomocí plakové metody. Připravili jsme výchozí virovou suspenzi, kterou jsme také titrovali pomocí plakové metody. Připravili jsme následující rekombinanty:

1. P13-H5-sTβRII-Fc-Jun
2. P13-E/L-sTβRII-Fc-Jun
3. P13-SigE7LAMP-H5-sTβRII-Fc-Jun (znázorněno na obrázku č.8)
4. P13-SigE7LAMP-E/L-sTβRII-Fc-Jun (znázorněno na obrázku č.8)



Obrázek č.8. Genová struktura rekombinantního viru vakcinie exprimujícího SigE7LAMP + sTβRII-Fc-Jun

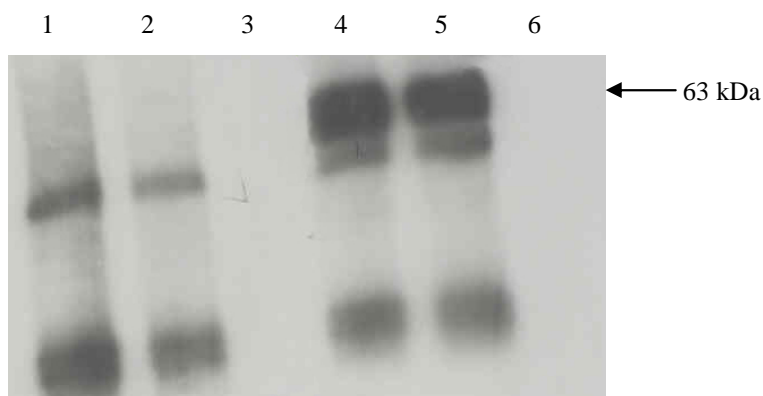
Gen pro SigE7LAMP byl vložen do F7L lokusu (neesenciální lokus) pod kontrolou časné/pozdního 7,5k promotoru. Gen pro sTβRII-Fc-Jun byl vložen do TK lokusu pod kontrolu H5 nebo E/L promotoru.

4.2. Charakteristika sTβRII-Fc-Jun

4.2.1. Ověření vazby sTβRII-Fc-Jun na protein G

Je známo, že Fc fragment se váže na protein G navázaný na agaróze (pocházející z bakterií *Streptococcus*). Díky tomu je možné fúzní proteiny s Fc fragmentem snadno izolovat. Pomocí imunoblotu jsme ověřili, zda připojení sTβRII a Jun nebrání vazbě Fc fragmentu k proteinu G.

Buňky BSC-40 jsme infikovali virem P13 a rekombinantním virem P13-E/L-sTβRII-Fc-Jun (MOI 0.1). Za 24 hodin jsme odebrali od infikovaných buněk média. Odebraná média jsme centrifugovali (2000g, 4°C, 20 minut) a odebrali jsme supernatant. K 50 μl média jsme přidali 10 μl agarózy s navázaným proteinem G a denaturační/detergentní komponenty (1% NP40/SDS/deoxycholát nebo 1% NP40). NP40/SDS/deoxycholát je více denaturující v porovnání s NP40 a zvyšuje specifitu vazby Fc fragmentu na G protein. K médiím jsme přidali dvě různě silné denaturační/detergentní komponenty, abychom pro následující pokus imunoprecipitace sTβRII-Fc-Jun (viz kapitola 5.5.) zjistili, za jakých podmínek se sTβRII-Fc-Jun může vázat na protein G. Vzorky jsme nechali 1 hodinu inkubovat na ledu za neustálého kývání. Agarózu s proteinem G jsme promyli 1 ml RIPA nebo 1 ml NP40 pufru, čímž došlo k odstranění kontaminujících proteinů a zůstaly pouze proteiny navázané na agaróze. Poté jsme vzorky povařili v 20 μl Laemmliho pufru, který způsobil rozvolnění všech proteinových komplexů, došlo tedy k uvolnění navázaného sTβRII-Fc-Jun. Vzorky jsme analyzovali pomocí denaturující SDS-PAGE a přítomnost receptoru jsme určili pomocí imunoblotu. Použili jsme primární protilátku- Goat-α-hTβRII- IgG (RD systém, USA) a sekundární protilátku- Rabbit-α-Goat IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch, USA). Výsledky imunoblotu jsou znázorněny na obrázku č. 9.



Obrázek č.9. Ověření vazby sTβRII-Fc-Jun na protein G navázaný na agaróze

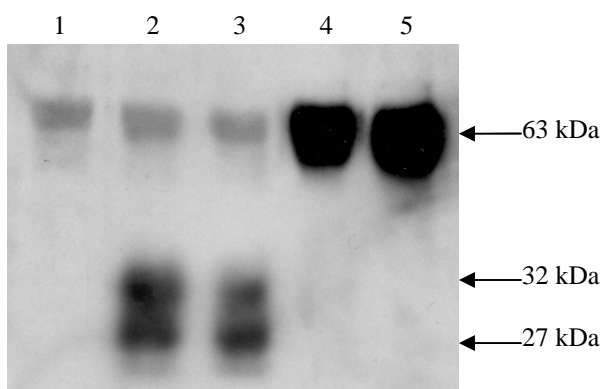
Buňky BSC-40 jsme infikovali virem P13 a rekombinantním virem P13-E/L-sTβRII-Fc-Jun (MOI 0.1). Po 24 hodinách jsme odebrali od infikovaných buněk média, média jsme centrifugovali (2000g, 4°C, 20 minut). 50 μl média jsme 1hodinu inkubovali na ledu s 10 μl agarózy s navázaným proteinem G a 1% NP40/SDS/deoxycholát nebo 1% NP40. Vzorky jsme promyli 1 ml RIPA nebo NP40 pufru a charakterizovali pomocí denaturační SDS-PAGE a imunoblotu. Jako negativní kontrolu, jsme používali virus P13. **1)** 50 μl média od buněk infikovaných virem P13, 10 μl agarózy s navázaným proteinem G, 1% NP40 **2)** 50 μl média od buněk infikovaných virem P13, 10 μl agarózy s navázaným proteinem G, 1% NP40/SDS/deoxycholát **3)** 50 μl média od buněk infikovaných virem P13, 10 μl agarózy **4)** 50 μl média od buněk infikovaných virem P13-E/L-sTβRII-Fc-Jun, 10 μl agarózy s navázaným proteinem G, 1% NP40 **5)** 50 μl média od buněk infikovaných virem P13-E/L-sTβRII-Fc-Jun, 10 μl agarózy s navázaným proteinem G, 1% NP40/SDS/deoxycholát **6)** Negativní kontrola- 50 μl média od buněk infikovaných virem P13-sTβRII-Fc-Jun s 10 μl agarózy bez přítomnosti proteinu G.

U buněk infikovaných virem P13-SigE7LAMP-E/L-sTβRII-Fc-Jun docházelo k uvolňování proteinu sTβRII-Fc-Jun do média. Pomocí metody imunoblot jsme prokázali, že dochází k vazbě sTβRII-Fc-Jun na protein G. K vazbě na protein G docházelo i v přítomnosti denaturační komponenty 1% NP40/SDS/deoxycholát. Fragment sTβRII a fragment Jun tedy nebrání vazbě fragmentu Fc na protein G.

4.2.2. Porovnání exprese sTβRII-Fc-Jun a sTβRII pod různými promotory-detekce rozdílné velikosti receptorů

Cílem tohoto pokusu bylo porovnat expresi receptoru sTβRII a sTβRII-Fc-Jun řízenou promotory H5 nebo E/L. Pozorovali jsme uvolňování receptoru do média v čase 24 hodin po infekci He-La buněk. Chtěli jsme také pozorovat různé formy receptorů dané rozdílnou glykosylací.

Postupovali jsme podle návodu pro přípravu buněčných lyzátů a médií pro SDS-PAGE (viz kapitola 3.2.3.4.). Vzorky jsme zahustili srážením acetonem (viz kapitola 3.2.4.3.) a analyzovali pomocí denaturující SDS-PAGE a imunoblotu za použití primární protilátky- Goat-α-hTβRII- IgG (RD systém, USA) a sekundární protilátky- Rabbit-α-Goat IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch, USA). Výsledky detekce receptorů v buněčných médiích v intervalu 24 hodin jsou zobrazeny na obrázku č.10.



Obrázek č.10. Porovnání exprese sTβRII-Fc-Jun a sTβRII pod různými promotory- detekce rozdílné velikosti receptorů

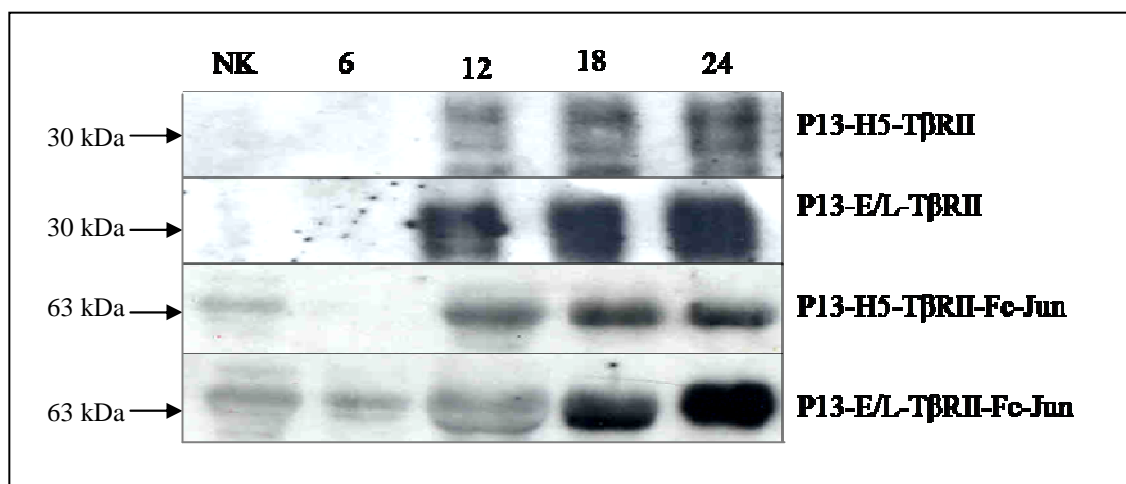
HeLa buňky jsme infikovali virem (MOI 3) **1**) P13 **2**) P13-H5-sTβRII **3**) P13-E/L-sTβRII **4**) P13-H5-sTβRII-Fc-Jun **5**) P13-E/L-sTβRII-Fc-Jun. Po 24 hodinách jsme odebrali od infikovaných buněk média, proteiny v médiích jsme sráželi acetonem a charakterizovali pomocí SDS-PAGE a imunoblotu.

Z výsledků imunoblotu je patrné, že v médiích infikovaných HeLa buněk se po 24 hodinách infekce vyskytuje více receptoru fúzovaného k Fc-Jun fragmentu sTβRII-Fc-Jun nežli pouhého sTβRII. Což potvrzuje předpoklad, že fragment Fc umožňuje lepší uvolňování rekombinantního proteinu z buněk. Exprese sTβRII-Fc-Jun je silnější pod E/L promotorem. Velikost receptoru sTβRII-Fc-Jun byla 63 kDa. U sTβRII jsme pozorovali dvě různé formy proteinu o velikosti 32 kDa a 27 kDa, což je pravděpodobně dáno rozdílnou glykosylací proteinu.

4.2.3. Exprese sTβRII-Fc-Jun a sTβRII pod různými promotory- detekce množství rekombinantního receptoru v médiích a lyzátech infikovaných buněk

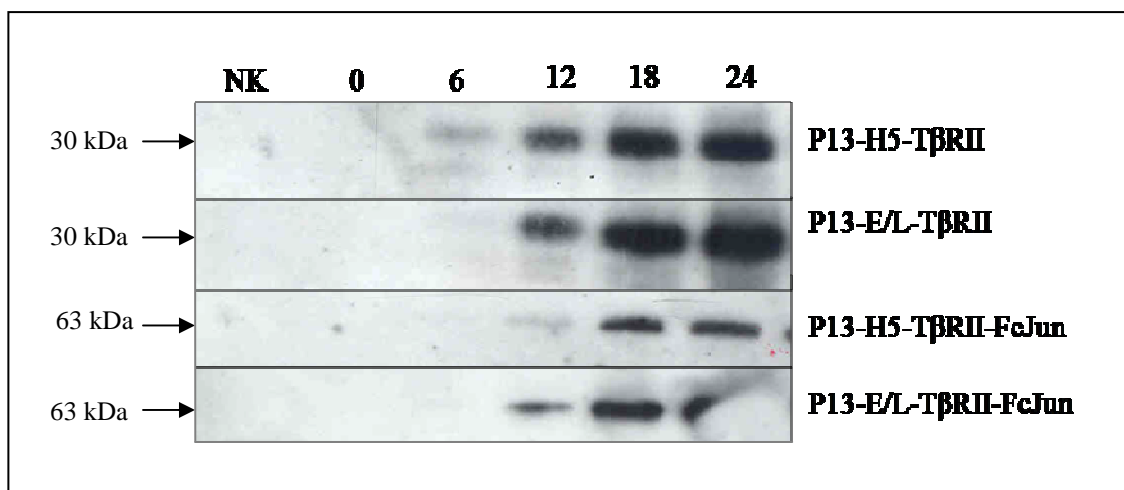
V tomto pokusu jsme pozorovali rozdíly v expresi sTβRII a sTβRII-Fc-Jun řízenou promotory H5 nebo E/L v časových intervalech 6, 12, 18 a 24 hodin po infekci HeLa buněk rekombinantními viry. Pozorovali jsme množství exprimujícího se proteinu u jednotlivých virů v různých časových intervalech. Zajímalo nás také porovnání míry exprese mezi jednotlivými viry a porovnání množství proteinu v buněčných médiích a v lyzátech infikovaných buněk.

Postupovali jsme podle návodu pro přípravu buněčných lyzátů a médií pro SDS-PAGE (viz kapitola 3.2.3.4.). Buněčná média jsme zahustili srážením acetonem (viz kapitola 3.2.4.3.). Média a lyzáty infikovaných buněk jsme analyzovali pomocí denaturující SDS-PAGE a imunoblotu za použití primární protilátky- Goat-α-hTβRII- IgG (RD systém, USA) a sekundární protilátky- Rabbit-α-Goat IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch, USA). Výsledky vzorků z buněčných médií jsou znázorněny na obrázku č.11. Výsledky vzorků z lyzátů buněk jsou znázorněny na obrázku č.12.



Obrázek č.11. Detekce rekombinantních receptorů v médiích infikovaných HeLa buněk

HeLa buňky jsme infikovali viry (MOI 3). Po 6, 12, 18 a 24 hodinách jsme odebrali od infikovaných buněk média, proteiny přítomné v odebraných médiích jsme sráželi acetonem a charakterizovali pomocí SDS-PAGE a imunoblotu. Jako negativní kontrola (NK) bylo použito médium (odebrané 30 hodin po infekci) z buněk infikovaných virem P13, NK je znázorněna v prvním sloupci. Ostatní sloupce znázorňují jednotlivé časové intervaly (6, 12, 18, 24 hodin). **1. řada:** exprese sTβRII pod kontrolou H5 promotoru. **2. řada:** exprese sTβRII pod kontrolou E/L promotoru. **3. řada:** exprese sTβRII-Fc-Jun pod kontrolou H5 promotoru. **4.řada:** exprese sTβRII-Fc-Jun pod kontrolou E/L promotoru.



Obrázek č.12. Detekce rekombinantních receptorů v lyzátech infikovaných HeLa buněk

HeLa buňky jsme infikovali virem (MOI 3). Po 0, 6, 12, 18 a 24 hodinách jsme buňky lyzovali 30 minut ve 100 μ l NP40 pufru, poté jsme buňky centrifugovali (13 000g, 4°C, 10 minut), odebrali jsme supernatant. Odebrané supernatanty jsme charakterizovali pomocí SDS-PAGE a imunoblotu. Jako negativní kontrola (NK) byly použity buňky infikované virem P13 (zpracované 30 hodin po infekci buněk), NK je znázorněna v prvním sloupci. Ostatní sloupce znázorňují jednotlivé časové intervaly (0, 6, 12, 18, 24 hodin). **1. řada:** exprese sT β RII pod kontrolou H5 promotoru. **2. řada:** exprese sT β RII pod kontrolou E/L promotoru. **3. řada:** exprese sT β RII-Fc-Jun pod kontrolou H5 promotoru. **4. řada:** exprese sT β RII-Fc-Jun pod kontrolou E/L promotoru.

Množství rekombinantního receptoru se v postupujícím čase zvyšovalo u všech vzorků a to jak v médiích tak i v lyzátech infikovaných buněk. Exprese sT β RII-Fc-Jun i sT β RII byla vyšší pod kontrolou E/L promotoru než pod kontrolou H5 promotoru, je známo, že E/L je silnější promoter než H5. V lyzátech buněk se nachází více receptoru sT β RII než sT β RII-Fc-Jun.

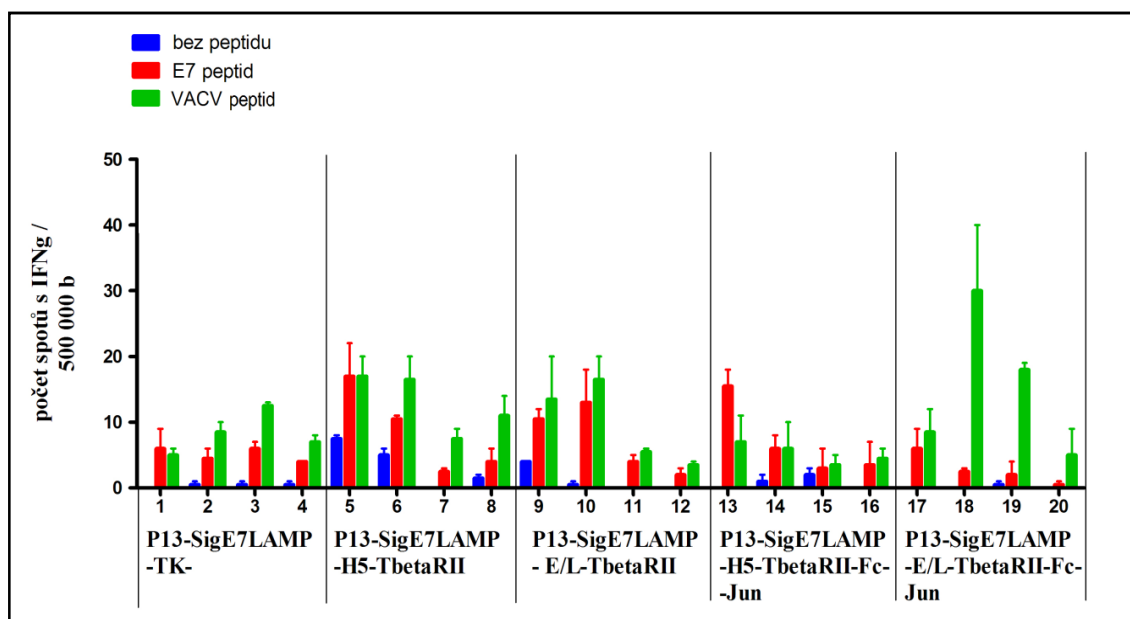
4.3. Imunizační pokusy

4.3.1. Testování buněčné imunitní odpovědi po imunizaci virovými vakcínami

Při tomto pokusu jsme sledovali T buněčnou imunitní odpověď specifickou pro E7 peptid a VACV peptid. Zajímalo nás, zda koexprese sT β RII-Fc-Jun má vliv na imunogenní vlastnosti virových vakcín. Imunitní odpověď byla měřena pomocí testu ELISPOT pro IFN- γ .

Samice (stáří 6 týdnů) kmene myši C57BI/6 byly rozděleny do 5 skupin po 4 myších. Každé skupině byla podána jiná virová vakcína. Za 12 dní po imunizaci byly myším odebrány sleziny. Sleziny byly zpracovány pro přípravu splenocytů.

Po izolaci splenocytů na pokusy *ex vivo* jsme udělali testy ELISPOT pro IFN- γ . Tyto splenocyty jsme v průběhu pokusu stimulovali E7 peptidem a VACV peptidem. Tyto peptidy měly sekvenci E7₍₄₉₋₅₇₎ (RAHYNIVTF) a E3 VACV₍₁₄₀₋₁₄₈₎ (VGPSNSPTF). Počty spotů zaznamenaných u jednotlivých skupin jsme zanesli do grafu č.1. Každý spot odpovídá jedné buňce produkující IFN- γ .



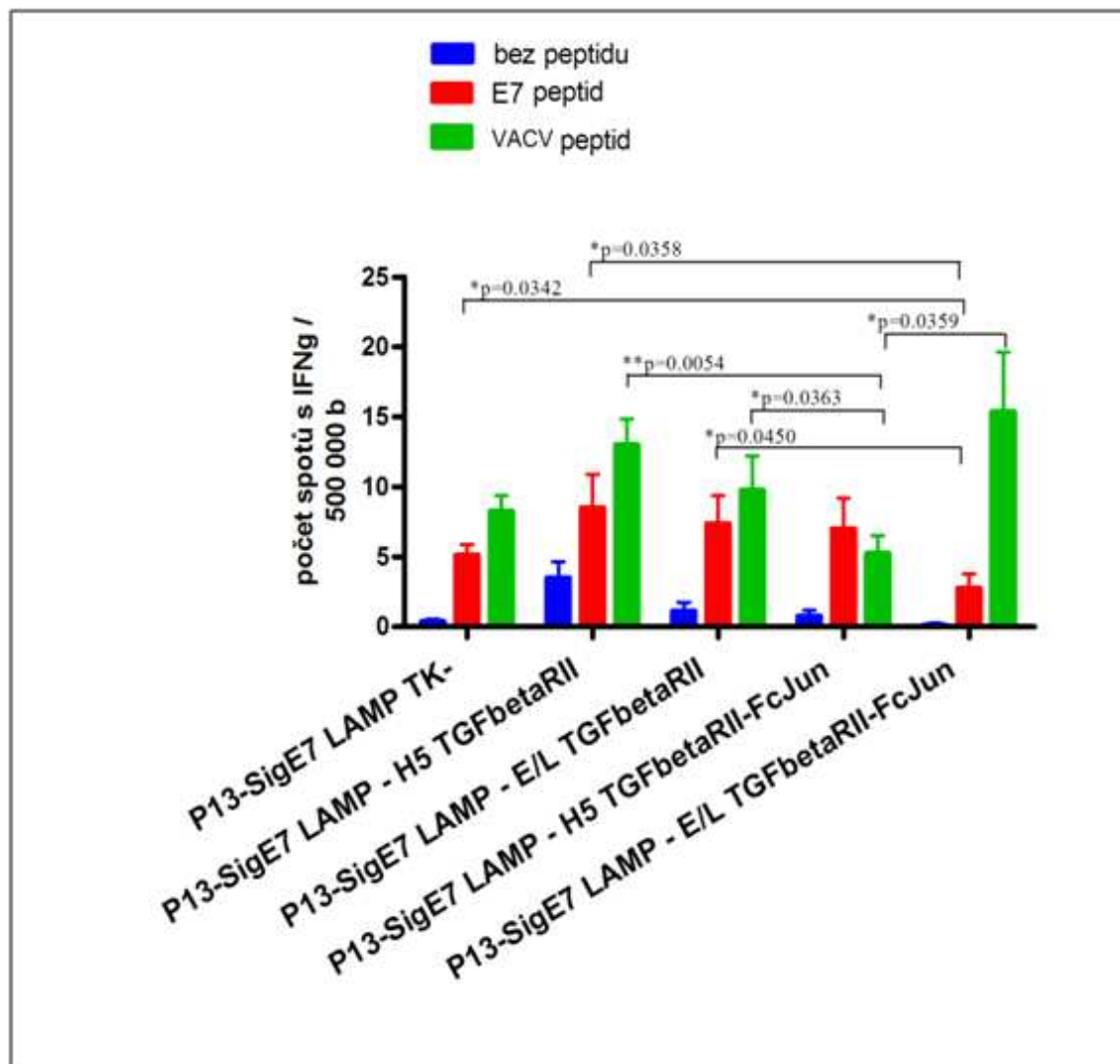
Graf č.1. Detekce buněčné imunitní odpovědi *ex vivo* po imunizaci virovými vakcínami pomocí metody ELISPOT pro IFN- γ .

Myši kmene C57BI/6 (samice, stáří 6 týdnů) byly imunizovány jednou dávkou virových vakcín 3×10^6 PFU. Pro imunizaci byly použity tyto vakcíny P13-SigE7LAMP-TK, P13-SigE7LAMP-H5-sT β RII, P13-SigE7LAMP-E/L-sT β RII, P13-SigE7LAMP-H5-sT β RII-Fc-Jun a P13-SigE7LAMP-E/L-sT β RII-Fc-Jun. 12 dní po imunizaci jsme myším odebrali sleziny a izolovali jsme splenocyty. Pomocí testu ELISPOT pro IFN- γ jsme určili buněčnou imunitní odpověď specifickou pro E7 peptid a VACV peptid.

Pokusem jsme zjistili, že splenocyty izolované z myší imunizovaných virovými vakcínami nesoucími gen pro E7 protein produkovaly IFN- γ v odpovědi na E7 peptid. Pozorovali jsme také buněčnou imunitní odpověď specifickou pro VACV peptid.

Zda se mezi jednotlivými skupinami vyskytují signifikantní statistické rozdíly, jsme určili pomocí programu GraphPad Prism verze 5.00 (GraphPad Software, San Diego California USA). Výsledky jsme zpracovávali pomocí testu- dvoucestná

ANOVA. Statisticky signifikantní rozdíly pro *ex vivo* pokusy jsou znázorněny v grafu č.2, ve kterém jsme ukázali průměry naměřených hodnot pro daný peptid v každé skupině



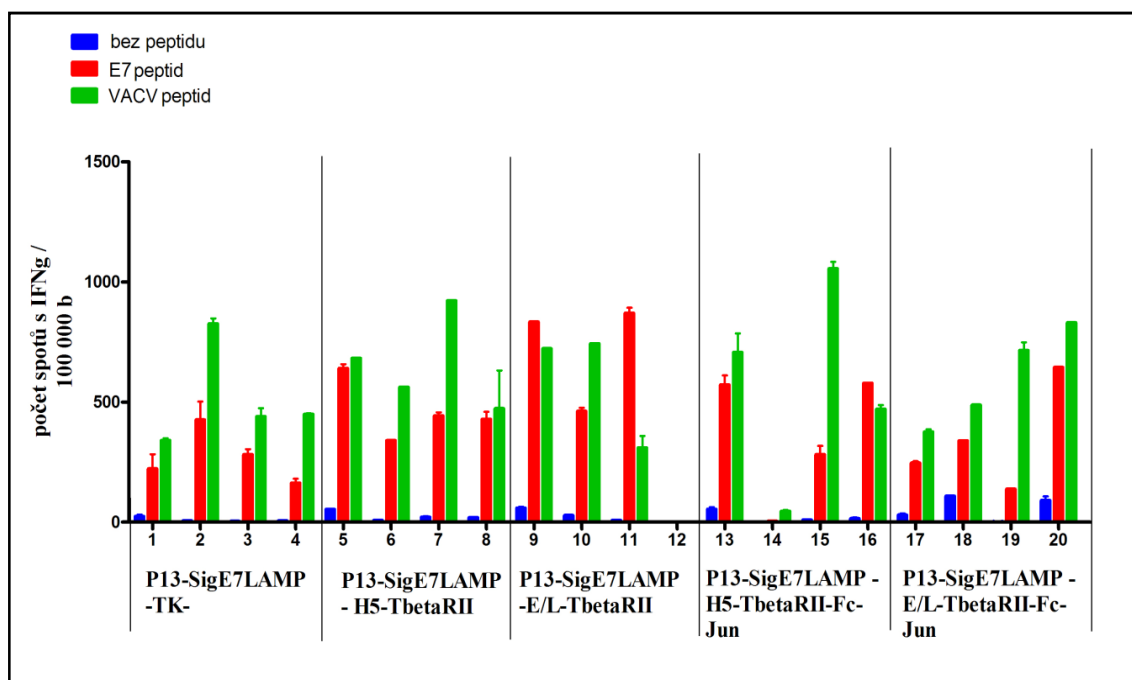
Graf č.2: Znázornění statisticky významných rozdílů v počtu buněk produkujících IFN- γ při detekci buněčné imunitní odpovědi *ex vivo*.

Imunizace myši a detekce buněčné imunitní odpovědi specifické pro E7 peptid a VACV peptid probíhaly za stejných podmínek, jaké jsou popsány u grafu č.1. V tomto grafu jsou znázorněny průměry hodnot zaznamenaných v grafu č.1.

Při tomto pokusu jsme zjistili, že nejnižší buněčnou imunitní odpověď specifickou pro E7 peptid vyvolala dvojitá rekombinanta P13-SigE7LAMP-E/L-sT β RII-Fc-Jun, tento rozdíl se prokázal statisticky v porovnání se všemi ostatními skupinami mimo dvojité rekombinanty P13-SigE7LAMP-H5-sT β RII-Fc-Jun.

Při sledování buněčné odpovědi specifické pro VACV peptid jsme nezjistili žádné signifikantní rozdíly mezi P13-SigE7LAMP-TK⁻ a dvojitými rekombinantami. Koexprese sTβRII pod vlivem H5 i E/L promotoru vyvolává vyšší imunitní odpověď specifickou pro VACV peptid než koexprese sTβRII-Fc-Jun pod H5 promotorem. Imunitní odpověď specifická pro VACV peptid vyvolaná koexpresí sTβRII-Fc-Jun pod E/L promotorem je také výrazně vyšší než u dvojitě rekombinanty P13-SigE7LAMP-H5-sTβRII-Fc-Jun.

Část izolovaných splenocytů jsme použili pro restimulaci peptidem. Výsledky testu ELISPOT pro IFN γ po restimulaci jsou zaznamenány v grafu č.3, kde je zobrazen počet spotů s IFN- γ na 100 000 buněk (v grafu č.1 a 2 je zobrazen počet spotů s IFN- γ na 500 000 buněk). Po pěti denní stimulaci peptidem docházelo k vysoké aktivaci splenocytů specifických pro VACV peptid i E7 peptid.

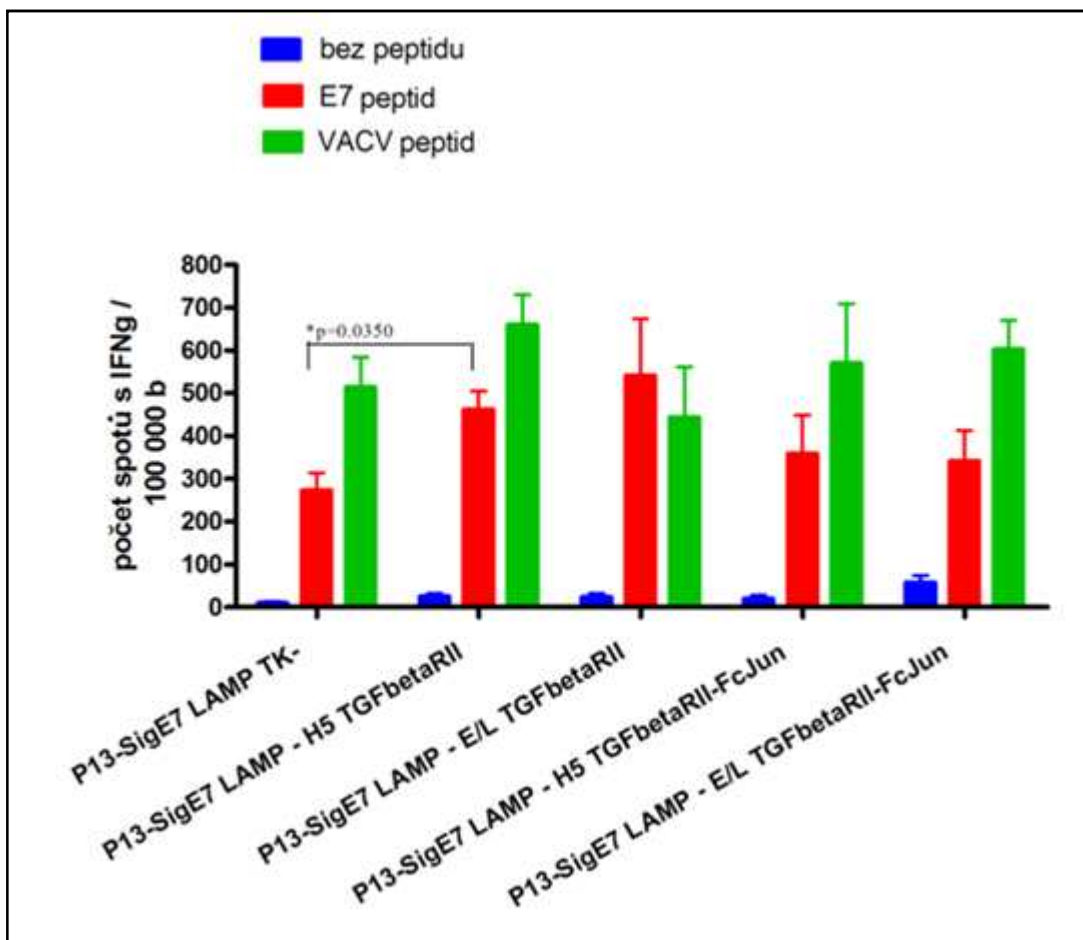


Graf č.3. Detekce buněčné imunitní odpovědi pomocí metody ELISPOT pro IFN- γ po pěti denní stimulaci E7 peptidem a VACV peptidem.

Myši kmene C57BI/6 (samice, stáří 6 týdnů) byly imunizovány jednou dávkou virových vakcín 3×10^6 PFU. Pro imunizaci byly použity tyto vakcíny P13-SigE7LAMP-TK⁻, P13-SigE7LAMP-H5-sTβRII, P13-SigE7LAMP-E/L-sTβRII, P13-SigE7LAMP-H5-sTβRII-Fc-Jun a P13-SigE7LAMP-E/L-sTβRII-Fc-Jun. 12 dní po imunizaci jsme myším odebrali sleziny a izolovali jsme splenocyty. Izolované splenocyty jsme kultivovali 5 dní v přítomnosti stimulačního peptidu (0,01 $\mu\text{g/ml}$ VACV peptidu, 0,0025 $\mu\text{g/ml}$ E7 peptidu). Pomocí testu ELISPOT pro IFN- γ jsme určili buněčnou imunitní odpověď specifickou pro E7 peptid a VACV peptid.

Po pěti denní stimulaci peptidy jsme u všech skupin pozorovali nárůst vyvolané imunitní odpovědi specifické pro E7 peptid a VACV peptid.

Stejně jako při pokusech *ex vivo* jsme pomocí testu dvoucestná ANOVA určili, zda se mezi jednotlivými skupinami nacházejí statisticky významné rozdíly. Tyto rozdíly jsme vyjádřili v grafu č.4., ve kterém jsme ukázali průměry naměřených hodnot pro daný peptid v každé skupině.



Graf č.4. Znázornění statisticky významných rozdílů v počtu buněk produkujících IFN- γ při detekci buněčné imunitní odpovědi po restimulaci peptidem.

Imunizace myši a detekce buněčné imunitní odpovědi specifické pro E7 peptid a VACV peptid probíhaly za stejných podmínek, jaké jsou posány u grafu č.3. V tomto grafu jsou znázorněny průměry hodnot zaznamenaných v grafu č.3.

Vyvolaná imunitní odpověď po stimulaci peptidem byla u všech skupin velmi podobná. Rozdíl jsme zaznamenali pouze při odpovědi na E7 peptid u dvojité rekombinanty nesoucí sT β RII pod H5 promotorem, kdy byla buněčná imunitní odpověď statisticky významně vyšší v porovnání s P13-SigE7LAMP-TK.

Při těchto pokusech jsme prokázali, že rekombinantní virus P13-SigE7LAMP-H5-sT β RII vyvolával větší T buněčnou imunitní odpověď specifickou pro E7 peptid v porovnání s P13-SigE7LAMP-TK $\bar{}$. Při detekci buněčné imunitní odpovědi *ex vivo* jsme již mohli pozorovat větší počet buněk produkujících IFN- γ po imunizaci s P13-SigE7LAMP-H5-sT β RII v porovnání s P13-SigE7LAMP-TK $\bar{}$, tento rozdíl nebyl prokázán jako statisticky významný. Po stimulaci E7 peptidem byl již tento rozdíl potvrzen statisticky.

4.4. Pokusy *in vivo*

4.4.1. Účinek sT β RII-Fc-Jun na funkci protinádorové vakcíny při terapii TC-1 nádorů

TC-1 buňky jsou odvozené od primárních epitelálních buněk myšího kmene C57BL/6 kotransformovaných geny E6 a E7 z HPV-16 a c-Ha-ras. TC-1 buňky jsou dobrým modelovým příkladem pro studium karcinomu cervixu. Pomocí tohoto nádorového myšího modelu lze sledovat účinek vakcín na rychlost regrese nádorů. Při tomto pokusu jsme pozorovali vliv sT β RII-Fc-Jun na funkci protinádorové virové vakcíny. Zajímalo nás, zda tento rozpustný receptor pomáhá virové vakcíně nesoucí gen pro SigE7LAMP zvyšovat protinádorovou imunitu.

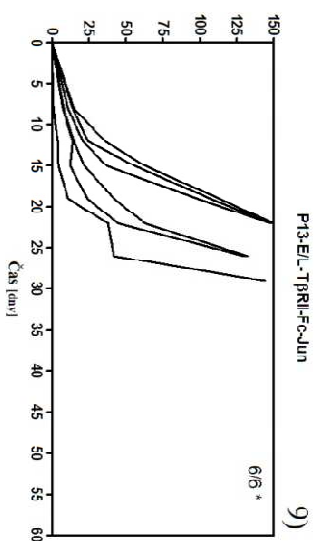
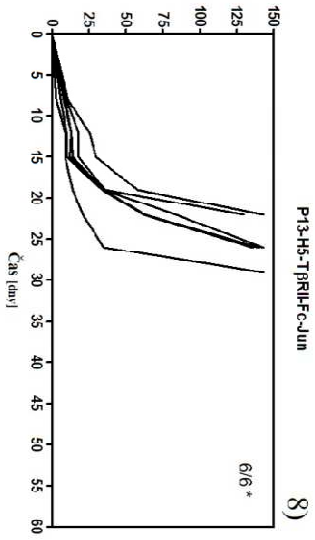
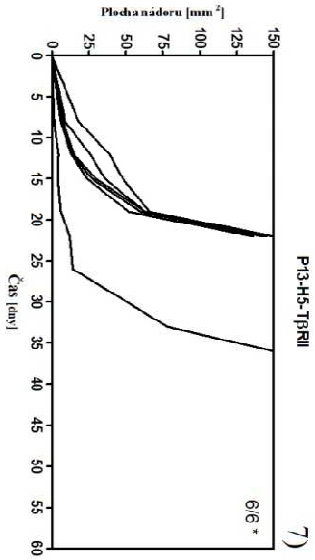
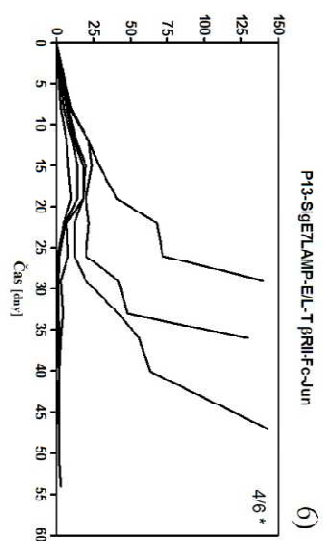
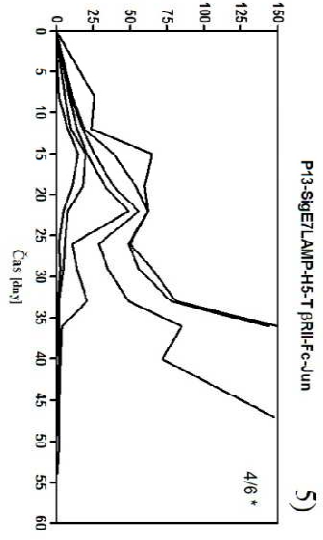
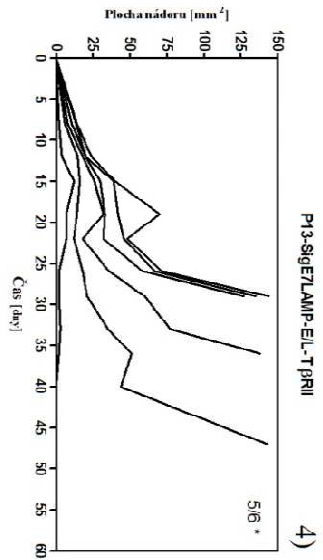
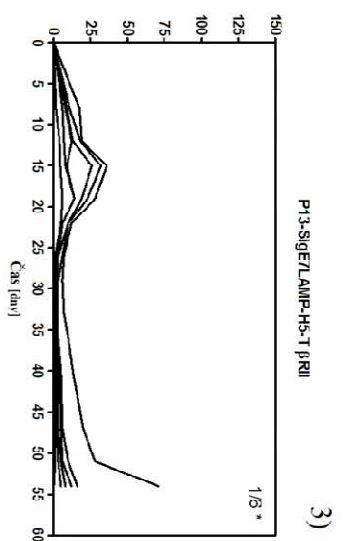
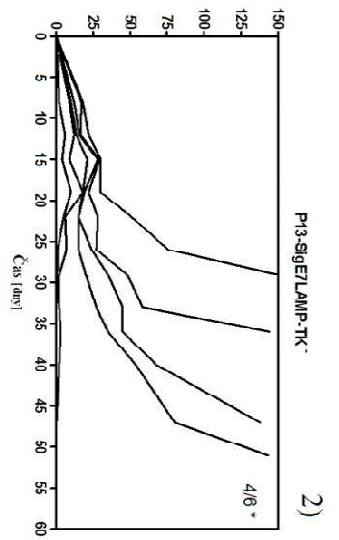
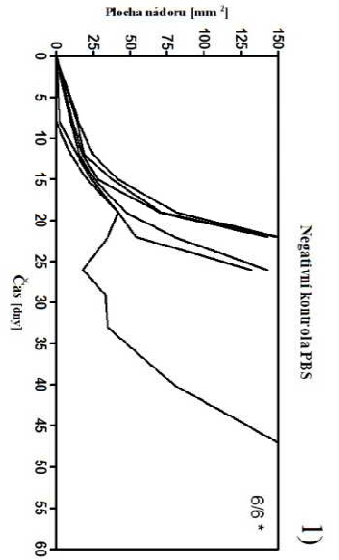
Myši byly rozděleny do 10 skupin po 6 myších. Myším byly subkutánně podány nádorové buňky, 7 dní po podání byly myším očkovány viry. Postupovalo se dle návodu pro protinádorové testy *in vivo* (viz kapitola 3.2.6.). 8 dní po podání nádorových buněk jsme měřili růst nádorů v intervalech 3-4 dní po dobu 54 dní.

Vliv virových rekombinant na regresi nádorů jsme zaznamenali do grafu č.5. Rozdíly v naměřených hodnotách ve dnech 22 a 33 jsme vyhodnotili statisticky pomocí testu dvoucestná ANOVA v programu GraphPad Prism verze 5.00, tyto výsledky jsou diskutovány v kapitole č.5.

Graf č.5. Porovnání vlivu koexprese genu sTβRII nebo sTβRII-Fc-Jun na regresí nádorů TC-1 vyvolanou virovou vakcínou

Myším (samice) kmene C57BI/6 stáří 6 týdnů se podali nádorové buňky TC-1 (6×10^4 buněk/ myš). Po 9 dnech byly myši imunizovány virovými vakcínami (1×10^6 PFU). Pro imunizaci jsme použili: 1) PBS-negativní kontrola 2) P13-SigE7LAMP-TK 3) P13-SigE7LAMP-H5-sTβRII 4) P13-SigE7LAMP-E/L-sTβRII 5) P13-SigE7LAMP-H5-sTβRII-Fc-Jun 6) P13-SigE7LAMP-E/L-sTβRII-Fc-Jun 7) P13-H5-sTβRII (virový vektor) 8) P13-H5-sTβRII-Fc-Jun (virový vektor) 9) P13-E/L-sTβRII-Fc-Jun (virový vektor). Plochu nádorů jsme poté měřili v intervalech 3-4 dní po dobu 54 dní. V každém grafu je znázorněn růst nádorů u myší jedné skupiny.

* Zlomky znázorňují počet myší s nádory z celkového počtu myší ve skupině v čase 33 dní po imunizaci (tento časový interval byl vyhodnocen také statisticky pomocí testu dvoucestná ANOVA viz kapitola č.5)



Z výsledků je patrné, že na regresi růstu nádorů nejlépe působila dvojitá rekombinanta P13-SigE7LAMP-H5-sT β RII, kdy došlo k regresi nádorů u pěti myší ze šesti. Exprese sT β RII pod E/L promotorem nijak neovlivnila účinek virové vakcíny. Bohužel při očkování dvojitými rekombinantami nesoucími gen pro receptor fúzovaný k Fc-Jun (P13-SigE7LAMP-H5-sT β RII-Fc-Jun a P13-SigE7LAMP-E/L-sT β RII-Fc-Jun) nedošlo k signifikantním změnám ve schopnosti virové vakcíny vyvolat protinádorovou imunitu. Virové vektory nesoucí pouze gen pro rozpustné receptory (P13-H5-T β RII, P13-H5-T β RII-Fc-Jun a P13-E/L-T β RII-Fc-Jun) nijak neovlivnily růst nádorů.

5. Diskuze

5.1. Příprava rekombinantních virů

Cílem této práce bylo sestrojít rekombinantní viry vakcinie exprimující sTβRII-Fc-Jun pod kontrolou E/L nebo H5 promotoru. Tento sTβRII-Fc-Jun měl zlepšovat účinky protinádorové virové vakcíny exprimující SigE7LAMP, tato vakcína je testována na našem pracovišti pro využití při terapii karcinomu cervixu. Infekce virem vakcinie indukuje uvolnění prozánětlivých cytokinů a chemokinů, které stimulují přirozenou imunitu a aktivují Th1 T buněčnou imunitní odpověď vedoucí k eliminaci buněk infikovaných virem či buněk nádoru. Proto jsou rekombinantní viry vakcinie hojně studované pro využití při terapii nádorů či virových infekcí.

Rizikové typy HPV, obzvláště HPV-16, jsou asociovány s mnoha typy karcinomů cervixu. E6 a E7 proteiny jsou nezbytné pro buněčnou transformaci a jsou exprimovány ve většině karcinomů cervixu. Imunizace rekombinantními VACV kódujícími E6 a E7 HPV-16 protein má v dnešní době klinické úspěchy u řady pacientů s HPV asociovanými karcinomy (BALDWIN et al. 2003, DAVIDSON et al. 2003). Protein E7 představuje výhodný cíl při terapii nádorů. My jsme použili fúzní protein SigE7LAMP. Tento fúzní protein se skládá ze signální sekvence proteinu LAMP (Sig) a z cytoplazmatické a transmembránové domény proteinu LAMP (LAMP) a cílí E7 do endozómů a lyzozómů. Tím dochází ke zvýšení prezentace antigenů pomocí MHCgp II na buněčném povrchu, tyto antigeny jsou poté rozeznávány pomocí CD4⁺ T lymfocytů. Při imunizaci SigE7LAMP dochází také ke zvýšení CD8⁺ cytotoxických T lymfocytů, které patří mezi nejvýznamnější složku protinádorové imunity (Lin et al. 1996, Ji et al. 1999).

Rozpustné receptory pro TGFβ se v dnešní době zkoumají pro jejich využití při terapii nádorů, kdy pomáhají neutralizovat účinky pronádorového TGFβ, jenž je produkován ve velkém množství v pokročilých stádiích karcinogeneze a pomáhá růstu a šíření nádoru. sTβRII získává díky fúzi k Fc fragmentu řadu výhod, mezi které patří například dimerizace receptoru či zvýšení životnosti v cirkulačním systému. Vložení krátkého fragmentu Jun údajně snižuje vazbu Fc fragmentu na Fc receptory. Konstrukt sTβRII-Fc-Jun má údajně vyšší kapacitu vazby TGFβ než pouhý sTβRII-Fc (Kowalczyk, osobní sdělení).

Připravili jsme plazmid pro rekombinaci pSC59-E/L-sT β RII-Fc-Jun. Plazmid pSC59 patří mezi nízkokopiové plazmidy, takže jsme při jeho množení v bakteriích použili antibiotikum chloramfenikol, které upřednostní množení plazmidové DNA. Pro vznik plazmidu pSC59-H5-sT β RII-Fc-Jun jsme vyštěpili z plazmidu pSC59-E/L-sT β RII-Fc-Jun promotor E/L pomocí enzymů XhoI a Sall. Tyto enzymy mají stejnou štěpící palindromickou sekvenci a po zpětné ligaci plazmidu se zruší štěpící místo. Nemuseli jsme tedy znovu klonovat gen pro sT β RII-Fc-Jun před H5 promotor plazmidu pSC59.

Pro vznik rekombinantních vakcín je důležité, aby byl virus málo virulentní a přitom zůstal dostatečně imunogenní. Tyto požadavky splňuje virus vakcinie P13 (KUTINOVÁ et al. 1995), který jsme zvolili pro rekombinaci. V rekombinantním plazmidu pSC59-H5 je gen pro sT β RII-Fc-Jun umístěn uvnitř genu pro TK (TKL a TKR), lze ho tedy pomocí homologní rekombinace vložit do genu pro TK viru P13. Exprese sT β RII-Fc-Jun byla řízena promotory E/L nebo H5. Pro pozorování vlivu sT β RII-Fc-Jun na účinek protinádorových vakcín byly zkonstruovány dvojité rekombinanty P13-SigE7LAMP-H5-sT β RII-Fc-Jun a P13-SigE7LAMP-E/L-sT β RII-Fc-Jun. Rekombinantní vir P13-SigE7LAMP-TK⁻ byl v naší laboratoři vyrobený již dříve. Pro přípravu P13-SigE7LAMP-TK⁻ byl použit rekombinační plazmid p11K, který má gen pro TK přerušovaný 11k promotorem a multi klonovacím místem, my jsme tento virus při našich pokusech používali pro kontrolu. Pozorovali jsme produkci rozpustného receptoru, vliv na T buněčnou imunitní odpověď a také jsme rekombinantní viry zkoumali při *in vivo* testech.

5.2. Charakteristika sT β RII-Fc-Jun

Fc fragment IgG má schopnost vázat se na B1 doménu proteinu G (FRICK et al. 1992), tato vazba je polárního charakteru a obsahuje dvě dobře definované interakce „knobs-into-holes“. Je známo, že Fc fúzní proteiny se dají snadno purifikovat afinitní chromatografií pomocí proteinu G imobilizovaného na agaróze. Zajímalo nás, zda vazba Jun a sT β RII k fragmentu Fc u našeho rekombinantního proteinu nebrání vazbě na protein G. V dnešní době dostupné literatuře se tímto problémem nikdo nezabýval. Imunoblotem jsme pomocí protilátek proti sT β RII detekovali receptor navázaný na protein G. Tímto pokusem jsme ověřili, že rekombinantní protein sT β RII-Fc-Jun se váže na pro-

tein G, vazba Jun a sTβRII tudíž na Fc fragmentu neovlivňuje vazebné místo pro B1 doménu proteinu G.

Je známo, že Fc fragment umožňuje lepší sekreci rekombinantních proteinů do média. Pomocí imunoblotu jsme zjistili, že v médiích HeLa buněk bylo 24 hodin po infekci detekováno větší množství sTβRII-Fc-Jun v porovnání s sTβRII. Exprese sTβRII-Fc-Jun byla také silnější pod kontrolou E/L promotoru než pod kontrolu H5 promotoru, syntetický časně/pozdní E/L promotor je silnější nežli přirozený časně/pozdní H5 promotor.

Receptor sTβRII byl sekretován z buněk ve dvou různých formách (27 kDa a 32 kDa). Tyto dvě velikosti jsou dány nejspíše rozdílnou glykosylací, která byla prokázána již dříve (LIN et al. 1995, TSANG et al. 1995). U receptoru sTβRII-Fc-Jun jsme ze získaných výsledků nebyli schopni určit, zda se jedná o dvě různé formy proteinu. Pro toto zjištění bude nutné dodělat pokus, kdy lze např. detekovat sTβRII-Fc-Jun pomocí imunoblotu, kdy pro SDS-PAGE použijeme méně procentní gel pro lepší rozlišení různých forem proteinu. Také lze N-glykosylaci blokovat tunikamycinem. U fúzního receptoru sTβRII-Fc byly však pozorovány různé velikosti dané rozdílnou glykosylací (KOMESLI et al. 1998, ISAKA et al. 1999).

Porovnávali jsme také množství rekombinantního receptoru v médiích a lyzátech infikovaných HeLa buněk. Přítomnost receptoru sTβRII-Fc-Jun jsme detekovali nejdříve 12 hodin po infekci a to jak v buněčných médiích, tak i v lyzátech infikovaných buněk. Větší množství receptoru sTβRII-Fc-Jun bylo přítomno v buněčných médiích nežli v lyzátech buněk a to ve všech pozorovaných časech 12, 18 a 24 hodin po infekci, což opět potvrzuje schopnost buněk sekretovat proteiny fúzované k Fc fragmentu. V buňkách jsme také pozorovali větší množství sTβRII proteinu než sTβRII-Fc-Jun. Molekula sTβRII nemá schopnost tvořit homodimery a zůstává přednostně uvnitř infikovaných buněk. Množství solubilních receptorů v buněčných médiích nelze porovnat, jelikož do média byly sekretovány vysoce glykosylované formy proteinů. Bohužel pro lepší vyhodnocení jsem neměla k dispozici software pro kvantitativní vyhodnocení. Do budoucna by bylo také dobré zopakovat pokus za použití méně procentního gelu, kdy by se daly pozorovat jednotlivé formy proteinu.

Tento pokus jsme dělali také na CV1 buňkách (výsledky nezobrazeny), kdy jsme potvrdili větší výskyt sTβRII-Fc-Jun v médiích infikovaných CV1 buněk v porovnání s buněčnými lyzáty. Z výsledků tohoto pokusu vyplývá, že Fc fragment umožňuje sekreci sTβRII-Fc-Jun do média. Větší množství receptoru uvolněného z buněk může

efektivněji vychytávat pronádorový TGF β při terapii nádorů a tím podporovat funkce vakcín cílených proti nádorům.

5.3. Imunizační pokusy

Účinnost protinádorových vakcín můžeme hodnotit pomocí detekce protinádorové imunitní odpovědi *in vitro*. Nejvýznamnější složkou protinádorové imunity jsou CD8⁺ cytotoxické T lymfocyty (CTL). Účinná terapeutická vakcinace proti HPV-16 asociovaným nádorům souvisí s Th¹ a CD8⁺ T buněčnou odpovědí proti E2, E6 a E7 proteinu (NAKAGAWA et al. 2002). Pro hodnocení specifické imunitní odpovědi *in vitro* jsme použili test ELISPOT pro IFN- γ , pomocí něhož lze určit počet T lymfotů produkujících IFN- γ po stimulaci peptidem. Zajímalo nás, zda dvojitě rekombinanty nějakým způsobem ovlivňují schopnost virové vakcíny P13-SigE7LAMP-TK⁻ vyvolávat buněčnou imunitní odpověď.

Myši jsme imunizovali rekombinantními viry a ze splenocytů izolovaných za 12 dní jsme testovali specifickou T buněčnou imunitní odpověď proti E7 peptidu a VACV peptidu. Peptid E7₍₄₉₋₅₇₎ HPV-16 (RAHYNIVTF) je dominantní H-2D^b-specifický CTL epitop (FELTKAMP et al. 1993). Peptid VACV₍₁₄₀₋₁₄₈₎ VACV-E3 je dominantní H-2D^d CTL epitop (TSCHARKE et al. 2006).

Při pokusu *ex vivo* jsme detekovali u všech typů rekombinat T buněčnou imunitní odpověď specifickou pro E7 a VACV antigeny. Pro ověření, zda dochází ke statisticky významným rozdílům v produkci INF- γ mezi jednotlivými skupinami jsme použili statistický test dvoucestná ANOVA v programu GraphPad Prism verze 5.00. Imunitní odpověď proti E7 antigenu v porovnání s jednoduchou rekombinantou byla u dvojitých rekombinant nesoucích gen pro sT β RII-Fc-Jun pod E/L i H5 promotorem signifikantně odlišná- P hodnota byla u dvojitě rekombinanty P13-SigE7LAMP-H5-sT β RII-Fc-Jun 0,0210 a u P13-SigE7LAMP-E/L-sT β RII-Fc-Jun 0,0342. Z výsledků nelze určit, zda je skutečně imunitní odpověď vyvolaná dvojitými rekombinantami exprimujícími sT β RII-Fc-Jun nižší v porovnání s jednoduchou rekombinantou. Statistické výsledky nedosáhly velmi signifikantních hodnot a také by bylo potřeba udělat další pokusy na větším počtu myší a s nezávisle připravenými virovými koncentráty.

Buněčnou imunitní odpověď specifickou pro E7 antigen a VACV antigen jsme zkoumali také po pětidenní stimulaci splenocytů peptidy E7 a VACV. Po této stimulaci docházelo k vysoké produkci INF- γ splenocyty specifickými pro E7 a VACV antigen.

Výsledky jsme pro ověření vyhodnotili statisticky pomocí testu dvoucestné ANOVY. Tento test určil statisticky významný rozdíl v imunitní odpovědi specifické pro E7 antigen mezi jednoduchou rekombinantou a dvojitou rekombinantou P13-SigE7LAMP-H5-sTβRII, kdy dvojitá rekombinata vyvolávala po restimulaci silnější imunitní odpověď než rekombinanta jednoduchá.

Tímto pokusem jsme prokázali, že imunizace dvojitými rekombinantami nesoucími gen pro E7 antigen HPV-16 indukuje T buněčnou imunitní odpověď specifickou proti E7 antigenu i proti VACV antigenu. Imunitní odpověď pro E7 antigen v jednoduchých rekombinantách byla prokázána již dříve (NĚMEČKOVÁ et al. 2002, RITTICH et al. 2005, MACKOVÁ et al. 2006). U dvojitých rekombinant bylo prokázáno zvýšení buněčné imunitní odpovědi v porovnání s rekombinantou jednoduchou, kdy koexprese Flt3L virem P13-FL-SigE7LAMP indukovala zvýšení buněčné imunitní odpovědi specifické pro E7 HPV-16 antigen a E3 VACV antigen (ŽŮRKOVÁ et al. 2009). My jsme také pozorovali nárůst buněčné imunitní odpovědi specifické pro E7 antigen, kterou vyvolávala imunizace dvojitou rekombinantou P13-SigE7LAMP-H5-sTβRII.

5.4. Pokusy *in vivo*

Vedle hodnocení účinnosti protinádorových vakcín pomocí detekce imunitní odpovědi *in vitro*, lze tuto účinnost hodnotit také *in vivo* sledováním vlivu koexprese sTβRII-Fc-Jun na působení virové vakcíny při terapii nádorů. Pro vznik modelových nádorů karcinomu cervixu jsme použili buňky TC-1. TC-1 buňky jsou odvozené od primárních epiteliálních buněk myšího kmene C57BL/6. Buňky jsou imortalizované díky expresi genů E6 a E7 HPV-16, které zachovávají maligní fenotyp, a transformované mutovaným ras onkogenem, který simuluje buněčné procesy při vzniku karcinomu cervixu. Nádory odvozené od TC-1 buněk se používají k testování virových vakcín cílených proti HPV-16 asociovaným nádorům.

Myším jsme subkutánně podali 6×10^4 TC-1 buněk, po 7 dnech, kdy došlo k nárůstu nádorů, jsme myši očkovali rekombinantními viry 1×10^6 PFU. Měřili jsme pouze nádory v rozmezí $0,4 \text{ cm}^2$ a $1,5 \text{ cm}^2$. Nádory pod $0,4 \text{ cm}^2$ jsme považovali za negativní, pokud měla myš nádor větší než $1,5 \text{ cm}^2$ byla utracena.

Při terapii nádorů působila nejlépe dvojitá rekombinanta P13-SigE7LAMP-H5-sTβRII, kdy v době 33 dní po očkování došlo k odhojení nádorů u 5 myší ze 6, zatímco

u kontrolní vakcinace jednoduchou rekombinantou P13-SigE7LAMP-TK⁻ došlo k odhojení nádorů u 2 myší ze 6. Tento výsledek bohužel nebyl potvrzen testem dvoucestná ANOVA jako statisticky signifikantní. Statistický rozdíl jsme ale potvrdili při porovnání dvojitě rekombinanty P13-SigE7LAMP-H5-sTβRII s dvojitými rekombinantami P13-SigE7LAMP-E/L-sTβRII a P13-SigE7LAMP-H5-sTβRII-Fc-Jun a to jak v čase 22 dní tak i 33 dní po očkování. Očkování pouze s geny sTβRII nebo sTβRII-Fc-Jun nemělo na regresi ani růst nádorů žádný vliv, což potvrzuje předpoklad, že rozpustný receptor sTβRII-Fc-Jun usnadňuje účinek protinádorových vakcín a nemá vliv na růst nádorů. Využití sTβRII-Fc má řadu úspěchů při léčbě nádorů v pokročilých stádiích karcinogeneze (MURAOKA et al. 2002, KONTANI et al. 2006). Při našich pokusech jsme potvrdili, že rozpustný receptor sTβRII zvyšuje účinky protinádorové vakcíny nesoucí gen pro vysoce imunogenní formu E7 proteinu SigE7LAMP. Překvapivým zjištěním bylo, že sTβRII podporuje vliv protinádorové vakcíny lépe nežli sTβRII-Fc-Jun, kdy by mělo docházet ke tvorbě homodimeru (lepší vazba TGFβ) a větší sekreci receptoru ven z buněk.

Je známo, že E/L je silnější promotor než H5 a i my jsme při pokusech *in vitro* potvrdili silnější expresi rozpustného receptoru pod kontrolou E/L promotoru. Při pokusech *in vivo*, kdy byl sTβRII exprimován pod kontrolou H5 promotoru, měla dvojitá rekombinanta na regresi nádorů lepší účinky než u sTβRII pod kontrolou E/L promotoru. Tento rozdíl byl statisticky prokázán pomocí testu dvoucestná ANOVA. Pro vysvětlení otázky, proč dochází k účinnější regresi nádorů u dvojitých rekombinant, kde se exprimuje sTβRII pod kontrolou H5 promotoru, se můžeme podívat na množení viru *in vivo*. Tento pokus, kdy se pozorovalo množení virů v myších ovariiích, byl již dříve proveden v naší laboratoři. Obě dvojitě rekombinanty P13-SigE7LAMP-H5-sTβRII i P13-SigE7LAMP-E/L-sTβRII se množily lépe než jednoduchá rekombinanta P13-SigE7LAMP-TK⁻, ale nepozorovali jsme, že by docházelo k lepšímu množení P13-SigE7LAMP-H5-sTβRII v porovnání s P13-SigE7LAMP-E/L-sTβRII. Samozřejmě nás zajímala i T buněčná imunitní odpověď specifická pro E7 antigen. Je známo, že nejvýznamnější složkou protinádorové imunity jsou CD8⁺ cytotoxické T lymfocyty. Imunizace P13-SigE7LAMP-H5-sTβRII vyvolávala silnější buněčnou imunitní odpověď specifickou pro E7 antigen než imunizace P13-SigE7LAMP-E/L-sTβRII. Tento rozdíl ale nebyl statisticky potvrzen. Do budoucna by bylo dobré zopakovat *in vivo* pokusy a také určit množení virů P13-SigE7LAMP-H5-sTβRII-Fc-Jun a P13-SigE7LAMP-E/L-sTβRII-Fc-Jun.

5.5. Imunoprecipitace sTβRII-Fc-Jun

Cílem tohoto pokusu bylo zjistit, zda sTβRII-Fc-Jun skutečně váže TGFβ. Tento pokus provedla Mgr. Kamila Žůrková, tudíž výsledky uvádím pouze v diskuzi.

Buňky BSC-40 byly infikovány virem P13 a rekombinantním virem P13-E/L-sTβRII-Fc-Jun (MOI 0.1). Druhý den byla odebrána virová média. Odebraná média se centrifugovala (2000g, 4°C, 20 minut) a byl odebrán supernatant. U viru P13-E/L-sTβRII-Fc-Jun byl do média uvolňován receptor sTβRII-Fc-Jun. 100 μl virových médií bylo inkubováno 1 hodinu s 5 ng a 50 ng TGFβ při 4°C (každých 10 minut se vzorky protřepávaly). Poté bylo přidáno 10 μl agarózy s navázaným proteinem G, vzorky byly inkubovány 1 hodinu na ledu za neustálého kývání. Vzorky byly 3x promyty PBS, ke vzorkům bylo přidáno 20 μl RIPA pufru a 10 μl Laemmli pufru a vzorky byly 5 minut povařeny. Vzorky byly charakterizovány pomocí SDS-PAGE a imunoblotu za použití protilátek proti TGFβ- Biotin α human TGFβ (BD Bioscience Pharmingen) a sekundární protilátky Avidin- HRP (BD Bioscience Pharmingen). Pouze u vzorků obsahujících sTβRII-Fc-Jun bylo možné detekovat TGFβ. Z výsledků tohoto pokusu je patrné, že solubilní receptor sTβRII-Fc-Jun má schopnost vázat TGFβ.

5.6. Příprava sTβRII-Fc- Optimalizace PCR

Jedním z původních cílů mé práce bylo sestrojít a charakterizovat rekombinantní viry vakcinie nesoucí gen pro sTβRII-Fc-Jun nebo gen pro sTβRII-Fc. Bohužel při konstrukci klonovacích plazmidů pro gen sTβRII-Fc se mi nepodařilo optimalizovat podmínky PCR.

K dispozici jsme měli plazmid PCR4-TOPO-sTβRII, z kterého jsme chtěli gen pro sTβRII namnožit pomocí PCR za použití primeru 1 (5'- AAC GAA TTC GCC CTT AT-3') nesoucí restrikční místo pro enzym EcoRI a primeru 2 (5' – AGG TTA ACG CTA GCG GAT CCA GGA TTG CTG GTG TTA TAT -3') nesoucí restrikční místa pro enzymy BamHI, NheI, HpaI. Gen pro sTβRII s přidanými restrikčními místy jsme plánovali vložit do plazmidu PCR4-TOPO za vzniku PCR4-TOPO-sTβRII. Z plazmidu pFUSE-mlgG1-Fc1 jsme plánovali vyštěpit gen pro Fc1. Gen pro Fc1 jsme chtěli vložit do plazmidu PCR4-TOPO-sTβRII za gen pro sTβRII, čímž by vzniknul gen pro fúzní protein sTβRII-Fc, jenž lze překlonovat do rekombinantního plazmidu pSC59-H5.

Po PCR vznikal produkt odpovídající velikosti genu pro sTβRII. PCR produkt jsme vložili do plazmidu PCR4-TOPO a ověřili pomocí zpětného vyštěpení. Při násled-

né sekvenaci jsme ale zjistili, že v oblasti u konce genu sTβRII a v primeru 2 sekvence neodpovídá našim předpokladům. Pokoušeli jsme se tedy optimalizovat PCR. Primer 2, v jehož sekvenci vznikaly při PCR mutace, jsme se rozhodli rozdělit na dva kratší primery 5'- CGG ATC CAG GAT TGC TGG TGT TAT AT- 3' a 5'- AGG TTA ACG CTA GCG GAT CCA GGA TTG- 3'. Při optimalizaci PCR vznikal produkt odpovídající velikosti, ale při ověření zpětným vyštěpením genu pro sTβRII po ligaci do plazmidu se nám nepotvrdila správnost štěpících míst, které gen získal díky PCR. PCR se nám bohužel nepodařilo optimalizovat.

Tuto část jsme se rozhodla do své diplomové práce neuvádět a zaměřila jsem se pouze na konstrukt sTβRII-Fc-Jun.

6. Souhrn

- Gen pro rozpustný receptor sTβRII-Fc-Jun jsme překlonovali do rekombinantního plazmidu pSC59. Vytvořili jsme rekombinantní viry vakcinie (kmen P13) exprimující sTβRII-Fc-Jun pod kontrolou H5 nebo E/L promotoru.
- Pomocí imunoblotu jsme ověřili vazbu sTβRII-Fc-Jun na protein G.
- Pozorovali jsme, že sTβRII-Fc-Jun se ve velkém množství uvolňuje do média infikovaných buněk (HeLa, CV-1). Exprese sTβRII-Fc-Jun byla větší pod kontrolou E/L promotoru v porovnání s H5 promotorem. V lyzátech infikovaných buněk jsme pozorovali větší množství sTβRII proteinu než sTβRII-Fc-Jun proteinu.
- Dvojité rekombinanty nesoucí gen pro sTβRII-Fc-Jun (P13-SigE7LAMP-H5-sTβRII-Fc-Jun a P13-SigE7LAMP-E/L-sTβRII-Fc-Jun) indukovaly T buněčnou imunitní odpověď specifickou proti E7 antigenu a proti VACV antigenu.
- Při pokusech pro terapii nádorů *in vivo* jsme nepozorovali vliv koexprese sTβRII-Fc-Jun na účinnost virové vakcíny P13-SigE7LAMP-TK⁻.

Ve své diplomové práci jsem splnila vytyčené cíle, připravila jsem rekombinantní viry vakcinie nesoucí gen pro sTβRII-Fc-Jun. Charakterizovala jsem vznikající sTβRII-Fc-Jun protein. Rekombinantní viry jsem zkoumala při imunizačních pokusech a *in vivo* testech.

7. Seznam použité literatury

1. Andersen, J.T., Sandlie, I. (2009): The versatile MHC class I-related FcRn protects IgG and albumin from degradation: implications for development of new diagnostics and therapeutics. *Drug Metab Pharmacokinet* 24:318-32.
2. Annes, J.P., Munger, J.S., Rifkin, D.B. (2003): Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Scio* 116:217-24.
3. Arteaga, C.L. (2006): Inhibition of TGFbeta signaling in cancer therapy. *Curr Opin Genet Dev.* 16:30-7.
4. Arteaga, C.L., Hurd, S.D., Winnier, A.R., Johnson, M.D., Fendly, B.M., Forbes, J.T. (1993): Anti-transforming growth factor (TGF)-beta antibodies inhibit breast cancer cell tumorigenicity and increase mouse spleen natural killer cell activity. Implications for a possible role of tumor cell/host TGF-beta interactions in human breast cancer progression. *J Clin Invest.* 92:2569-76.
5. Baldwin, P.J., van der Burg, S.H., Boswell, C.M., Offringa, R., Hickling, J.K., Dobson, J., Roberts, J.S., Latimer, J.A., Moseley, R.P., Coleman, N., Stanley, M.A., Sterling, J.C. (2003): Vaccinia-expressed human papillomavirus 16 and 18 e6 and e7 as a therapeutic vaccination for vulval and vaginal intraepithelial neoplasia. *Clin Cancer Res* 9:5205-13.
6. Bandyopadhyay, A., Zhu, Y., Cibull, M.L., Bao, L., Chen, C., Sun, L.(1999): A soluble transforming growth factor beta type III receptor suppresses tumorigenicity and metastasis of human breast cancer MDA-MB-231 cells. *Cancer Res.* 59:5041-6.
7. le Boeuf, F., Bell, J.C. (2010): United virus: The oncolytic tag-team against cancer! *Cytokine Growth Factor Rev.* Epub ahead of print.

8. Bouchard, C., Fridman, W.H., Sautes, C. (1994): Mechanism of inhibition of lipopolysaccharide-stimulated mouse B-cell responses by transforming growth factor-beta 1. *Immunol Lett.* 40:105-10.
9. Buller, R.M., Chakrabarti, S., Cooper, J.A., Twardzik, D.R., Moss, B. (1988): Deletion of the vaccinia virus growth factor gene reduces virus virulence. *J Virol* 62:866-74.
10. Buller, R.M., Smith, G.L., Cremer, K., Notkins, A.L., Moss, B. (1985): Decreased virulence of recombinant vaccinia virus expression vectors is associated with a thymidine kinase-negative phenotype. *Nature* 317:813-5.
11. Capon, D.J., Chamow, S.M., Mordenti, J., Marsters, S.A., Gregory, T., Mitsuya, H., Byrn, R.A., Lucas, C., Wurm, F.M., Groopman, J.E., et al. (1989): Designing CD4 immunoadhesins for AIDS therapy. *Nature* 337:525-31.
12. Chlanda, P. (2006): The Recombinant Vaccinia Virus Expressing the Soluble Receptor type II for Tumour Growth factor β . Master Thesis, Faculty of Science at the Charles University in Prague.
13. Christen, L.M., Sanders, M., Willer, C., Niles, E.G. (1998): Vaccinia virus nucleoside triphosphate phosphohydrolase I is an essential viral early gene transcription termination factor. *Virology* 245:360-71.
14. Chung, C.S., Hsiao, J.C., Chang, Y.S., Chang, W. (1998): A27L protein mediates vaccinia virus interaction with cell surface heparan sulfate. *J Virol* 72:1577-85.
15. Cui, W., Fowles, D.J., Bryson, S., Duffie, E., Ireland, H., Balmain, A., Akhurst, R.J. (1996): TGFbeta1 inhibits the formation of benign skin tumors, but enhances progression to invasive spindle carcinomas in transgenic mice. *Cell* 86:531-42.
16. Curiel, T.J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J.R., Zhang, L., Burow, M., Zhu, Y., Weis, S., Krczyk, I., Daniel, B., Gordon, A., Myers, L., Lackner, A., Disis, M.L., Knutson,

- K.L., Chen, L., Zou, W. (2004): Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.* 10:942-9.
17. Dall'Acqua, W.F., Kiener, P.A., Wu, H. (2006): Properties of human IgG1s engineered for enhanced binding to the neonatal Fc receptor (FcRn). *J Biol Chem* 281: 23514-24.
 18. Davidson, E.J., Boswell, C.M., Sehr, P., Pawlita, M., Tomlinson, A.E., McVey, R.J., Dobson, J., Roberts, J.S., Hickling, J., Kitchener, H.C., Stern, P.L. (2003): Immunological and clinical responses in women with vulval intraepithelial neoplasia vaccinated with a vaccinia virus encoding human papillomavirus 16/18 oncoproteins. *Cancer Res* 63:6032-41.
 19. Derynck, R., Akhurst R.J., Balmain, A. (2001): TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet.* 29:117-29.
 20. Diebold, R.J., Eis, M.J., Yin, M., Ormsby, I., Boivin, G.P., Darrow, B.J., Saffitz, J.E., Doetschman, T. (1995): Early-onset multifocal inflammation in the transforming growth factor beta 1-null mouse is lymphocyte mediated. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92:12215-9.
 21. Doceul, V., Hollinshead, M., van der Linden, L., Smith, G.L. (2010): Repulsion of superinfecting virions: a mechanism for rapid virus spread. *Science* 327:873-6.
 22. Dong, Y., Tang, L., Letterio, J.J., Benveniste, E.N. (2001): The Smad3 protein is involved in TGF-beta inhibition of class II transactivator and class II MHC expression. *J Immunol.* 167:311-9.
 23. Dorigo, O., Shawler, D.L., Royston, I., Sobol, R.E., Berek, J.S., Fakhrai, H. (1998): Combination of transforming growth factor beta antisense and interleukin-2 gene therapy in the murine ovarian teratoma model. *Gynecol Oncol.* 71:204-10.
 24. Eckert, D., Williams, O., Meseda, C.A., Merchlinsky, M. (2005): Vaccinia virus nicking-joining enzyme is encoded by K4L (VACWR035). *J Virol* 79:15084-90.

25. van Eijl, H., Hollinshead, M., Rodger, G., Zhang, W.H., Smith, G.L. (2002): The vaccinia virus F12L protein is associated with intracellular enveloped virus particles and is required for their egress to the cell surface. *J Gen Virol* 83:195-207.
26. Elbendary, A., Berchuck, A., Davis, P., Havrilesky, L., Bast, R.C. Jr., Iglehart, J.D., Marks, J.R. (1994): Transforming growth factor beta 1 can induce CIP1/WAF1 expression independent of the p53 pathway in ovarian cancer cells. *Cell Growth Differ.* 5:1301-7.
27. Eppert, K., Scherer, S.W., Ozcelik, H., Pirone, R., Hoodless, P., Kim, H., Tsui, L.C., Bapat, B., Gallinger, S., Andrulis, I.L., Thomsen, G.H., Wrana, J.L., Attisano, L. (1996): MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGFbeta-regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma. *Cell* 86:543-52.
28. Eppstein, D.A., Marsh, Y.V., Schreiber, A.B., Newman, S.R., Todaro, G.J., Nestor, J.J.Jr. (1985,1986): Epidermal growth factor receptor occupancy inhibits vaccinia virus infection. *Nature* 318:663-5.
29. Feltkamp, M.C., Smits, H.L., Vierboom, M.P., Minnaar, R.P., de Jongh, B.M., Drijfhout, J.W., ter Schegget, J., Melief, C.J., Kast, W.M. (1993): Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. *Eur J Immunol* 23:2242-9.
30. Frick, I.M., Wikström, M., Forsén, S., Drakenberg, T., Gomi, H., Sjöbring, U., Björck, L. (1992): Convergent evolution among immunoglobulin G-binding bacterial proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:8532-6.
31. Gammon, D.B., Evans, D.H. (2009): The 3'-to-5' exonuclease activity of vaccinia virus DNA polymerase is essential and plays a role in promoting virus genetic recombination. *J Virol* 83:4236-50.

32. Garrigue-Antar, L., Munoz-Antonia, T., Antonia, S.J., Gesmonde, J., Vellucci, V.F., Reiss, M. (1995): Missense mutations of the transforming growth factor beta type II receptor in human head and neck squamous carcinoma cells. *Cancer Res.* 55:3982-7.
33. Gatto, B. (2006): Biologics targeted at TNF: design, production and challenges. *Reumatismo* 58:94-103.
34. Ghetie, V., Ward, E.S. (2000): Multiple roles for the major histocompatibility complex class I- related receptor FcRn. *Annu Rev Immunol.* 18:739-66.
35. Ghiringhelli, F., Puig, P.E., Roux, S., Parcellier, A., Schmitt, E., Solary, E., Kroemer, G., Martin, F., Chauffert, B., Zitvogel, L. (2005): Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med* 202:919-29.
36. Ghose, S., Allen, M., Hubbard, B., Brooks, C., Cramer, S.M. (2005): Antibody variable region interactions with Protein A: implications for the development of generic purification processes. *Biotechnol Bioeng.* 92:665-73.
37. Go, C., Li, P., Wang, X.J. (1999): Blocking transforming growth factor beta signaling in transgenic epidermis accelerates chemical carcinogenesis: a mechanism associated with increased angiogenesis. *Cancer Res.* 59:2861-8.
38. Gotzmann, J., Mikula, M., Eger, A., Schulte-Hermann, R., Foisner, R., Beug, H., Mikulits, W. (2004): Molecular aspects of epithelial cell plasticity: implications for local tumor invasion and metastasis. *Mutat Res.* 566:9-20.
39. Henderson D.A., Moss B. (1999): Smallpox and Vaccinia, V: Plotkin S.A., Orenstein W.A. (eds.): *Vaccines.* W.B. Saunders Company, Philadelphia, Chapter 6.
40. Herrero-Martínez, E., Roberts, K.L., Hollinshead, M., Smith, G.L. (2005): Vaccinia virus intracellular enveloped virions move to the cell periphery on microtubules in the absence of the A36R protein. *J Gen Virol* 86: 2961-8.

41. Heuser, J. (2005): Deep-etch EM reveals that the early poxvirus envelope is a single membrane bilayer stabilized by a geodetic "honeycomb" surface coat. *J Cell Biol* 169:269-83.
42. Hsiao, J.C., Chung, C.S., Chang, W. (1999): Vaccinia virus envelope D8L protein binds to cell surface chondroitin sulfate and mediates the adsorption of intracellular mature virions to cells. *J Virol* 73:8750-61.
43. Huang, C. (2009): Receptor-Fc fusion therapeutics, traps, and MIMETIBODY technology. *Curr Opin Biotechnol* 20:692-9.
44. Hyytiainen, M., Taipale, J., Heldin, CH., Keski-Oja, J. (1998): Recombinant latent transforming growth factor beta-binding protein 2 assembles to fibroblast extracellular matrix and is susceptible to proteolytic processing and release. *J Biol Chem* 273:20669-76.
45. Isaka, Y., Akagi, Y., Ando, Y., Tsujie, M., Sudo, T., Ohno, N., Border, W.A., Noble, N.A., Kaneda, Y., Hori, M., Imai, E. (1999): Gene therapy by transforming growth factor-beta receptor-IgG Fc chimera suppressed extracellular matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 55:465-75.
46. Ishii, K., Moss, B. (2002): Mapping interaction sites of the A20R protein component of the vaccinia virus DNA replication complex. *Virology* 303:232-9.
47. Iyer, S., Wang, Z.G., Akhtari, M., Zhao, W., Seth, P. (2005): Targeting TGFbeta signaling for cancer therapy. *Cancer Biol Ther.* 4:261-6.
48. Jazayeri, J.A., Carroll, G.J. (2008): Fc-Based Cytokines Prospects for Engineering Superior Therapeutics. *Drug Development* 22:11-26.
49. Ji, H., Wang, T.L., Chen, CH., Pai, S.I., Hung, C.F., Lin, K.Y., Kurman, R.J., Pardoll, D.M., Wu, T.C. (1999): Targeting human papillomavirus type 16 E7 to the endosomal/lysosomal compartment enhances the antitumor immunity of DNA

vaccines against murine human papillomavirus type 16 E7-expressing tumors. *Hum Gene Ther.* 10:2727-40.

50. de Jonge, R.R., Garrigue-Antar, L., Vellucci, V.F., Reiss, M. (1997): Frequent inactivation of the transforming growth factor beta type II receptor in small-cell lung carcinoma cells. *Oncol Res.* 9:89-98.
51. Kehrl, J.H., Thevenin, C., Rieckmann, P., Fauci, A.S. (1991): Transforming growth factor-beta suppresses human B lymphocyte Ig production by inhibiting synthesis and the switch from the membrane form to the secreted form of Ig mRNA. *J Immunol.* 146:4016-23.
52. Komesli, S., Vivien, D., Dutartre, P. (1998): Chimeric extracellular domain type II transforming growth factor (TGF)-beta receptor fused to the Fc region of human immunoglobulin as a TGF-beta antagonist. *Eur J Biochem* 254:505-13.
53. Kontani, K., Kajino, K., Huang, C.L., Fujino, S., Taguchi, O., Yamauchi, A., Yokomise, H., Ogasawara, K. (2006): Spontaneous elicitation of potent antitumor immunity and eradication of established tumors by administration of DNA encoding soluble transforming growth factor-beta II receptor without active antigen-sensitization. *Cancer Immunol Immunother* 55:579-87.
54. Kryczek, I., Wei, S., Szeliga, W., Vatan, L., Zou, W. (2009): Endogenous IL-17 contributes to reduced tumor growth and metastasis. *Blood* 114:357-9.
55. Ku, J.L., Park, S.H., Yoon, K.A., Shin, Y.K., Kim, K.H., Choi, J.S., Kang, H.C., Kim, I.J., Han, I.O., Park, J.G. (2007): Genetic alterations of the TGF-beta signaling pathway in colorectal cancer cell lines: a novel mutation in Smad3 associated with the inactivation of TGF-beta-induced transcriptional activation. *Cancer Lett* 247:283-92.
56. Kutinová, L., Ludvíková, V., Simonová, V., Otavová, M., Kryštofová, J., Hainz, P., Press, M., Kunke, D., Vonka, V. (1995): Search for optimal parent for recom-

binant vaccinia virus vaccines. Study of three vaccinia virus vaccinal strains and several virus lines derived from them. *Vaccine* 13:487-493.

57. Kwiatkowska, E.P., Kazimierczak, U., Mackiewicz, A., Kowalczyk, D.W. (2006): Expression of soluble recombinant TGF-beta type II receptor fused with the Fc portion of human IgG1 (sTbetaRII-Fc) in NS0 cells. *Acta Biochim Pol* 53:361-9.
58. de Larco, J.E., Todaro, G.J. (1978): Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 75:4001-5.
59. Lebrin, F., Goumans, M.J., Jonker, L., Carvalho, R.L., Valdimarsdottir, G., Thorikay, M., Mummery, C., Arthur, H.M., ten Dijke, P. (2004): Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. *Embo J* 23:4018-28.
60. Levy, L., Hill, C.S. (2006): Alterations in components of the TGF-beta superfamily signaling pathways in human cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 17:41-58.
61. Li, J.M., Nichols, M.A., Chandrasekharan, S., Xiong, Y., Wang, X.F. (1995): Transforming growth factor beta activates the promoter of cyclin-dependent kinase inhibitor p15INK4B through an Sp1 consensus site. *J Biol Chem*. 270:26750-3.
62. Lin, H.Y., Moustakas, A., Knaus, P., Wells, R.G., Henis, Y.I., Lodish, H.F. (1995): The soluble extracellular domain of the type II transforming growth factor (TGF)-beta receptor. A heterogeneously glycosylated protein with high affinity and selectivity for TGF-beta ligands. *J Biol Chem* 270:2747-54.
63. Lin, K.Y., Guarnieri, F.G., Staveley-O'Carroll, K.F., Levitsky, H.I., August, J.T., Pardoll, D.M., Wu, T.C. (1996): Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Cancer Res* 56:21-6.
64. Looyenga, B.D., Wiater, E., Vale, W., Hammer, G.D. (2010): Inhibin-A antagonizes TGFbeta2 signaling by down-regulating cell surface expression of the TGFbeta coreceptor betaglycan. *Mol Endocrinol* 24: 608-20.

65. Lu, S.L., Zhang, W.C., Akiyama, Y., Nomizu, T., Yuasa, Y. (1996): Genomic structure of the transforming growth factor beta type II receptor gene and its mutations in hereditary nonpolyposis colorectal cancers. *Cancer Res.* 56:4595-8.
66. Macková, J., Stašíková, J., Kutinová, L., Mašín, J., Hainz, P., Šimsová, M., Gabriel, P., Šebo, P., Němečková, Š. (2006) Prime/boost immunotherapy of HPV16-induced tumors with E7 protein delivered by Bordetella adenylate cyclase and modified vaccinia virus Ankara. *Cancer Immunol Immunother* 55:39-46.
67. Maliekal, T.T., Antony, M.L., Nair, A., Paulmurugan, R., Karunakaran, D. (2003): Loss of expression, and mutations of Smad 2 and Smad 4 in human cervical cancer. *Oncogene.* 22:4889-97.
68. Martinez, J., Huang, X., Yang, Y. (2010): Direct TLR2 signaling is critical for NK cell activation and function in response to vaccinia viral infection. *PLoS Pathog.* 6:e1000811.
69. Massagué, J. (2008): TGFbeta in Cancer. *Cell* 134:215-30.
70. Mayr, A., Stickl, H., Muller, H.K., Danner, K., Singer, H. (1978): The smallpox vaccination strain MVA: marker, genetic structure, experience gained with the parenteral vaccination and behavior in organisms with a debilitated defence mechanism. *Zentralbl Bakteriol (B)* 167:375-90.
71. Miyaki, M., Iijima, T., Konishi, M., Sakai, K., Ishii, A., Yasuno, M., Hishima, T., Koike, M., Shitara, N., Iwama, T., Utsunomiya, J., Kuroki, T., Mori, T. (1999): Higher frequency of Smad4 gene mutation in human colorectal cancer with distant metastasis. *Oncogene.* 18:3098-103.
72. Morgan, G.W., Hollinshead, M., Ferguson, B.J., Murphy, B.J., Carpentier, D.C.J., Smith, G.L. (2010): Vaccinia Protein F12 Has Structural Similarity to Kinesin Light Chain and Contains a Motor Binding Motif Required for Virion Export. *PLoS Pathog* 6:e1000785.

73. Moss B. (2001): Poxviridae: The Viruses and Their Replication. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (eds.): Fields Virology, 4th edition, 2849-2883.
74. Moutel, S., El Marjou, A., Vielemeyer, O., Nizak, C., Benaroch, P., Dübel, S., Perez, F. (2009): A multi-Fc-species system for recombinant antibody production. *BMC Biotechnol* 9:14.
75. Muñoz-Antonia, T., Torrellas-Ruiz, M., Clavell, J., Mathews, L.A., Muro-Cacho, C.A., Báez, A. (2009): Aberrant methylation inactivates transforming growth factor Beta receptor I in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Otolaryngol* 2009:848695.
76. Muraoka, R.S., Dumont, N., Ritter, C.A., Dugger, T.C., Brantley, D.M., Chen, J., Easterly, E., Roebuck, L.R., Ryan, S., Gotwals, P.J., Koteliansky, V., Arteaga, C.L. (2002): Blockade of TGF-beta inhibits mammary tumor cell viability, migration, and metastases. *J Clin Invest* 109:1533-6.
77. Nagaraj, N.S., Datta, P.K. (2010): Targeting the transforming growth factor-beta signaling pathway in human cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 19:77-91.
78. Nakagawa, M., Viscidi, R., Deshmukh, I., Costa, M.D., Palefsky, J.M., Farhat, S., Moscicki, A.B. (2002): Time course of humoral and cell-mediated immune responses to human papillomavirus type 16 in infected women. *Clin Diagn Lab Immunol* 9:877-82.
79. Nam, J.S., Terabe, M., Kang, M.J., Chae, H., Voong, N., Yang, Y.A., Laurence, A., Michalowska, A., Mamura, M., Lonning, S., Berzofsky, J.A., Wakefield, L.M. (2008a): Transforming growth factor beta subverts the immune system into directly promoting tumor growth through interleukin-17. *Cancer Res* 68: 3915-23.
80. Nam, J.S., Terabe, M., Mamura, M., Kang, M.J., Chae, H., Stuelten, C., Kohn, E., Tang, B., Sabzevari, H., Anver, M.R., Lawrence, S., Danielpour, D., Lonning, S., Berzofsky, J.A., Wakefield, L.M. (2008b): An anti-transforming growth factor be-

ta antibody suppresses metastasis via cooperative effects on multiple cell compartments. *Cancer Res* 68:3835-43.

81. Němečková, Š., Stránská, R., Šubrtová, J., Kutinová, L., Otáhal, P., Hainz, P., Marešová, L., Šroller, V., Hamšíková, E., Vonka, V. (2002): Immune response to E7 protein of human papillomavirus type 16 anchored on the cell surface. *Cancer Immunol Immunother* 51:111-9.
82. Oda, K.I., Joklik, W.K. (1967): Hybridization and sedimentation studies on "early" and "late" vaccinia messenger RNA. *J Mol. Biol* 27:395-419.
83. Sanderson, C.M., Hollinshead, M., Smith, G.L. (2000): The vaccinia virus A27L protein is needed for the microtubule-dependent transport of intracellular mature virus particles. *J Gen Virol* 81:47-58.
84. Rietdorf, J., Ploubidou, A., Reckmann, I., Holmström, A., Frischknecht, F., Zettl, M., Zimmermann, T., Way, M. (2001): Kinesin-dependent movement on microtubules precedes actin-based motility of vaccinia virus. *Nat Cell Biol* 3:992-1000.
85. Rittich, S., Dušková, M., Macková, J., Pokorná, D., Jinoch, P., Šmahel, M. (2005): Combined immunization with DNA and transduced tumor cells expressing mouse GM-CSF or IL-2. *Oncol Rep* 13:311-7.
86. Roberts, K.L., Smith, G.L. (2008): Vaccinia virus morphogenesis and dissemination. *Trends Microbiol* 16:472-9.
87. Sambrook, J., Russell, D.W. (2001): *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. 1. díl, 3. vydání, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
88. Sanderson, C.M., Way, M., Smith, G.L. (1998): Virus-induced cell motility. *J Virol* 72:1235-43.

89. Schutz, A., Oertli, D., Marti, W.R., Noppen, C., Padovan, E., Spagnoli, G.C., Heberer, M., Zajac, P. (2001): Immunogenicity of nonreplicating recombinant vaccinia expressing HLA-A201 targeted or complete MART-1/Melan-A antigen. *Cancer Gene Ther* 8:655-61.
90. Shields, R.L., Lai, J., Keck, R., O'Connell, L.Y., Hong, K., Meng, Y.G., Weikert, S.H., Presta, L.G. (2002): Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fc gamma RIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J Biol Chem* 277:26733-40.
91. Shields, R.L., Namenuk, A.K., Hong, K., Meng, Y.G., Rae, J., Briggs, J., Xie, D., Lai, J., Stadlen, A., Li, B., Fox, J.A., Presta, L.G. (2001): High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J Biol Chem* 276:6591-604.
92. Strobl, H., Knapp, W. (1999): TGF-beta1 regulation of dendritic cells. *Microbes Infect.* 1:1283-90.
93. Sun, L., Wu, G., Willson, J.K., Zborowska, E., Yang, J., Rajkarunanayake, I., Wang, J., Gentry, L.E., Wang, X.F., Brattain, M.G. (1994): Expression of transforming growth factor beta type II receptor leads to reduced malignancy in human breast cancer MCF-7 cells. *J Biol Chem.* 269:26449-55.
94. Taipale, J., Lohi, J., Saarinen, J., Kovanen, P., Keski-Oja, J. (1995): Human Mast Cell Chymase and Leukocyte Elastase Release Latent Transforming Growth Factor- β 1 from the Extracellular Matrix of Cultured Human Epithelial and Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* 270:4689-4696.
95. Tang, B., Vu, M., Booker, T., Santner, S.J., Miller, F.R., Anver, M.R., Wakefield, L.M. (2003): TGF-beta switches from tumor suppressor to prometastatic factor in a model of breast cancer progression. *J Clin Invest.* 112:1116-24.

96. Thomas, D.A., Massaqué J. (2005): TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell*. 8:369-80.
97. Thorne, S.H., Bartlett, D.L., Kirn, D.H. (2005): The use of oncolytic vaccinia viruses in the treatment of cancer: a new role for an old ally? *Curr. gene Ther.* 5:429-43.
98. Timiryasova, T.M., Chen, B., Fodor, I. (2001): Replication-deficient vaccinia virus gene therapy vector: evaluation of exogenous gene expression mediated by PUV-inactivated virus in glioma cells. *J Gene Med* 3:468-77.
99. Torre-Amione, G., Beauchamp, R.D., Koeppen, H., Park, B.H., Schreiber, H., Moses, H.L., Rowley, D.A. (1990): A highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth factor type beta 1 cDNA escapes immune surveillance. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87:1486-90.
100. Tsang, M.L., Zhou, L., Zheng, B.L., Wenker, J., Fransen, G., Humphrey, J., Smith, J.M., O'Connor-McCourt, M., Lucas, R., Weatherbee, J.A. (1994): Characterization of recombinant soluble human transforming growth factor-beta receptor type II (rhTGF-beta sRII). *Cytokine* 7:389-97.
101. Tschärke, D.C., Woo, W.P., Sakala, I.G., Sidney, J., Sette, A., Moss, D.J., Bennink, J.R., Karupiah, G., Yewdell, J.W. (2006): Poxvirus CD8+ T-cell determinants and cross-reactivity in BALB/c mice. *J Virol* 80:6318-23.
102. Tu, W.H., Thomas, T.Z., Masumori, N., Bhowmick, N.A., Gorska, A.E., Shyr, Y., Kasper, S., Case, T., Roberts, R.L., Shappell, S.B., Moses, H.L., Matusik, R.J. (2003): The loss of TGF-beta signaling promotes prostate cancer metastasis. *Neoplasia*. 5:267-77.
103. Uchida, K., Nagatake, M., Osada, H., Yatabe, Y., Kondo, M., Mitsudomi, T., Masuda, A., Takahashi, T., Takahashi T. (1996): Somatic *in vivo* alterations of the JV18-1 gene at 18q21 in human lung cancers. *Cancer Res*. 56:5583-5.
104. Wolf, A.M., Wolf, D., Steurer, M., Gastl, G., Gunsilius, E., Grubeck-Loebenstien, B. (2003): Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin Cancer Res*. 9:606-12.

105. Yang, L., Huang, J., Ren, X., Gorska, A.E., Chytil, A., Aakre, M., Carbone, D.P., Matriasian, L.M., Richmond, A., Lin, P.C., Moses, H.L. (2008): Abrogation of TGF beta signaling in mammary carcinomas recruits Gr-1+CD11b+ myeloid cells that promote metastasis. *Cancer Cell* 13:23-35.
106. Yang, Y.A., Dukhanina, O., Tang, B., Mamura, M., Letterio, J.J., MacGregor, J., Patel, S.C., Khozin, S., Liu, Z.Y., Green, J., Anver, M.R., Merlino, G., Wakefield, L.M. (2002): Lifetime exposure to a soluble TGF-beta antagonist protects mice against metastasis without adverse side effects. *J Clin Invest.* 109:1607-15.
107. Yingling, J.M., Blanchard, K.L., Sawyer, J.S. (2004): Development of TGF-beta signaling inhibitors for cancer therapy. *Nat rev Drug Discov.* 3:1011-22.
108. Young, L.S., Searle, P.F., Onion, D., Mautner, V. (2006): Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application. *J Pathol* 208:299-318.
109. Zhang, B., Halder, S.K., Kashikar, N.D., Cho, Y.J., Datta, A., Gorden, D.L., Datta, P.K. (2010): Antimetastatic role of Smad4 signaling in colorectal cancer. *Gastroenterology* 138:969-80.
110. Zhang, W.H., Wilcock, D., Smith, G.L. (2000): Vaccinia Virus F12L Protein Is Required for Actin Tail Formation, Normal Plaque Size, and Virulence. *J Virol.* 74:11654-11662.
111. Žůrková, K., Babiarová, K., Hainz, P., Kryštofová, J., Kutinová, L., Otahal, P., Němečková, Š. (2009): The expression of the soluble isoform of hFlt3 ligand by recombinant vaccinia virus enhances immunogenicity of the vector. *Oncol Rep* 21:1335-43.