

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

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Martina Kojzarová

**Příprava chimerických VLPs myšního polyomaviru nesoucích epitopy
maligního melanomu**

**Construction of mouse polyomavirus chimeric VLPs bearing
melanoma epitopes**

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitelka: RNDr. Alena Morávková Ph.D.

Praha 2011

Prohlášení:

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

V Praze, 17. 8. 2011

Martina Kojzarová

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce **RNDr. Aleně Morávkové, Ph.D.** nejen za čas, neocenitelnou pomoc, rady a připomínky, které mi věnovala během přípravy této diplomové práce, ale v první řadě za to, že ve mně kdysi probudila zájem o virologii.

Dále bych chtěla moc poděkovat moudré a laskavé vedoucí naší laboratoře, **doc. RNDr. Jitce Forstové, CSc.**, které vděčím za možnost pracovat na tomto projektu a v tak úžasném kolektivu.

Také děkuji všem **členům naší laboratoře** za ochotnou pomoc při pronikání do tajů veškerých metod, za poskytnutí nekonečné řady rad, za trpělivost, kterou se mnou po celou dobu měli a za vytvoření skvělého pracovního prostředí, do kterého jsem se s radostí vracela.

Děkuji **Mgr. Martinu Fraiberkovi** za zhotovení elektronmikroskopických snímků, **Mgr. Vojtěchu Žilovi** za pomoc s konfokálním mikroskopem a **Mgr. Veronice Hruškové, Ph.D.** za zasvěcení do přípravy a izolace VLPs.

Děkuji i našim skvělým a vždy dobře naladěným laborantkám **Vlastě Sakařové** a **Ivaně Polívkové** za práci, kterou pro nás všechny dělají s úsměvem na tváři a také **Daně Beranové**, která ve svých rukou pevně třímá náš rozpočet.

Děkuji svým milovaným **rodičům** za bezvýhradnou lásku a podporu, která mi dávala sílu, když jí bylo zapotřebí a nenechala mě klesnout na dno ani v obdobích nejtěžších.

Děkuji všem svým **přátelům** za pochopení, trpělivost a za oporu ve chvílích, kdy jsem se cítila v koncích.

Předkládaná diplomová práce vznikla v letech 2009 – 2011 za podpory Centra pro výzkum nových antivirotik a cytostatik 1M0508 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky, Výzkumného záměru MSM00216208958 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky a grantu GAČR P304/10/1511.

ABSTRAKT:

Hlavní kapsidový protein virů z čeledi *Polyomaviridae* je schopen samovolně se uspořádat do viru podobné částice (virus-like particle, VLP), a to i bez přítomnosti minoritních proteinů, nespecificky vázat cizorodou DNA a rozpoznat receptor na povrchu buňky. Tyto vlastnosti ho předurčují k použití coby vektoru v genové terapii nebo imunoterapii. Už dříve bylo zjištěno, že VLPs myšího polyomaviru výrazně stimulují imunitní systém a mají silný adjuvantní účinek. Chimerické VLPs odvozené od myšího polyomaviru nesoucí cizorodý antigen či epitop by podle našich předpokladů po imunizaci měly vyvolat přesně cílenou odpověď imunitního systému. Hlavní překážkou je volba imunogenu dostatečně silného k vyvolání adekvátní imunitní odpovědi. Cílem této práce bylo za pomoci metod genového inženýrství zkonstruovat chimerické částice nesoucí na svém povrchu epitop maligního melanomu, který je znám jako jeden z nejimunogennějších nádorů. Pro účely budoucího výzkumu imunogenních účinků těchto částic byly zkonstruovány tři typy VLPs. Jednalo se o částice nesoucí epitopy lidského melanomu, další obsahující epitop melanomu myšího a kontrolní částice s ovalbuminovým epitopem. K účelům produkce chimerických proteinů byl použit bakulovirový expresní systém. Elektronovou mikroskopií bylo ověřeno, že vnesením nádorového epitopu do jedné z povrchových smyček proteinu VP1, konkrétně DE smyčky, nebyla nijak narušena schopnost samouspořádat se do VLPs, ani stabilita vznikajících částic. Zároveň si všechny typy vytvořených chimerických částic zachovaly schopnost účinně vstupovat do savčích buněk. Schopnost těchto částic vyvolat protinádorovou imunitní odpověď bude dále zkoumána s využitím zvířecích modelů.

KLÍČOVÁ SLOVA: myší polyomavirus, VP1, VLP, imunoterapie, maligní melanom

ABSTRACT:

Major capsid protein of *Polyomaviridae* family viruses is able to self-assemble into virus-like particle (VLP) even without the presence of minor proteins, bind exogenous DNA non-specifically and recognise the receptor on the cellular surface. These characteristics determine its use as vector in gene therapy or immunotherapy. It was discovered before that MPyV VLPs significantly stimulate immune system and have strong adjuvant effect. Chimeric VLP derived from mouse polyomavirus carrying exogenous antigen or epitope is supposed to elicit specifically targeted immune response after immunisation. The main obstacle is choice of immunogen that is strong enough to cause adequate immune response. The goal of this thesis was to construct chimeric particles carrying epitope of malignant melanoma, one of the most immunogenic tumours, on their surface, using methods of genetic engineering. For future research of particle's immunogenic properties three types of particles were developed – particles with human and mouse melanoma epitopes, respectively and control particles with ovalbumine epitope. For the purpose of production of chimeric protein was used baculovirus expression system. It was verified then, with the use of electron microscopy, that introduction of tumour antigen into one of surface loops of VP1 protein, namely DE loop, didn't disrupt the ability of self-assembly into VLPs nor the stability of newly formed particles. All three types of particles were able to enter mammalian cells efficiently. Ability of these particles to elicit antitumour immune response will be further researched with use of animal models.

KEY WORDS: mouse polyomavirus, VP1, VLP, immunotherapy, malignant melanoma

OBSAH:

1. ÚVOD.....	20
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	22
2.1. MALIGNÍ MELANOM.....	23
2.1.1. Úvod a historie.....	23
2.1.2. Etiologie a patogeneze.....	23
2.1.2.1.Vnější rizikové faktory.....	24
2.1.2.2.Vnitřní faktory.....	25
2.1.2.3.Metastazující melanom.....	29
2.1.3. Epidemiologie.....	29
2.1.4. Klinické varianty maligního melanomu.....	33
2.1.4.1.Oční formy maligního melanomu.....	33
2.1.4.2.Sliziční formy maligního melanomu.....	33
2.1.4.3.Kožní formy maligního melanomu.....	33
2.1.4.3.1. Melanoma <i>in situ</i>	34
2.1.4.3.2. Superficiálně se šířící melanom a sekundárně modulární melanom (SSM a SN SSM).....	34
2.1.4.3.3. Nodulární melanom (NMM).....	35
2.1.4.3.4. Lentigo maligna a lentigo maligna melanom (LMM)...	35
2.1.4.3.5. Akrolentiginózní melanom (ALM).....	35
2.1.4.3.6. Desmoplastický melanom.....	36
2.1.5. Diagnostika.....	36
2.1.5.1.Klinická diagnóza.....	36
2.1.5.2.Dermatoskopie.....	37
2.1.5.3.Histologie.....	37
2.1.5.3.1. Tloušťka nádoru v mm podle Breslowa.....	38
2.1.5.3.2. Ulcerace.....	38
2.1.5.3.3. Hloubka invaze podle Clarka.....	38
2.1.5.3.4. Fáze nádorového růstu.....	39
• Radiální fáze růstu.....	39
• Vertikální fáze růstu.....	39
2.1.5.3.5. Přítomnost lymfocytárního infiltrátu.....	40
2.1.5.3.6. Mitózy.....	41

2.1.5.3.7. Spontánní regrese.....	41
2.1.5.3.8. S melanomem-asociovaná depigmentace.....	43
2.1.5.4.Imunohistochemie.....	43
2.1.5.4.1. Protein S-100.....	46
2.1.5.4.2. gp100/HMB45.....	46
2.1.5.4.3. MART-1/Melan-A.....	46
2.1.5.4.4. Tyrozináza.....	47
2.1.5.4.5. Ki-67.....	47
2.1.5.5.Sérologie.....	48
2.1.6. Terapie.....	49
2.1.6.1.Chirurgická terapie maligního melanomu.....	49
2.1.6.2.Chemoterapie a biochemoterapie.....	50
2.1.6.3.Imunoterapie.....	50
2.1.6.3.1. Interferon α (IFN α).....	52
2.1.6.3.2. Interleukin-2 (IL-2).....	53
2.1.6.3.3. Faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (GM-SCF).....	53
2.1.6.3.4. Imunoregulační protilátky.....	54
• Anti-CTLA-4.....	54
• Anti-Programmed-1.....	55
• Anti-CD137.....	55
• Anti-CD40.....	55
2.1.6.3.5. Agonisté Toll-like receptorů (TLR).....	55
2.1.6.3.6. Nádorové vakcíny.....	56
• Celobuněčné vakcíny.....	57
• Peptidové/proteinové vakcíny.....	58
• Gangliosidové vakcíny.....	59
• Vakcíny založené na buňkách prezentujících antigen/dendritických buňkách.....	59
• Rekombinantní virové vektory a DNA a RNA vakcíny.....	60
2.1.6.3.7. Adoptivní buněčná terapie (ACT).....	61
• TIL terapie.....	61

• Terapie pomocí geneticky manipulovaných T-buněk.....	61
• CTL terapie.....	62
2.1.6.4. Inhibitory angiogeneze.....	62
2.1.6.5. Inhibitory proteinkináz.....	63
2.1.6.6. Genová terapie.....	63
2.2. POLYOMAVIRY	64
2.2.1. Klasifikace.....	64
2.2.2. Struktura virionu a organizace genomu.....	65
2.3. UMĚLÉ VIROVÉ ČÁSTICE (VLPs).....	70
2.3.1. Obecné vlastnosti a produkce viru podobných částic.....	70
2.3.2. VLPs odvozené od polyomavirů.....	71
2.3.3. Využití částic odvozených od polyomavirů (především od MPyV).....	72
2.3.3.1. Přenos DNA do buněk pomocí VLPs.....	72
2.3.3.2. Vyvolání imunitní odpovědi proti různým antigenům pomocí VLPs.....	74
2.3.3.2.1. Imunitní odpovědi proti přirozeným polyomavirovým antigenům.....	80
2.3.3.2.2. Imunitní odpovědi proti cizorodým antigenům vyvolané chimerickými částicemi.....	82
3. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	86
4. MATERIÁL A METODY.....	88
4.1. MATERIÁL.....	89
4.1.1. Použité přístroje.....	89
4.1.2. Chemikálie.....	91
4.1.3. Použité plazmidy.....	93
4.1.4. Použité buněčné linie.....	94
4.1.5. Použité bakteriální kmeny.....	94
4.1.6. Primery pro PCR reakce.....	95
4.1.7. Epitopy.....	96
4.1.8. Antibiotika.....	97
4.1.9. Protilátky.....	97

4.1.9.1. Primární protilátky.....	97
4.1.9.2. Sekundární protilátky.....	98
4.2. METODY.....	99
4.2.1. Sterilizace.....	99
4.2.2. Práce s bakteriálními kulturami.....	99
4.2.2.1. Kultivace bakterií.....	99
4.2.2.2. Příprava kompetentních bakterií pro elektroporaci.....	99
4.2.2.3. Elektroporace plazmidové DNA do kompetentních bakterií <i>E. coli</i> XL1-Blue nebo <i>E. coli</i> DH10Bac.....	100
4.2.2.4. Příprava konzerv z bakterií <i>E. coli</i>	101
4.2.3. Práce s tkáňovými kulturami.....	101
4.2.3.1. Práce s kulturou hmyzích buněk Sf9.....	101
4.2.3.1.1. Pasážování hmyzích buněk.....	101
4.2.3.1.2. Transfekce hmyzích buněk rekombinantním Bakmidem.....	102
4.2.3.1.3. Infekce hmyzích buněk rekombinantním bakulovirem a sklizení infikovaných buněk.....	102
4.2.3.1.4. Plaková zkouška a izolace rekombinantních plaků.....	103
4.2.3.1.5. Izolace umělých virových kapsid z hmyzích buněk.....	104
4.2.3.1.6. Centrifugace přes 10% sacharózový polštář.....	105
4.2.3.1.7. Izopyknická centrifugace v rovnovážném CsCl gradientu.....	105
4.2.3.1.8. Dialýza.....	106
4.2.3.1.9. Zahuštění frakcí po dialýze pomocí PEG.....	106
4.2.3.2. Práce s kulturami savčích buněk.....	107
4.2.3.2.1. Pasážování savčích buněk.....	107
4.2.3.2.2. Infekce myších fibroblastů 3T6 umělými virovými kapsidami za účelem ověření vstupu kapsid do buněk.....	108
4.2.3.2.3. Sklizení savčích buněk.....	108
4.2.3.2.4. Příprava konzerv savčích buněk.....	108
4.2.3.2.5. Fixace buněk na mikroskopických sklíčkách.....	109
4.2.4. Práce s DNA.....	110

4.2.4.1. Separace molekul DNA pomocí horizontální gelové elektroforézy.....	110
4.2.4.2. Maxipreparace plazmidové DNA – alkalická metoda.....	112
4.2.4.3. Minipreparace plazmidové DNA – alkalická metoda.....	112
4.2.4.4. Izolace plazmidu ve vysoké čistotě pomocí kitu QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN).....	113
4.2.4.5. Odstranění RNA ze vzorku při izolaci DNA.....	113
4.2.4.6. Odstranění proteinů ze vzorku DNA – fenol/chloroformová extrakce.....	114
4.2.4.7. Přesrážení DNA pomocí 3M octanu sodného a 96% EtOH.....	114
4.2.4.8. Štěpení DNA pomocí restrikčních endonukleáz.....	115
4.2.4.9. Defosforylace 5' konců plazmidu naštěpeného restrikčními enzymy pomocí fosfatázy.....	115
4.2.4.10. Amplifikace úseků DNA polymerázovou řetězovou reakcí – PCR.....	116
4.2.4.11. Hybridizace syntetických oligonukleotidů.....	117
4.2.4.12. Ligace.....	117
4.2.4.13. Izolace bakmidové DNA.....	118
4.2.5. Práce s proteiny.....	119
4.2.5.1. Příprava buněčných lyzátů pro SDS-PAAGE.....	119
4.2.5.2. SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAAGE).....	120
4.2.5.3. Fixace a barvení gelu po SDS-PAAGE.....	122
4.2.5.4. Western blot.....	123
4.2.5.5. Dot-blot.....	124
4.2.5.6. Imunodetekce proteinů imobilizovaných na nitrocelulózové membráně.....	124
4.2.5.7. Nepřímé imunofluorescenční značení proteinových struktur...	125
4.2.5.8. Stanovení koncentrace proteinů podle Bradfordové.....	125
4.2.5.9. Negativní barvení a příprava preparátů pro elektronovou mikroskopii.....	126
4.2.5.10. Exprese rekombinantních proteinů – systém Bac-to-Bac (Invitrogen).....	127

5. VÝSLEDKY.....	129
5.1. KONSTRUKCE CHIMERICKÝCH VIROVÝCH KAPSID MYŠÍHO POLYOMAVIRU NESOUCÍCH NA SVÉM POVRCHU CIZORODÉ EPITOPY.....	130
5.1.1. Příprava donorového plazmidu.....	130
5.1.2. Příprava rekombinantního bakmidu.....	135
5.1.3. Příprava rekombinantního bakuloviru.....	137
5.1.4. Izolace a analýza chimerických kapsid myšího polyomaviru.....	138
5.2. KONSTRUKCE UMĚLÝCH VIROVÝCH KAPSID LIDSKÉHO POLYOMAVIRU JC.....	148
5.2.1. Příprava donorového plazmidu.....	148
5.2.2. Příprava rekombinantního bakmidu.....	151
5.2.3. Příprava rekombinantního bakuloviru.....	151
5.2.4. Izolace a analýza umělých virových částic odvozených od lidského polyomaviru JC.....	152
6. DISKUZE.....	155
6.1. PŘÍPRAVA CHIMERICKÝCH VIROVÝCH ČÁSTIC ODVOZENÝCH OD MYŠÍHO POLYOMAVIRU NESOUCÍCH NA POVRCHU CIZORODÝ EPITOP.....	156
6.2. KONSTRUKCE UMĚLÝCH VIROVÝCH KAPSID LIDSKÉHO POLYOMAVIRU JC.....	161
7. SOUHRN.....	162
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	165

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK:

7 FFM	sedm dermatoskopických rysů melanomu
α-MSH	melanocyty stimulující hormon α
aa	aminokyselina
AcMNPV	<i>Autographa californica Multiple Nuclear Polyhedrosis Virus</i>
ACT	adoptivní buněčná terapie
AJCC	„American Joint Committee on Cancer“, Americká spojená komise pro rakovinu
ALM	akrolentigózní melanom
AMP	adenosin monofosfát
APC	buňky prezentující antigen
APS	amonium persulfát
ATP	adenosin trifosfát
BAGE	B melanomový antigen
BALB-<i>neu</i>T	transgenní kmen myši, nesoucích aktivní mutovaný krysí gen pro Her-2/ <i>neu</i>
BCG	vakcína <i>Bacillus Calmete-Guérin</i>
<i>Bcr-Abl</i>	skupina fúzních proteinů vznikajících následkem reciproké translokace mezi chromozomy 9 a 22 (ke zlomům chromozomů dochází v oblasti genů <i>bcr</i> a <i>abl</i>)
BFM	bromfenolová modř
BKV	lidský BK virus
bp	páry bází
b-raf	protoonkogen, serin/threoninová proteinkináza
BSA	bovinní sérový albumin
CBB-G250	Coomassie Brilliant Blue G250
CD	„Cluster of differentiation“, molekuly exprimované určitou skupinou buněk
CD4⁺	buňky exprimující CD4
CD4^{-/-}	buňky s deletovaným genem pro CD4
CD8⁺	buňky exprimující CD8
CD8^{-/-}	buňky s deletovaným genem pro CD8
CDK	cyklin-dependentní kináza

CDKN2A	gen kódující ve dvou otevřených čtecích rámcích dva produkty - p16 ^{INK4A} a p14 ^{ARF}
CEA	epitop rozeznávaný T-buňkami odvozený od karcinoembryonálního antigenu CAP-1-6D
CFA	kompletní Freundovo adjuvans
CFSE	carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
c-kit	protoonkogen, tyrozinová proteinkináza
CML	chronická myeloidní leukémie
CpG	deoxycytidyl-deoxyguanosinové oligonukleotidy nebo oblasti bohaté na deoxycytidyl-deoxyguanosin
CTL	cytotoxické T-lymfocyty
CTLA-4	antigen asociovaný s CTL-4
D2F2/E2	nádorové buňky exprimující lidský Her2
Da	dalton
DC	dendritické buňky
DAPI	4', 6'-diamidino-2-fenylindol
ddH₂O	demineralizovaná destilovaná voda
dH₂O	destilovaná voda
DMEM	„Dulbecco's Modified Eagle's Medium“, kultivační médium
DMSO	dimethylsulfoxid
dNTP	deoxyribonuklesid trifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiothreitol
E2F	elongační transkripční faktor 2
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylendiamintetraacetát disodný
EGFP	„Enhanced Green Fluorescent Protein“, zelený fluorescenční protein
EGFP-t-VP3	EGFP fúzovaný se zkrácenou formou VP3
EM	elektronová mikroskopie
EMEA	Evropská agentura pro léčiva
ErbB2	receptorová tyrozinkináza
EtBr	ethidium bromid
EtOH	ethanol

FAMMM syndrome	„Familial atypical multiple mole and melanoma syndrome“, syndrom dědičného atypického vícenásobného mateřského znaménka a melanomu
FCS	fetální telecí sérum
FDA	Úřad pro potraviny a léčiva
FLAG-Bcr-Abl-tVP3	zkrácená forma VP3 fúzovaná s částí unikátního proteinu chronické myeloidní leukémie Bcr-Abl a aminokyselinovou sekvencí usnadňující purifikaci a detekci, tzv. FLAG sekvencí
Fv	variabilní fragment protilátky
GAGE	antigen G
GFP	zelený fluorescenční protein
GM-SCF	faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů
gp100	glykoprotein 100
GST	glutathion-S-transferáza
GST-VP1	VP1 fúzovaný s GST
h, hod	hodina
HaPyV	křeččí polyomavirus
HEPES	kyselina 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethansulfonová
Her-2/neu (Her2)	protoonkogen, jehož zvýšená exprese je spojena s některými nádory prsu, glioblastomy, nádory vaječníku, karcinomy ledvinných buněk a dalšími typy tumorů
HLA	lidské leukocytární antigeny
HMB-45	„Human Melanoma Black - 45“, monoklonální protilátka proti glykoproteinu gp100
hpi	hodin po infekci
HPV	lidský papillomavirus
HSPPC	peptidové komplexy proteinů tepelného šoku
IFNα	interferon α
IFNγ	interferon γ
IgG	imunoglobuliny třídy G
IL-2	interleukin 2
IL-12	interleukin 12
IPTG	isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid

JCV	lidský JC virus
KAc	octan draselný
kbp	tisíce párů bazí
kDa	kilodalton (tj. tisíc daltonů)
Ki-67	proliferační marker
KIV	lidský KI virus (odvozeno od „Karolinska Institutet“)
KLH	„Keyhole limpet hemocyanin“, nosičový protein
LAK	lymfokinem aktivovaný zabíječ
LMM	lentigo maligna melanom
LOH	ztráta heterozygosity
LT	„Large tumour antigen“, velký T antigen
MAD	depigmentace asociovaná s melanomem
MAGEs	antigeny asociované s melanocyty
MART-1/Melan-A	melanomový antigen rozpoznávaný T-buňkami-1
MC1R	melanocortin-1-receptor
MCS	„Multiple cloning site“, polyklonovací místo, polylinker
Mdm2	„Murine double minute 2 protein“, negativní regulátor proteinu p53
MgAc	octan hořečnatý
MHC-I	hlavní histokompatibilní komplex I
MHC-II	hlavní histokompatibilní komplex II
MIA	„Melanoma inhibitory activity“, autokrinní růstový faktor
min	minuta
MITF	microphthalmia-asociovaný transkripční faktor
MO5	melanomové buňky exprimující ovalbumin
MPyV	myší polyomavirus
MCPyV	lidský virus karcinomu Merkelových buněk
MT	„Middle tumour antigen“, střední T antigen
MPtV	myší pneumotropní virus
MUC1	lidský mucin 1
MUM-1	s melanomem-asociovaný mutovaný antigen-1
NaAc	octan sodný
NK	přirozený zabíječ

NMM	primárně nodulární melanom
NP-40	Nonidet P-40
NY-ESO 1	„New York esophageal squamous cell carcinoma“, nádorový antigen
OD	optická denzita
OVA	ovalbumin
p14^{ARF}	protein ovlivňující melanogenezi a aktivitu proteinu p53
p16^{INK4A}	inhibitor cyklin-dependentní kinázy 4
p53	tumor protein 53, onkosupresor
PAAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
PBS	„Phosphate Buffered Saline“, fosfátový izotonický tlumivý roztok
PCR	polymerázová řetězová reakce
PD-1	koreceptor označovaný jako programovaná buněčná smrt 1
PD-L1	ligand programované smrti-1
PD-L2	ligand programované smrti-2
PEG 20000	polyethylenglykol 20000
pfu	plak formující jednotka
PITSLRE	rodina protein kináz
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid
pRb	„Retinoblastoma protein“, onkosupresor
preS1	jeden z antigenů hepatitidy B
RNA	ribonukleová kyselina
RNáza	ribonukleáza
RTG	rentgenový
rpm	otáčky za minutu
s	sekunda
SDS	dodecylsulfát sodný
SSM	superficiálně se šířící melanom
ST	„Short tumour antigen“, malý T antigen
SV40	opičí virus SV40 (Simian vacuolating virus 40)
T4	bakteriofág T4
TCR	T-buněčný receptor
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin
TIL	tumor-infiltrující lymfocyty

TK	tkáňová kultura
TLR	Toll-like receptory, rozpoznávají patogenní molekulární vzorce
TNF	faktor nekrotizující nádory
Tregs	regulační T-lymfocyty
TRIS	tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSTA	nádorově specifické transplantační antigeny
TSV	trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus
tVP3	zkrácená forma minoritního kapsidového proteinu myšího polyomaviru (C-koncové aminokyseliny 105 – 204)
TYRP-1	protein příbuzný tyrozináze 1
TYRP-2	protein příbuzný tyrozináze 2
U	jednotka (přesná definice popsána výrobcem příslušného enzymu)
UV	ultrafialový
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor
VLPs	„Virus-like particles“, umělé virové částice
VP1	hlavní strukturní protein polyomavirů
VP1_7less	VP1 zkrácený v DE smyčce o 7 aminokyselin
VP2	minoritní strukturní protein polyomavirů
VP2-Her2	VP2 myšího polyomaviru fúzovaný s extracelulární a transmembránovou částí lidského Her-2/ <i>neu</i>
VP3	minoritní strukturní protein polyomavirů
WHO	světová zdravotnická organizace
wt	divoký typ
WUV	lidský WU virus (odvozeno od Washington University)
ŽA	živný agar
ŽB	živný bujón

1. ÚVOD

Detailní studium virů, jejich životních cyklů a interakcí s hostitelskou buňkou je důležitým nástrojem pokroku v mnoha oblastech biologie a medicíny. Pochopení molekulárních mechanismů využívaných viry v průběhu infekce slouží nejen k vývoji účinných léčiv a obranných prostředků proti nákaze a šíření těchto patogenů, ale i k nalézání nových přístupů v léčbě jiných závažných chorob. Unikátní vlastnosti virů poskytují také nové možnosti na poli genové terapie a imunoterapie. Tímto směrem se v současné době ubírá výzkum mnoha vědeckých skupin po celém světě a počet studií založených na virových vektorech neustále stoupá. Kapsidové struktury mnoha virů mohou být využity k dopravě terapeutických genů nebo viru vlastních či cizorodých antigenů do cílových buněk. Tento přístup by v ideálním případě mohl být použit k obnovení funkce poškozených genů či k vyvolání do té doby chybějící nebo utlumené imunitní odpovědi. Je však nejprve nutné co nejlépe porozumět všem aspektům životního cyklu virů a jejich interakcí s hostitelskou buňkou, abychom se jimi mohli inspirovat při vývoji účinných terapií a byli schopni eliminovat možná rizika s nimi spojená. Snaha o konstrukci vakcín založených na virových nanočásticích (Virus-like particles, VLPs) vyplývá z potřeby nalézt bezpečnější variantu k atenuovaným či inaktivovaným vakcínám, u kterých v případě nedokonalé přípravy může dojít k propuknutí choroby či jiným nežádoucím vedlejším účinkům. Technologie VLPs využívá schopnosti virových proteinů se samostatně uspořádat do kapsidových struktur. Výhodou tohoto přístupu je i vysoká imunogenicita těchto částic a tedy adjuvantní efekt, který navozují.

Tato diplomová práce se zabývá přípravou chimerických nanočástic myšího polyomaviru, které na svém povrchu nesou epitopy maligního melanomu a mohly by tedy sloužit jako součást adjuvantní terapie v léčbě tohoto zhoubného onemocnění. V rámci této práce byly zkonstruovány i kontrolní částice odvozené od myšího polyomaviru nesoucí epitop kuřecího ovalbuminu a dále umělé kapsidy jednoho z lidských patogenů, viru JC, pro výzkumné a diagnostické účely.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. MALIGNÍ MELANOM

2.1.1. Úvod a historie

Již v 5. století před našim letopočtem se Hippokrates zmiňuje o „černé rakovině“ a u mumií Inků starých více než 2400 let byly objeveny metastázy melanomu v kůži a kostech. První dostupná zmínka o melanomu v odborné literatuře je datována do roku 1870, kdy John Hunter popsal zčásti bílý a zčásti černý nádorový výrůstek na krku jednoho z pacientů. Melanom byl poprvé popsán jako samostatná klinická jednotka René Laennecem v roce 1806. Ten také roku 1812 použil termín „melanosis“. Rozpoznal a diagnostikoval též metastázy v mediastinálních uzlinách, játrech, žaludku, očích a plicích. Záznam první operace metastáz melanomu byl publikován roku 1850 v časopise *Lancet*. Termín melanom byl poprvé použit Robertem Carswellem v roce 1838. První zmínky o melanomu v Čechách jsou datovány do roku 1858, kdy profesor Eiselt popsal tři případy tohoto onemocnění (shrnuťo v KRAISOVÁ, 2006).

Melanom je velmi agresivní a vůči terapii rezistentní zhoubný nádor buněk schopných produkovat pigment – melanocytů (MARKOVIC *et al.*, 2007a). Jedná se o nádor neuroektodermálního původu, proto se může vyskytnout v různých tkáních – nejčastěji se jedná o kůži, dále pak o oční tkáň a velmi vzácně o sliznice (KLENER, 2002).

2.1.2. Etiologie a patogeneze

Melanocyty, zodpovědné za pigmentaci kůže a vlasů, sídlí v bazální vrstvě epidermis a produkují melanin, který štíhlými dendritickými výběžky transportují ve formě váčků – tzv. melanozómů, keratinocytům, ve kterých se rozprostírá jako ochranný štít nad jádrem. Melanin absorbuje UV záření a neutralizuje volné radikály vznikající jeho působením, a chrání tak kožní buňky před oxidativním poškozením (MARKOVIC *et al.*, 2007a).

Etiologie nádorové transformace melanocytů nebyla dosud zcela objasněna. Na jejím počátku obvykle stojí onkogenní mutace, která po neúčinné opravě reparačními systémy buňky spouští za vhodných podmínek kaskádu patologických změn vedoucích k množení poškozených melanocytů, nárůstu chromozomálních nestabilit a kumulaci dalších mutací (KRAISOVÁ, 2006). Na vzniku a vývoji této malignity se podílí řada faktorů, které se vzájemně ovlivňují. Objasnění vztahů a interakcí mezi genetickými a

vnějšími vlivy jsou v současné době subjektem mnoha probíhajících výzkumů (MARKOVIC *et al.*, 2007a).

2.1.2.1. Vnější rizikové faktory

Svůj nezpochybnitelný podíl na vzniku melanomu nese zevní prostředí. Významným činitelem, jehož působením na buňky lidského organismu se zabývá celá řada studií a programů (např. program světové zdravotnické organizace WHO – INTERSUN, viz <http://www.who.int/uv/en/>), je vliv ultrafialového záření, a to především jeho UVB složky.

Destruktivní účinky UV záření, jemuž je přičítána role iniciátoru, promotoru, kokarcinogenu a imunosupresoru, se během života postupně kumulují (KLENER, 2002). Zásadní pro vývoj nemoci je celková dávka záření dopadající na kůži v průběhu celého života, období zvýšené expozice slunečnímu záření (především v dětství, ale samozřejmě i v dospělosti), zda dochází k expozici nárazově či chronicky, četnost a intenzita spálení kůže a další ne zcela objasněné faktory (KLENER, 2002; KRAISOVÁ, 2006). Základní rizikové faktory pro vznik melanomu jsou shrnuty v tabulce 2.1.

Množství UV záření dopadajícího na zemský povrch je závislé na atmosférických podmínkách (stav ozonové vrstvy, znečištění ovzduší, oblačnost), denní době, nadmořské výšce, ročním obdobím a zeměpisné šířce (KRAISOVÁ, 2006). Proto jsou např. ohroženější skupinou bělošští obyvatelé rovníkových oblastí, kteří jsou více vystavení zhoubnému působení slunečního záření.

Kožní fototyp	Lidé se světlou kůží mají melanom častěji
Etnický původ	Melanom je převážně nádor bílé rasy
Schopnost se opálit	Lidé, kteří se dobře opalují, mají melanomy méně často
Tendence ke spálení kůže	Opakované spálení kůže zvyšuje riziko melanomu
Počet běžných névů	Čím vyšší počet névů, tím větší riziko melanomu
Dysplastické névy	Jejich přítomnost a vyšší počet zvyšují riziko melanomu
Dovolené u moře	Časté dovolené u moře zvyšují u bělochů riziko melanomu Interminutní slunění je rizikovější než chronické
Migrace	Lidé se světlou kůží, kteří se přestěhují do míst s vysokou intenzitou slunečního záření, mají vyšší riziko vzniku melanomu

Tabulka 2.1.: Základní rizikové faktory spojené s expozicí slunečnímu záření podílející se na vzniku melanomu. Převzato z Kraisová (2006)

Podle reakce kůže na sluneční záření a funkční kapacity melanocytů můžeme rozlišit 6 základních fototypů kůže od nejcitlivějšího typu I, s velmi světlou kůží citlivou na sluneční záření se sklonek ke spálení, pihami, světlýma očima a zrzavými vlasy, až po typ VI, s kůží černé barvy, velmi odolnou vůči škodlivým účinkům UV záření, černými vlasy i očima (KRAISOVÁ, 2006). Fototyp I a II s sebou pro svého nositele přináší nejvyšší riziko vzniku melanomu (TITUS-ERNSTOFF *et al.*, 2005; KLENER, 2002).

Novodobý trend trávení dovolených v oblastech se vysokým slunečním zářením vedl bohužel zřejmě i ke značnému nárůstu incidence melanomu. Až 60 – 90% nově vzniklých případů melanomu je pravděpodobně následkem zvýšené expozice slunečnímu záření (KRAISOVÁ, 2006). Negativní vliv dalších zdrojů UV záření jako např. solárií zatím nebyl jednoznačně potvrzen (MARKOVIC *et al.*, 2007a).

2.1.2.2. Vnitřní faktory

Na vzniku maligního melanomu se podílí i genetické faktory, které nejen umožňují vznik melanomu, ale zároveň i ovlivňují jeho pozdější chování (KRAISOVÁ, 2006).

Oproti vžitě představené laické veřejnosti, pouze přibližně 26% melanomů vzniká na základě preexistujícího melanocytárního névu (benigní akumulace melanocytů), ať již kongenitálního nebo získaného. Pravděpodobnost vzniku melanomu se v těchto případech různí na základě typu, velikosti, počtu a lokalizaci névu (BEVONA *et al.*, 2003). S vyšším rizikem jsou spojeny především dysplastické, tedy cytologicky atypické, névy. Náchylnější se zdají být jedinci s větším počtem dysplastických névů (TITUS-ERNSTOFF *et al.*, 1988). Zvláště pokud jejich osobní či rodinná anamnéza už výskyt melanomu zahrnuje, je přítomnost takového atypického névu spojena se signifikantně vyšším rizikem vývoje choroby (HALPERN *et al.*, 1993). Pacienti trpící familiárním syndromem označovaným jako syndrom dysplastického névu, syndrom atypického névu nebo také FAMMM syndrom (Familial atypical multiple mole and melanoma syndrome) jsou vystaveni výrazně vyššímu riziku vzniku melanomu (GREENE, 1999). Familiární výskyt melanomu vypovídá o zřejmě nezanedbatelné roli dědičnosti v patogenezi melanomu.

U hereditárního melanomu je velmi často možno nalézt mutaci v genu CDKN2A na krátkém raménku chromosomu 9. Tento lokus kóduje dva proteiny čtené z odlišných čtecích rámců, účastníci se na regulaci růstu a apoptózy: inhibitor cyklin-dependentní

kinázy 4 (CDK4), protein p16^{INK4A}, a dále protein p14^{ARF} ovlivňující melanogenezi a aktivitu proteinu p53 (viz obr. 2.1.). P16^{INK4A} inhibuje CDK4-zprostředkovanou forforylaci proteinu pRb, což udržuje pRb v hypofosforylovaném aktivním stavu a umožňuje tak vazbu jeho k E2F a represi transkripční aktivity tohoto faktoru. Tato interakce je součástí tzv. G1 kontrolního bodu buněčného cyklu, kterým musí buňka projít, pokud se má rozdělit. Když ovšem dojde ke ztrátě funkce p16^{INK4A} či ke konstitutivní aktivaci CDK4, je tento kritický bod buněčného cyklu narušen a proliferace buňky se vymyká kontrole. P14^{ARF} předchází Mdm2-zprostředkované degradaci proteinu p53, důležitého onkosupresoru a proapoptického proteinu, a tím podporuje jeho stabilizaci. Mutace v těchto proteinech tedy vede k nekontrolovatelné proliferaci postižených buněk a možnosti hromadění dalších mutací (KLENER, 2002; KRAISOVÁ, 2006; LIN et al., 2008). Další mutace spojená se zvýšeným rizikem vzniku melanomu postihuje chromozom 12, přesněji gen pro CDK4. Pozměněná, konstitutivně aktivní CDK4 rezistentní vůči působení p16^{INK4A} vede ke vzniku stejného fenotypu jako mutace v p16 (LIN et al., 2008). Díky tomu, že se jedná o autozomálně dominantní mutace, může ztrátou heterozygosity (LOH, z anglického loss of heterozygosity) dojít k uvedeným změnám i u sporadických forem onemocnění (KLENER, 2002). Na expresi této mutace se podílí řada dalších genetických a epigenetických mechanismů. Role epigenetických mechanismů v patogenezi melanomu shrnuta v HOWELL et al. (2009)

Familiární výskyt melanomu však není příliš častý. Převážná většina nádorů se objevuje sporadicky, ale provází je s vysokou frekvencí stejné změny, jaké lze nalézt u onemocnění hereditárního. Jediným rozdílem je, že zatímco u dědičné formy onemocnění postihuje mutace germinální buňky (GREENE, 1999), u sporadicky vzniklých melanomů se sice jedná o shodné, ale výlučně o somatické, mutace melanocytů (KLENER, 2002; KRAISOVÁ, 2006).

Jedním z dalších genů, který může být postižen je MC1R. Můžeme ho zařadit do skupiny více než 120 genů určujících zbarvení kůže a vlasů. Kóduje transmembránový receptor pro α -melanocyty stimulující hormon (α -MSH) exprimovaný na povrchu melanocytů (LIN et al., 2008). Jedná se o receptor spojený s G-proteinem, podílející se na regulaci hladiny cyklického AMP, což je důležitý druhý posel mající zásadní roli v mnoha buněčných signálních kaskádách a metabolických procesech. Vlivem aktivace Mc1r je zvýšena exprese transkripčního faktoru MITF, který spouští expresi genů důležitých pro syntézu melaninu. Plně aktivní alely MC1R jsou zodpovědné za tvorbu

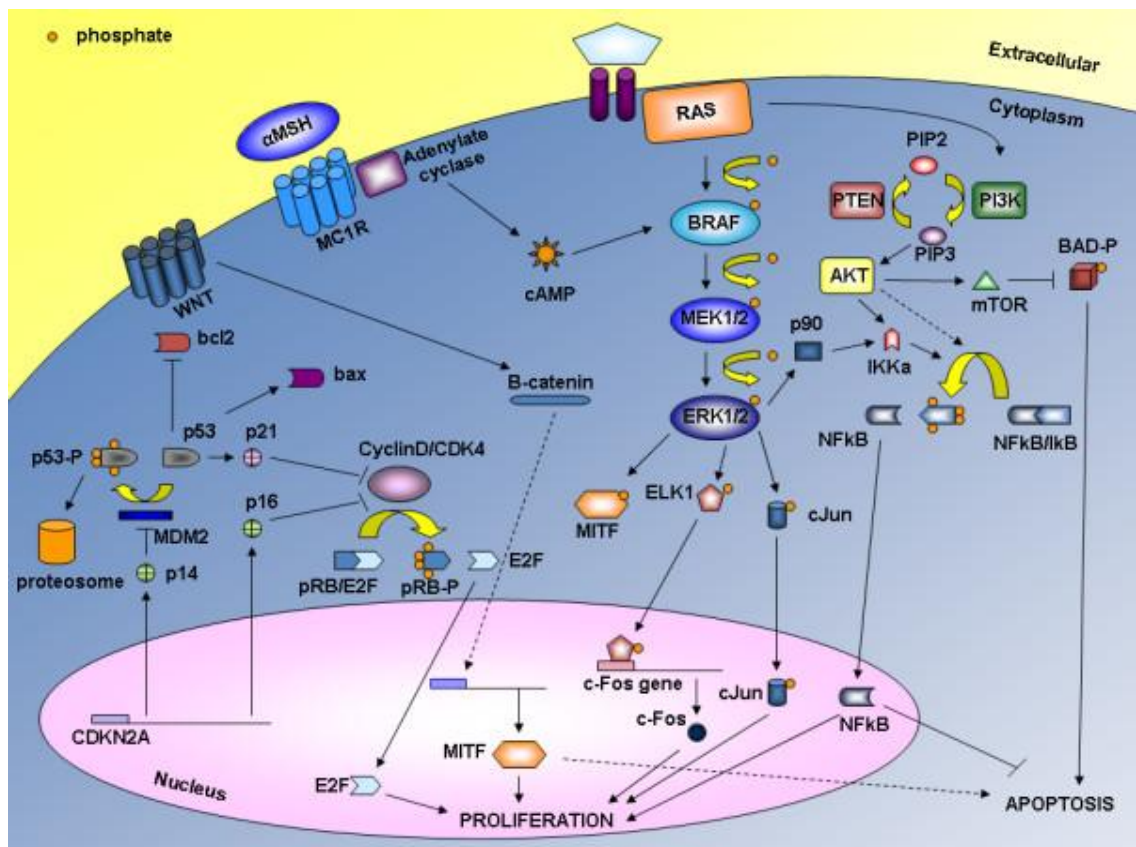
tmavého pigmentu eumelaninu, zatímco alely s oslabenou aktivitou vedou k produkci červeného/žlutého pigmentu feomelaninu, který může mít i fotosenzibilizační účinky (KRAISOVÁ, 2006). Kódující oblast MC1R je vysoce polymorfní (existuje přinejmenším 30 alelických variant) a přítomnost jedné či více různých alel je silně spjata s fenotypovými znaky jako jsou zrzavé vlasy, pokožka fototypu I a náchylnost k tvorbě pih. Bylo také zjištěno, že určité varianty MC1R jsou spojeny se zvýšeným rizikem vzniku kožního melanomu (PALMER *et al.*, 2000; KENNEDY *et al.*, 2001).

U melanomových buněk na rozdíl od nepoškozených melanocytů velmi často dochází k aneuploidii některých chromozomů. Nejčastěji se jedná o aberace chromozomu 1, 6 a 9, dále pak může dojít ke zmnožení chromozomu 7 a aberacím 10. chromozomu. U metastazujících pacientů dochází ve více než 50% případů k aberacím 11. chromozomu, oproti necelým 20% u primárních melanomů (KRAISOVÁ, 2006). Na terminální části krátkého raménka chromozomu 1, pravděpodobně v lokusu PITSLRE, který je tvořen třemi tandemovými duplikacemi genu pro proteinkinázu p58, se nachází gen pro onkosupresor, který má svůj podíl na vzniku a rozvoji maligního melanomu. Overexprese PITSLRE navozuje apoptózu buněk, zatímco snížení exprese vede k dělení buněk a jejich růstu. U většiny transformovaných melanomových buněk dochází buď k delecí nebo expresi mutovaného lokusu. Výskyt tohoto typu poškození dosahuje až 60% případů metastazujícího melanomu (KRAISOVÁ, 2006). Dalším častým defektem (50% melanomů) je delece dlouhého raménka chromozomu 6, objevující se až v pozdějších stádiích onemocnění (KRAISOVÁ, 2006). Jak již bylo zmíněno, nejlépe prostudovány jsou změny 9. chromozomu, postihující nadpoloviční většinu pacientů s melanomem, ať už jedná o onemocnění familiárního či sporadického typu (KRAISOVÁ, 2006)

U maligně transformovaných melanocytů byla zaznamenána řada genetických a molekulárních změn zasahujících do přirozeného průběhu buněčného cyklu, buněčné signalizace či senescenčních a apoptotických drah. Hromadící se změny, narušující i mezibuněčnou komunikaci a adhezi, zvyšují agresivitu choroby a mohou nakonec vyústit v migraci nádorových buněk a vznik metastáz. Bohužel rozsah ani zaměření této diplomové práce nedovoluje se této velmi zajímavé a komplexní problematice blíže věnovat a zabývat se detailním rozbořením těchto genetických defektů. Touto oblastí se nicméně zabývá celá řada původních i přehledných článků (např. SATYOMOORTHY a HERLYN, 2002; McGARY *et al.*, 2002; CURTIN *et al.*, 2005; HAASS a HERLYN, 2005; HAASS *et al.*, 2005; GAGGIOLI a SAHAI, 2007; CROWSON *et al.*, 2007;

SEKULIC *et al.*, 2008; LOPEZ-BERGAMI *et al.*, 2008; GHOSH a CHIN, 2009; PALMIERI *et al.*, 2009; a řada dalších). Čím hlubší a komplexnější je naše poznání a porozumění molekulární úrovni patogeneze melanomu, tím blíže se dostáváme ke kýženému cíli, tedy k vývoji účinné, přesně cílené, či dokonce skupinám pacientů nebo jedincům na míru šité léčby této velmi agresivní choroby.

Hlavní dráhy, které mohou být u melanomových buněk zasaženy a narušeny jsou zobrazeny na obr. 2.1.



Obr. 2.1.: Hlavní dráhy, které mohou být zasaženy u melanomu. Schematické znázornění dráhy asociované s N-RAS, BRAF a mitogenem-aktivovanou proteinkinázou (MAPK) a dráhy spojené s CDK2A a MITF. Plné šipky představují aktivační signály, přerušované inhibiční. BAD, BCL-2 antagonist of cell death; cAMP, cyclic AMP; CDK4, Cyclin-dependent kinase 4; CDKN2A, Cyclin-dependent kinase inhibitor of kinase 2A; ERK1/2, Extracellular-related kinase 1 or 2; IκB, inhibitor of κB protein; IKK, inhibitor-of-κB-protein kinase; MC1R, melanocortin-1-receptor; MITF, Microphthalmia-Associated Transcription Factor; MEK1/2, Mitogen-activated protein kinase-extracellular related kinase 1/2; PI3K, Phosphatidylinositol 3 kinase; PIP2, Phosphatidylinositol bisphosphate; PIP3, Phosphatidylinositol trisphosphate; PTEN, Phosphatase and tensin homologue. Převzato z PALMIERI *et al.* (2009)

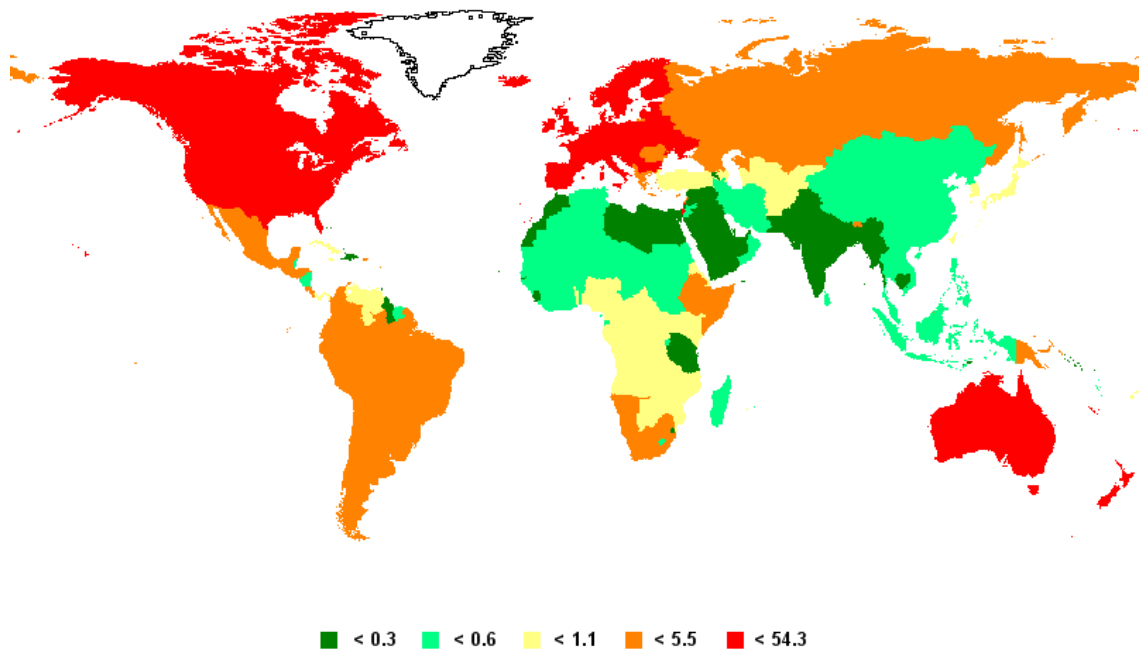
2.1.2.3. Metastazující melanom

Melanom má vysokou schopnost metastazovat prostřednictvím lymfatických i hematogenních cest. Metastázy melanomu se mohou objevit ve všech orgánech nebo tkáních, některé lokalizace ale převažují. Často je napadena kůže a podkoží (45-55%) a regionální lymfatické uzliny (40-50%), následují vzdálenější lymfatické uzliny, plíce (35-47%), játra (25-35%), centrální nervová soustava (25-37%), kosti (15-20%) a gastrointestinální trakt (10-15%). Medián přežití pacientů s viscerálními metastázami se pohybuje od 6 do 9 měsíců, v závislosti na rozsahu postižení a bez závislosti na typu léčby. Doba přežití je značně ovlivněna polohou metastáz a počtem napadených orgánů (KRAISOVÁ, 2006).

2.1.3. Epidemiologie

Incidence melanomu má, navzdory různým preventivním programům pořádaným zdravotnickými organizacemi, trvale vzrůstající tendenci a je, jak již bylo řečeno, ovlivněna řadou vzájemně provázaných faktorů, jako je kožní fototyp, intenzita slunečního záření, věk pacienta, socioekonomické poměry, genetické a dědičné faktory a další (KRAISOVÁ, 2006). Nejčastější výskyt choroby je zaznamenávám v zemích s vysokým počtem dnů plného slunečního svitu a u bělošské populace severského typu se světlou kůží (KLENER, 2002). Geograficky se jedná o bělošské obyvatelstvo Austrálie a Nového Zélandu, následované obyvateli jižních států USA. V posledních letech narůstá incidence i ve státech severní Evropy, kde převládá obyvatelstvo nordického a keltského typu. U černochoů, asiátů a dalších ras tmavší pleti je melanom poměrně vzácný. Odhadovanou incidenci melanomu v roce 2008 přibližuje obr. 2.2.

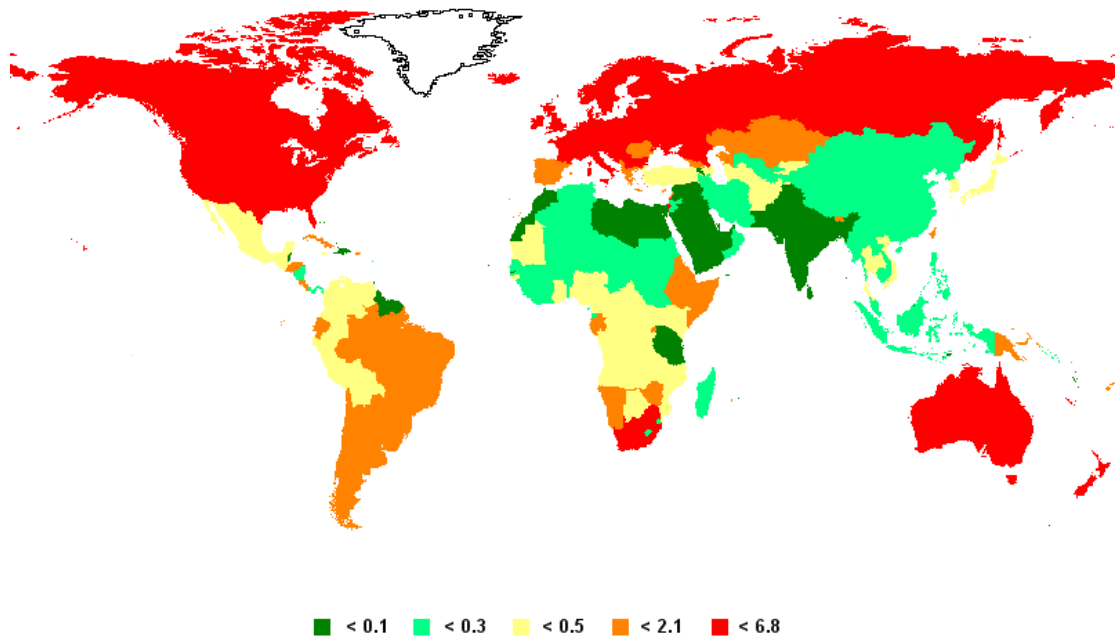
Estimated crude incidence rate per 100,000
Melanoma of skin: both sexes, all ages



GLOBOCAN 2008 (IARC) - 22.4.2011

Obr. 2.2.: Odhadovaná všeobecná incidence melanomu na 100000 obyvatel v roce 2008 (zahrnuta obě pohlaví a všechny věkové skupiny). Převzato z <http://globocan.iarc.fr>

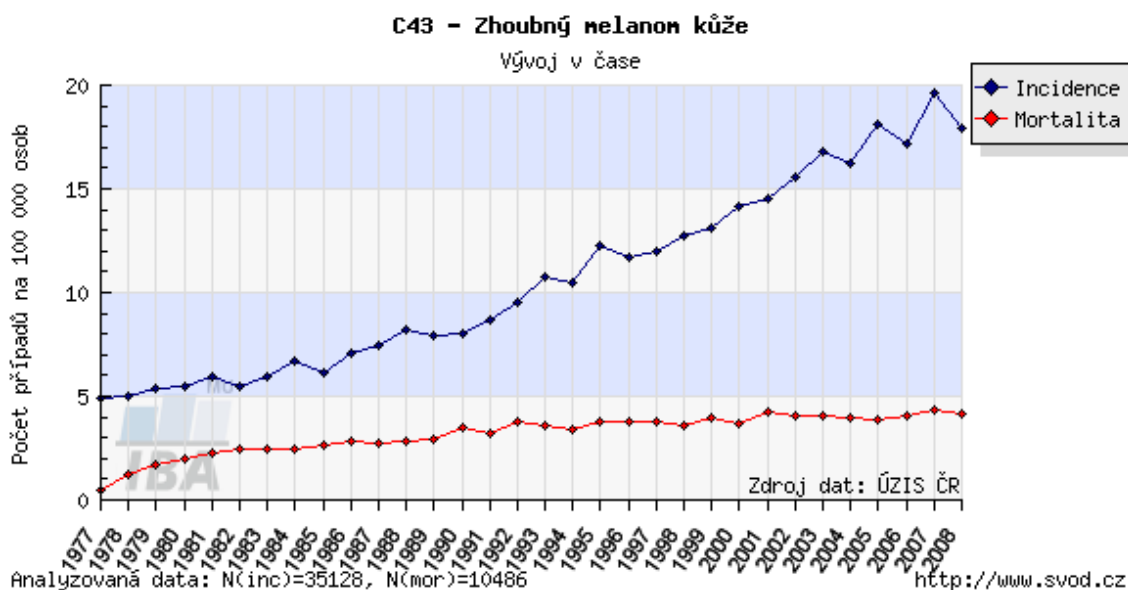
Mortalita pacientů s maligním melanomem se v posledních letech celosvětově snížila, za což je pravděpodobně vysokou měrou zodpovědná lepší a včasnější diagnostika. Pětileté přežití v 50. letech bylo 49%, v 90. už dosáhlo až 81% (KLENER, 2002). Celosvětovou situaci v roce 2008 týkající se všeobecné úmrtnosti pacientů postižených melanomem vyjadřuje obr. 2.3.



GLOBOCAN 2008 (IARC) - 22.4.2011

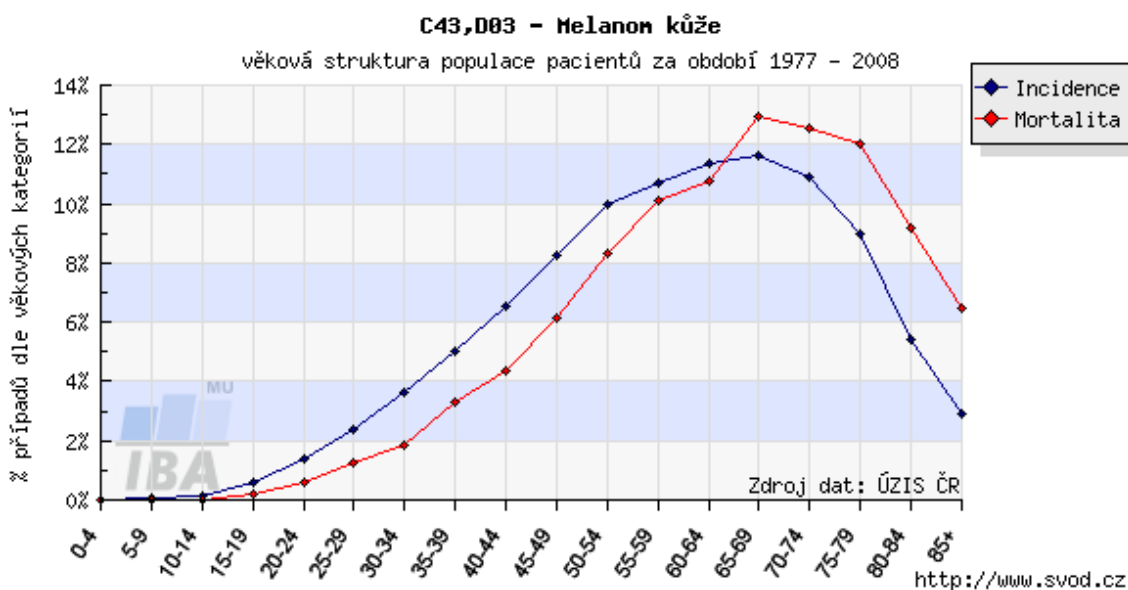
Obr. 2.3.: Předpokládaná všeobecná mortalita pacientů na 100000 obyvatel v roce 2008 (zahrnuta obě pohlaví a všechny věkové skupiny). Převzato z <http://globocan.iarc.fr>

V ČR dosahuje incidence středních hodnot, ale také trvale stoupá – na počátku 70. let minulého století dosahovala 3,2 na 100000 obyvatel, v 90. letech už to bylo 11,4 a na počátku 21. století již 15,3. Standardizovaná incidence v roce 1998 tedy činila 8% na 100000 obyvatel, což představovalo 2,1% všech hlášených maligních nádorů. Roční nárůst incidence melanomu v ČR je 7,7% u mužů a 8,3% u žen, což souhlasí s výsledky získanými v evropské populaci, kde se uvádí roční nárůst 5 – 8% (KLENER, 2002; KRAISOVÁ, 2006). Vývoj incidence a mortality v ČR v letech 1977 – 2008 zobrazuje graf 2.1.



Graf 2.1.: Incidence a mortalita melanomu v ČR v letech 1977 – 2008. Převzato z www.svod.cz

Rovněž klesá průměrný věk pacientů s melanomem a bohužel dnes není výjimkou ani výskyt tohoto onemocnění u dětí prepubertálního věku. V současné době se uvádějí 2 nejvíce postižené věkové skupiny, a to 30 – 40 let a 55 – 70 let (KLENER, 2002; KRAISOVÁ, 2006). Zastoupení jednotlivých věkových skupin pacientů v ČR shrnuje graf 2.2.



Graf 2.2.: Incidence melanomu a mortalita dle věkových skupin pacientů v ČR v období 1977 – 2008. Převzato z www.svod.cz

Původní práce zabývající se výskytem melanomu tvrdí, že 2x častěji postihuje ženy nežli muže. S narůstající incidencí tento rozdíl ale klesá a v některých evropských zemích je uváděn poměr 1,5:1. V oblastech s vysokou incidencí se poměr postižených mužů a žen vyrovnává a v některých státech Austrálie a USA jsou dokonce častějšími pacienti muži. Nelze tedy jednoznačně určit, které pohlaví melanom postihuje častěji. V ČR je tento poměr v posledních letech téměř 1:1 – např. incidence v roce 2002 dosáhla u mužů i žen shodně 15,3/100000. Rozdíly však můžeme pozorovat v anatomické distribuci nádorů. Zatímco ženy jsou nejčastěji diagnostikovány s nádory nacházejícími se na dolních končetinách (hlavně na bérkách), u mužů se jedná o melanom na trupu v oblasti zad (KRAISOVÁ, 2006; NEWELL, 1988). Tato místa výskytu naznačují, že při iniciaci a propagaci choroby mohou hrát důležitou roli jak chronická, tak intermitentní expozice UV záření (MACKIE, 2000).

2.1.4. Klinické varianty maligního melanomu

Maligní melanom lze rozdělit na formy kožní, slizniční a oční.

2.1.4.1. Oční formy maligního melanomu

Maligní melanom postihující oko patří velmi vzácné druhy rakoviny (MARKOVIC *et al.*, 2005b). Může být odvozen od různých nitroočních struktur – může se jednat o melanom cévnatky, řasnatého tělesa nebo duhovky (KLENER, 2002).

2.1.4.2. Slizniční formy maligního melanomu

Tvoří méně než 1% případů melanomu, jsou častější u asijských ras (5 – 8%). Nejčastěji jsou lokalizovány na sliznicích vagíny, análního otvoru, gastrointestinálního traktu, ústní dutiny, nosní dutiny a paranazálních sinů (KLENER, 2002). Vzhledem k lokalizaci nádorů není předpokládán přímý účinek UV záření na vznik choroby (MACKIE, 2000)

2.1.4.3. Kožní formy maligního melanomu

Podle morfologie a histopatologických rysů lze rozlišit několik klinických variant melanomu (KLENER, 2002; KRAISOVÁ, 2006):

- superficiálně se šířící melanom a sekundárně nodulární melanom (SSM; 65 – 75% případů melanomu)
- primárně nodulární melanom (NMM; 15 – 30%),
- lentigo maligna a lentigo maligna melanom (LMM; 4 – 10%)
- akrolentigózní melanom (ALM; 2 – 10%)
- desmoplastický melanom ($\leq 1\%$)
- amelanotický melanom (1 – 7%)

Někteří autoři navíc vymezují jako samostatnou jednotku ještě melanoma *in situ* a primárně amelanotický melanom (KRAISOVÁ, 2006). Existují i další formy melanomu, které jsou ovšem už velmi raritní.

2.1.4.3.1. Melanoma *in situ*

V případě melanoma *in situ* se jedná spíše o počáteční vývojové stadium melanomu, ve kterém ještě nedošlo k rozšíření melanomových buněk mimo úroveň *dermis*. V epidermis dochází k výrazné proliferaci melanocytů, které se šíří až ke *stratum granulosum* a tvoří drobná hnízda, která ale nepřesahují do *koría*. Pokud není v tomto stadiu odstraněn, začnou nádorové buňky pronikat přes bazální membránu do *koría*, a nádor se přemění na jednu z pokročilejších klinických variant (KRAISOVÁ, 2006).

2.1.4.3.2. Superficiálně se šířící melanom a sekundárně nodulární melanom (SSM a SN SSM)

Jedná se vlastně o dvě vývojové fáze nejčastěji se vyskytující formy melanomu, která je na počátku charakterizována pomalým horizontálním růstem pigmentového ložiska trvajícím měsíce i léta. Pokud není melanom v této fázi odstraněn, dochází k jeho přechodu právě na sekundárně nodulární formu, pro kterou je příznačný vznik uzlů uložených ve středu ale i při okrajích ložiska a jejich růst v horizontální i vertikální rovině. Po této přeměně se nádor stává velmi agresivním a může docházet ke vzniku metastáz. Třetina případů vzniká v místě preexistujícího névu (dysplastického nebo junkčního), dvě třetiny *de novo* na předem nepostižené kůži. Výskyt je nejčastější mezi 30. – 50. rokem života (MACKIE, 2000; KRAISOVÁ, 2006). Hlavními rysy takového melanomu jsou velikost ≥ 10 mm, tmavé skvrnitě zbarvení, asymetrie a nepravidelnost okraje (KRAISOVÁ, 2006).

2.1.4.3.3. Nodulární melanom (NMM)

Jedná se o melanom charakterizovaný už od svého vzniku vertikálním růstem nejen nad kožní povrch, ale i do hlubokých vrstev *koría*, a vysokou pravděpodobností vzniku metastáz. Často je amelanotický a nevykazuje typické rysy. Nejčastěji se vyskytuje na předem nepostižené kůži trupu, hlavy a krku, obě pohlaví jsou postižena rovnou měrou. Typický je pro něj rychlý růst a jednotná pigmentace v hnědé, černé nebo šedočerné barvě. Z hlubších partií nádoru může docházet k intralymfatickému a intravaskulárnímu metastázování (KLENER, 2002; KRAISOVÁ, 2006).

2.1.4.3.4. Lentigo maligna a lentigo maligna melanom (LMM)

Opět se jedná o dvě vývojové fáze jednoho typu melanomu, lentigo maligna nebo také *melanosis praecancerosa circumscripta Dubreuilh* (DUBREUILH, 1894) či Hutchinsonova skvrna (HUTCHINSON, 1890) je však považován za přednádorové stadium. Nejčastěji se vyskytuje u starších lidí na kůži hlavy a krku, chronicky vystavené destruktivnímu působení slunečního záření (SITUM *et al.*, 2010). Na počátku se jedná o drobnou, pomalu rostoucí tmavou plochu, která může mít mapovitou nepravidelnou pigmentaci. Pomalu se vyvíjí a může dosáhnout velkých rozměrů a postihnout celou tvář včetně víček a spojivek. Při včasném zachycení je lentigo maligna možno vyléčit chirurgickým odstraněním. Při nedostatečné excizi může dojít k recidivě choroby, avšak nedochází zde k tvorbě metastáz. Po přechodu na lentigo maligna melanom dochází ke vzniku invazivních uzlů v kterémkoli místě původně plošného ložiska a nárůstu agresivity nádoru včetně schopnosti metastázování. Vzhledem k velikosti, kterou mohou ložiska dosahovat, je chirurgické odstranění melanomu složité a často i nemožné. Často se tedy přistupuje k odstranění co největší části nádoru a ozařování zbylých partií a dalším léčebným postupům (KLENER, 2002; KRAISOVÁ, 2006).

2.1.4.3.5. Akrolentiginózní melanom (ALM)

Jedná se o zvláštní formu melanomu, která postihuje výlučně plosky, dlaně a subunguální oblast prstů a není tedy předpokládáno spojení jeho vzniku a UV záření (CHAMBERLAIN a NG, 2009). Tvoří jen 2 – 10% všech melanomů u bělochů, ale až 65 – 75% u černochoů a 30 – 45% u asiátů, u kterých tak představuje nejčastější formu melanomu (MACKIE, 2000; KRAISOVÁ, 2006). V počátcích se jeví jako plošné ložisko nepravidelných okrajů i pigmentace. Dosahuje výrazné tloušťky, protože velmi

agresivně invaduje do hlubších struktur. Melanomové buňky často pronikají podél vývodů potních žláz hluboko do podkoží (KLENER, 2002; KRAISOVÁ, 2006).

2.1.4.3.6. Desmoplastický melanom

Jedna z vzácnějších forem melanomu vyskytující se nejčastěji v oblasti hlavy, krku a horních partií zad. Počet mužů mezi pacienty je téměř dvojnásobný oproti shodně postiženým ženám (LENS *et al.*, 2005). Vzhledem může připomínat tuhou pigmentovanou jizevnou tkáň. Tvoří tvrdé uzly v podkoží, často bez zjevnějších změn povrchové *epidermis*. U této klinické varianty melanomu jsou pozorovány častější lokální recidivy, což může být způsobeno nedostatečným rozsahem excize (KLENER, 2002; KRAISOVÁ, 2006).

2.1.5. Diagnostika

2.1.5.1. Klinická diagnóza

Vzhledem k faktu, že se jedná ve většině případů o kožní a navíc pigmentovaný útvar, postačuje mnohdy k určení diagnózy melanomu pouhé zrakové vyšetření. Bohužel velmi často dochází vlivem neinformovanosti pacientů či nezkušenosti lékařů k zachycení choroby až v pokročilém stadiu. Pro určení malignity pigmentového ložiska se již od roku 1985 užívá pravidla **ABCD**, označující hlavní klinické rysy typické pro počínající melanomové nádorové bujení (FRIEDMAN *et al.*, 1985):

A (Asymmetry) – nepravidelný tvar

B (Borderline) – nepravidelné, cípaté okraje s výběžky a zářezy

C (Colour) – skvrnitá barva

D (Diameter) – průměr nad 6 mm

Ne vždy však melanomové ložisko splňuje všechny parametry. K vyslovení podezření na počínající melanom je většinou nutné splnění tří až čtyř. Velmi vzácně nevykazuje nádor ani jednu z udaných charakteristik. Pro zpřesnění diagnostiky byl proto navržen a později přidán ještě jeden ukazatel, **E** (ABBASI *et al.*, 2004):

E (Evolving) – průběžný vývoj (trvalé zvětšování, změna tvaru a okrajů, měnící se barva, změna povrchu od vyhlazené po šupinatou, svědění, přechod z horizontálního do vertikálního růstu, později ulcerace, krvácení a mokvání).

2.1.5.2. Dermatoskopie

K diagnostickým účelům je v dnešní době již téměř rutinně využívána klasická či počítačová dermatoskopie neboli epiluminiscenční světelná mikroskopie či také povrchová kožní mikroskopie. Jedná se o neinvazivní metodu zobrazující pigmentové struktury nacházející se v *epidermis* i horních partiích *dermis*. Pro vyšetření se používá osvětlená 10 – 20x zvětšující lupa, která umožňuje pozorovat změny ve struktuře, barvě a cévním zásobení pigmentového ložiska. Dermatoskopické obrazy se mohou v důsledku odlišného kožního reliéfu lišit v závislosti na lokalizaci léze na těle (KRAISOVÁ, 2006).

Pro zpřesnění dermatoskopické diagnostiky byla zavedena metoda **7 FFM**, z anglického Seven Features for Melanoma, tj. sedm dermatoskopických rysů melanomu (DAL POZZO *et al.*, 1999).

2.1.5.3. Histologie

V poslední době je velmi často přistupováno k excizi léze (viz kapitola 2.1.7.1.) a jejímu histologickému vyšetření, kde je z komplexního zhodnocení architektonických a buněčných rysů tumoru určeno, zda se jedná o nález maligní či benigní (KRAISOVÁ, 2006). Histologické řezy jsou barveny klasickým postupem pomocí hematoxylinu a eosinu. Při takovémto histologickém vyšetření je u melanomu stanovována řada základních histopatologických parametrů:

- histologický subtyp nádoru (viz kapitola 2.1.4.)
- tloušťka nádoru v milimetrech, nejlépe na 2 desetinná místa
- přítomnost či nepřítomnost ulcerace na povrchu nádoru
- hloubka invaze
- přítomnost či nepřítomnost vertikální fáze růstu
- přítomnost či nepřítomnost lymfocytárního infiltrátu ve spodině a v okolí nádoru
- mitotický index (počet mitóz na 1 mm²)
- přítomnost či nepřítomnost intravaskulárního a intralymfatického šíření
- přítomnost mikroskopických satelitů
- přítomnost či nepřítomnost ložisek regrese
- přítomnost zbytků névových struktur

Z těchto prognosticky významných údajů je možné odhadnout další chování nádoru a stanovit vhodnou léčbu (KRAISOVÁ, 2006).

2.1.5.3.1. Tloušťka nádoru v mm podle Breslowa

Ke stanovení tloušťky nádoru se používá okulární mikrometr. Určení tohoto nejdůležitějšího prognostického faktoru, zavedeného roku 1970 BRESLOWEM, má velký význam pro určení postupu léčby a pro predikci dalšího chování nádoru. Čím vyšší hodnoty Breslowův index dosahuje, tím horší je prognóza onemocnění. Zatímco u nádoru o tloušťce 1 mm dosahuje desetileté přežití 85%, u 3 mm už je to jenom 58% a u 5 a více mm dokonce pouhých 20% (KRAISOVÁ, 2006).

2.1.5.3.2. Ulcerace

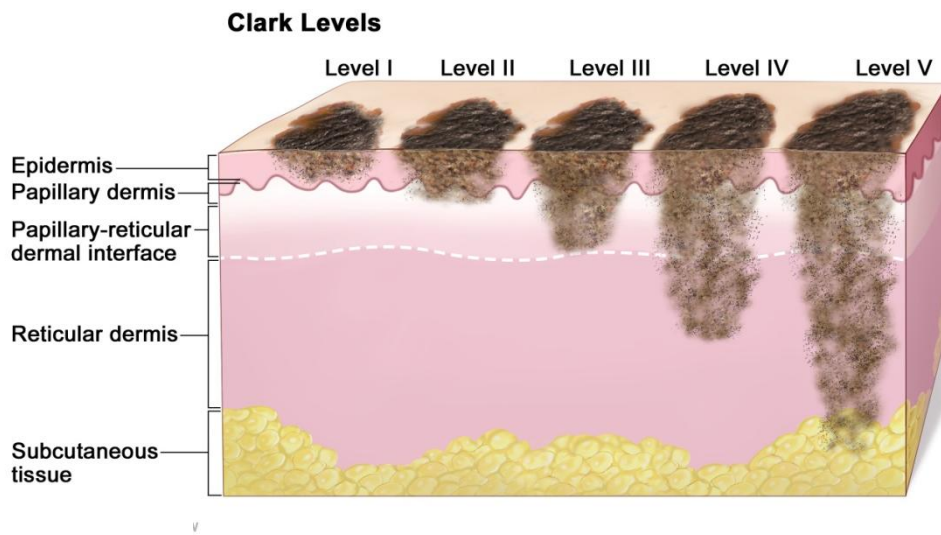
Ulcerace je označení pro spontánně vytvořené porušení vrchních vrstev nádoru, které prostupuje celou úrovní *epidermis* a značně zhoršuje prognózu choroby. Projevuje se povrchovým krvácením a mokváním ložiska. K ulceraci často dochází u nádorů s hodnotou Breslowova indexu nad 4 mm (60%) a u rychle rostoucích melanomů či tumorů s výraznou angiogenezí a lymfangiogenezí. Ulcerované tumory také pravděpodobněji tvoří metastázy a výrazně se též zkracuje celkové přežití nemocných (KRAISOVÁ, 2006). Ulcerace je hned po Breslowově tloušťce nádoru druhým nejvýznamnějším predikčním faktorem určujícím přežití pacienta (BALCH et al., 2001).

2.1.5.3.3. Hloubka invaze podle Clarka

V roce 1969 definoval CLARK 5 úrovní hloubky invaze podle histologických vrstev kůže a popsal závislost mezi pronikáním melanomu do *koria* a průběhem onemocnění (CLARK *et al.*, 1969). Čím hlouběji nádorové buňky pronikají, tím horší prognóza je s tímto jevem spojena. Clarkovo hodnocení je značně subjektivní a obtížněji hodnotitelné a reprodukovatelné než systém Breslowův a nemá proto také takovou váhu (KLENER, 2002).

Hladiny invaze podle Clarka (viz obr. 2.4.):

- I – nádorové buňky pouze v úrovni *epidermis* (melanom *in situ*)
- II – nádorové buňky prostupují do horních partií *stratum papillare*
- III – nádorové buňky vyplňují celé *stratum papillare*
- IV – nádorové buňky se šíří do *stratum reticulare*
- V – nádorové buňky pronikají až do podkožního tuku



Obr. 2.4.: Pět úrovní hloubky invaze podle Clarka. Převzato z <http://www.qualityoflife.org/cancer/patientinfo/list/summary/?id=CDR62713>

2.1.5.3.4. Fáze nádorového růstu

Koncept 2 základních fází růstu maligního melanomu, a to radiální (horizontální) a vertikální, se datuje už do roku 1969 (CLARK *et al.*, 1969).

- **Radiální fáze růstu**

Pouze radiálně se šíří všechny melanomy s hodnotou Clark I, tedy melanomy *in situ* zasahující pouze epidermální vrstvu kůže, a melanomy s hodnotou Clark II, který sice již zasáhl horní partii *stratum papillare*, ale dále se šíří pouze v horizontální rovině (KRAISOVÁ, 2006).

- **Vertikální fáze růstu**

Tato fáze růstu je charakterizována pronikáním nádorových buněk do hlubších vrstev kůže a do podkoží. V Clarkově hodnocení hovoříme o melanomech dosahujících úrovně invaze III – V (CLARK *et al.*, 1989). Nádory nacházející se ve vertikální fázi růstu vykazují mnohem agresivnější chování a mnohem častěji u nich dochází k tvorbě metastáz (KRAISOVÁ, 2006).

2.1.5.3.5. Přítomnost lymfocytárního infiltrátu

Tumor-infiltrující lymfocyty (TIL), tedy takové, které rozpoznávají nádorové antigeny a mají schopnost zničit nádorové buňky jsou považovány za důkaz reakce imunitního systému na nádor (TAYLOR *et al.*, 2007). Melanomové tumor-infiltrující lymfocyty jsou vysoce imunofenotypicky i funkčně heterogenní skupinou buněk. Jejich funkce často bývají oslabeny následkem nahromadění imunoregulačních buněk a vlivem různých nádorových únikových mechanismů (OBLE *et al.*, 2009).

Zatímco o existenci TIL už dnes není pochyb, jejich vliv na vývoj choroby nadále zůstává otevřenou otázkou, protože výsledky studií jsou značně nejednotné a mnohdy si dokonce protirečí. Dalším sporným bodem týkajícím se těchto lymfocytů je jejich prognostický význam. Srovnání výsledků jednotlivých studií je totiž velmi obtížné vlivem nejednotnosti přístupu různých výzkumných skupin ke zhodnocení lymfocytárního infiltrátu (BUSAM *et al.*, 2001). Podle některých pozorování (např. TAYLOR *et al.*, 2007) koreluje TIL statut léze s tloušťkou nádoru podle Breslowa a hladinou invaze podle Clarka. Tumory s nálezem TIL se podle výsledků této studie vyznačovali menší tloušťkou a hloubkou invaze. Absence TIL byla též spojena s vyšší pravděpodobností pozitivního nálezu při biopsii sentinelové uzliny. Studie CLEMENTE *et al.* (1996) prokázala, že pokud jsou kategorie TIL striktně definovány, mají skutečně velkou prediktivní hodnotu u primárních melanomů ve vertikální fázi růstu, a potvrdila tak předchozí pozorování CLARKA *et al.* (1989). Na základě výsledků získaných při studii provedené na 293 vzorcích, předpokládají RAO *et al.* (2010), že přítomnost TIL by mohla být považována za jeden z pozitivních faktorů při určování prognózy onemocnění.

Přestože vyšší frekvence TIL bývá často spojována s lepší prognózou melanomu (OBLE *et al.*, 2009), ne všechny studie přinesly takovéto výsledky (např. BARNHILL *et al.*, 1996) a z toho je patrné, že je nezbytně nutné shromáždit nejdříve co největší množství dat týkajících se složení a funkce TIL infiltrátů, než bude moci být vysloven definitivní závěr o prognostickém významu TIL.

Zatímco jejich prognostický přínos tedy prozatím zůstává sporným, samotná existence lymfocytů rozpoznávajících a cíleně ničících nádorové buňky přivedla vědce na myšlenku využít TIL v nádorové terapii. Lymfocyty specificky rozpoznávající nádorové antigeny totiž bývají často vlivem specifického mikroprostředí nádoru utlumeny a neschopny reakce. Cílem léčby (založené např. na adoptivním transferu TIL) je nějakým způsobem překonat tuto supresi, aktivovat anergizované buňky a

navodit tak dostatečnou imunitní odpověď proti dosud tolerovanému tumoru (viz kapitola 2.1.6.3.7.).

2.1.5.3.6. Mitózy

Jedním z důležitých negativních prognostických ukazatelů je i mitotická aktivita nádorových buněk (BARNHILL et al., 2005). Počet mitóz na mm^2 v dermální části tumoru udává tzv. mitotický index. Mitotické figury v *dermis* indikují vertikální fázi růstu tumoru a s narůstajícím mitotickým indexem klesá pravděpodobnost přežití pacienta (CLARK et al., 1989). Jako vysoký mitotický index je označováno 6 mitóz na 1 mm^2 (KRAISOVÁ, 2006).

2.1.5.3.7. Spontánní regrese

Jako spontánní regresi označujeme proces, při kterém dochází k částečnému nebo úplnému vymizení primárního nádoru nebo metastáz bez aplikace léčby, která by byla za regresi zodpovědná (KRAISOVÁ, 2006). Spontánní regrese maligních i benigních melanocytických lézí může být považována za zjevný důkaz činnosti imunitního dozoru. Předpokládaná specifická reakce T-lymfocytů proti melanocytům a jejich maligně transformovaným protějškům, tedy melanomovým buňkám, vede k různému stupni destrukce těchto pigmentových buněk. Regrese byla pozorována ve všech stádiích progresu choroby (SPEECKAERT et al., 2011). Je obvyklejší u pacientů pokročilejšího věku, u mladých lidí je extrémně vzácná. Histologická regrese je pozorována až u 10 – 35% melanomů, především malé tloušťky (REQUENA et al., 2009).

V časných fázích regrese infiltrují tumor lymfocyty, makrofágy a Langerhansovy buňky (BLESSING a McCLAREN, 1992). Melanom v regresi se vyznačuje zvýšeným podílem $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ a také zvýšenou expresí IL-2 receptoru na T-buňkách (TEFANY et al., 1991). V průběhu regrese jsou buňky tumoru v papilární *dermis* a přilehlé *epidermis* redukovány či dokonce zcela nahrazeny lymfocyty, melanofágy a fibrózou. Často je možné na bázi epidermálních výběžků objevit nekrotické melanocyty nebo keratinocyty ve formě malých okrouhlých eosinofilních tělísek, tzv. Civatte bodies. Pozdní fáze procesu je charakterizována výraznou oblastí regrese tumoru nebo někdy i kompletním vymizením melanomu. *Dermis* je postupně nahrazována fibrotickým *stroma*, hlavně v centru tumoru. (REQUENA et al., 2009). Regrese je vyvolána cytotoxickou reakcí imunitního systému pacienta proti nádorovým

buňkám (TEFANY *et al.*, 1991; KRAISOVÁ, 2006). Bohužel část nádorově transformovaných buněk může uniknout rozpoznání imunitním systémem a pokračovat ve svém bujení (SPEECKAERT *et al.*, 2011). Tato skutečnost je taky jedním z možných vysvětlení horší prognózy rozsáhlých regresí melanomu. Zbytky nádoru po částečné regresi jsou tvořeny oblastmi, které unikly dozoru a jsou tedy rezistentní k dalším útokům imunity (SPEECKAERT *et al.*, 2011). Částečná regrese melanomu může být příkladem vícestupňového procesu úniku imunitnímu systému a naznačuje důležitost zacílení několika klíčových molekul k ustavení účinné protinádorové imunity. Mechanismus aktivující útok imunitního systému na melanom však není dosud zcela objasněn (KRAISOVÁ, 2006).

Prognostický význam regrese je často řešené téma (REQUENA *et al.*, 2009), nicméně stejně jako v případě lymfocytárního infiltrátu (viz kapitola 2.1.5.3.5.) zatím není zcela jednoznačně jasné, zda je spontánní regrese pozitivním či negativním prognostickým faktorem, protože výsledky studií jsou často protichůdné.

Hromadící se důkazy poukazují na skutečnost, že nádorové buňky vychylují imunitní systém do stavu imunoprese a vlastní mechanismy, díky kterým unikají účinné imunitní odpovědi. Tumory jsou zřejmě vlivem různých faktorů schopny verbovat a stimulovat regulační T-buňky (Tregs; MARIGO *et al.*, 2008; FUJIMURA *et al.*, 2010), které se tak v jejich mikroprostředí vyskytují v hojném počtu. Tyto buňky jsou velmi důležité nejen pro kontrolu autoimunity za fyziologických podmínek, ale zdá se, že také suprimují cytotoxickou odpověď proti nádorovým autoantigenům zprostředkovanou T-buňkami. Především pomocí mezibuněčného kontaktu potlačují nejen proliferaci infiltrujících CD4⁺ i CD8⁺ T-lymfocytů ale i produkci cytokinů. Tato jejich role by mohla být jedním z možných vysvětlení pro nedostatečnou klinickou účinnost imunoterapeutických léčebných protokolů (VIGUIER *et al.*, 2004). Na komplexní imunoregulační síti se nejspíš podílí i další buňky imunitního systému ovlivněné nádorem, jako např. supresorové buňky myeloidní řady, makrofágy asociované s nádorem nebo dysfunkční nezralé dendritické buňky (MARIGO *et al.*, 2008; FUJIMURA *et al.*, 2010). Nádory mohou taktéž exprimovat řadu imunomodulačních proteinů. Například zvýšená exprese ligandu programované smrti-1 (PD-L1), a v menší míře i ligandu programované smrti-2 (PD-L2), vede k vazbě těchto ligandů k receptorům na povrchu T- a B-lymfocytů a tím k inhibici antigen-receptorové signalizace směřující k proliferaci lymfocytů a sekreci cytokinů (FREEMAN *et al.*, 2000). S progresí choroby je spojena i ztráta MHC-I v metastázách (CHANG *et al.*,

2005). Melanomové buňky vykazují též schopnost exprimovat MHC-II, ale díky časté absenci kostimulačních signálů (CD80, CD86) nutných k plné aktivaci T-buněk dochází k vyvolání tolerance (BECKER a BRÖCKER, 1995). Povrchová exprese neklasické MHC-I molekuly HLA-G dokáže melanomové buňky ochránit před útokem NK-buněk (PAUL *et al.*, 1998). Exprese a sekrece Fas ligandu zase vede k apoptóze imunitních buněk nesoucích na svém povrchu odpovídající receptor (ANDREOLA *et al.*, 2002).

2.1.5.3.8. S melanomem-asociovaná depigmentace

Dalším fenoménem spojeným s melanomem je MAD neboli s melanomem-asociovaná depigmentace, ke které může docházet spontánně nebo může být vyvolána aplikovanou terapií (SPEECKAERT *et al.*, 2011).

Klinicky a histologicky se MAD podobá klasickému *vitiligo*, přestože je možné nalézt i určité rozdíly. Distribuce je často asymetrická a velmi často dochází k lokalizaci na obličeji, krku, horní části hrudníku a především končetinách. Podobně jako *vitiligo* postihuje MAD pouze určité části těla a důvod, proč tomu tak je a proč jsou atakovány pouze některé oblasti a jiné ne, zůstává otevřenou otázkou. Incidence vitiligo-podobné depigmentace je u pacientů s melanomem 7–10x vyšší než u normální populace. Průměrný věk, ve kterém dochází k propuknutí MAD, je rovněž vyšší než u *vitiligo vulgaris* (QUAGLINO *et al.*, 2010; SPEECKAERT *et al.*, 2011). Předpokládá se, že kombinace melanomu a vitiligo-podobné depigmentace je důsledkem imunitní reakce proti antigenům sdíleným normálními melanocyty a melanomovými buňkami a že MAD tedy odráží protinádorovou imunitní odpověď. Patogenní proces pravděpodobně spočívá v imunitní odpovědi zprostředkované T-buňkami, která je zacílena proti melanocytickým/melanomovým diferenciačním antigenům (např. MART-1, tyrozináza, gp100, TYRP-1 a TYRP-2) a vede k destrukci melanocytů a vzniku depigmentovaných oblastí (BOASBERG *et al.*, 2006).

2.1.5.4. Imunohistochemie

V současné době neustále narůstá počet identifikovaných molekulárních markerů spojených s patogenezí melanomu, což s sebou přináší možnost přesnějšího stanovení diagnózy a prognózy. Nedávno získaná data, jež jsou výsledkem rozsáhlých analýz genové exprese a proteomu nádorových buněk, odhalila další nové molekuly, které by mohly být zapojené do patogeneze melanomu. Jejich přesná účast na tumorigenezi je intenzivně zkoumána a ověřována (UGURUEL *et al.*, 2009). Tento

neustále probíhající proces má za následek rychle se měnící pohled na molekulární stránku choroby a zdá se, že by mohl přinést pokrok nejen v oblastech diagnózy a prognózy, ale také léčby, kde je tak zoufale potřeba.

Při využití biomarkerů pro potřeby prognostiky je situace poněkud komplikována faktem, že transformace benigních melanocytů v maligní melanomové buňky je výsledkem řady genetických změn. Potencionálních markerových molekul je tedy celá řada, přičemž jejich diagnostický a prognostický význam není vždy zcela jednoznačný. Přehled molekul je uveden v tabulce 2.2. Je možné, že v budoucnu bude k určení prognózy používáno více markerů nejen z tohoto seznamu (UGURUEL *et al.*, 2009).

V současné klinické praxi je nejpoužitelnější značení melanomových diferenciacních markerů pomocí protilátek. Nejvíce vyšetřovaných melanomů je diagnostikováno pomocí kombinace nejcitlivějšího markeru S-100 s jedním či několika specifitějšími markery jako je Melan-A/Mart-1, tyrozináza nebo gp100. Tyto proteiny jsou dostačující k odlišení melanomu od jiných typů nemelanocytických tumorů. K odlišení benigních névů od melanomu je běžně používán Ki-67, který slouží i jako pomůcka při stanovení prognózy (OHSIE *et al.*, 2008).

	Association With Impaired Prognosis	References
Melanocyte Lineage/Differentiation Antigens gp100 / HMB45	increased expression	Niezabitowski et al ²
Tumor Suppressors/Oncogenes/Signal Transducers AP-2 (activator protein-2 alpha) transcription factor bcl-6 c-Kit c-met c-myc CYLD EGFR (epidermal growth factor receptor) ERK (extracellular signal-regulated kinase) HER3 HDM2 (human homologue of murine mdm2) ING3 MITF (microphthalmia-associated transcription factor) p16 ^{INK4A} p-Akt (activated serine-threonine protein kinase B) pRb (retinoblastoma protein) PTEN	loss of nuclear AP-2 expression expression expression expression increased expression decreased expression increased expression absence of cytoplasmic ERK activation increased expression increased expression decreased nuclear expression gene amplification decreased expression increased expression inactivation due to protein phosphorylation decreased expression	Berger et al ³ Alonso et al ⁴ Janku et al ⁵ Cruz et al ⁶ Kraehn et al ⁷ Massoumi et al ⁸ Udart et al ⁹ Jovanovic et al ¹⁰ Reschke et al ¹¹ Polsky et al ¹² Wang et al ¹³ Ugurel et al ¹⁴ Mihic-Probst et al ¹⁵ Alonso et al ⁴ Dai et al ¹⁶ Roesch et al ¹⁷ Mikhail et al ¹⁸
Cell Cycle Associated Proteins cyclin A, B, D, E geminin Ki67 (detected by Mib1) p21 ^{CP1} PCNA (proliferating cell nuclear antigen)	increased expression increased expression increased expression decreased expression increased expression	Flórenes et al ¹⁹ Flórenes et al ²⁰ Winnepenninckx et al ²¹ Gimotty et al ²² Alonso et al ⁴ Ostmeier et al ²³ Alonso et al ⁴ Winnepenninckx et al ²¹
Regulators of Apoptosis APAF-1 (apoptotic protease activating factor-1) bak bax bcl-2 survivin	decreased expression decreased expression decreased expression increased expression increased expression	Fujimoto et al ²⁴ Fecker et al ²⁵ Fecker et al ²⁵ Tas et al ²⁶ Tas et al ²⁶
Molecules Involved in Angiogenesis LYVE-1 (lymphatic vascular endothelial hyaluronan receptor-1) PTN (pleiotrophin)	increased expression increased expression	Dadras et al ²⁷ Wu et al ²⁸
Molecules Involved in Cell Adhesion and Motility beta-catenin CEACAM1 (carcinoembryonic antigen-related cell-adhesion molecule 1) dysadherin E-cadherin integrins beta-1 and beta-3 MMPs (matrix metalloproteinases) osteonectin (also termed BM40 or SPARC [secreted protein, acidic and rich in cysteine]) P-cadherin	loss of nuclear staining increased expression increased expression decreased expression increased expression increased expression increased expression strong cytoplasmic expression	Bachmann et al ²⁹ Thies et al ³⁰ Nishizawa et al ³¹ Andersen et al ³² Saalbach et al ³³ Redondo et al ³⁴ Massi et al ³⁵ Bachmann et al ²⁹
Immunoregulators HLA allele frequency	specific expression	Luongo et al ³⁶ Ostmeier et al ²³
Others ALCAM/CD166 (Activated leukocyte cell adhesion molecule) CXCR4 receptor melastatin metallothionein osteopontin TA (telomerase activity)	increased expression increased expression decreased expression increased expression increased expression increased expression	Swart et al ³⁷ Scala et al ³⁸ Duncan et al ³⁹ Weinlich et al ⁴⁰ Rangel et al ⁴¹ Carvalho et al ⁴²

Modified from Utikal J, Schadendorf D, Ugurel S. Serologic and immunohistochemical prognostic biomarkers of cutaneous malignancies. *Arch Dermatol Res.* 2007;298(10):469-477. Copyright 2007. With kind permission of Springer Science+Business Media.

Tabulka 2.2.: Imunohistochemické markery maligného melanomu spojené se zhoršenou prognózou choroby. Převzato z UGURUEL et al. (2009).

2.1.5.4.1. Protein S-100

S-100 je vápník-vazebný protein, jehož název je odvozen ze 100% solubility v saturovaném roztoku síranu amonného při neutrálním pH. Jedná se o dimer (homo i hetero) podjednotek α a β , účastníci se skládání a rozpadu mikrotubulů. Rovněž je schopen interagovat s onkosupresorovým genem p53 v závislosti na koncentraci Ca^{2+} (UGUREL et al., 2009). Podjednotka β je produkována nejen buňkami nervového systému, odkud byl tento protein původně izolován, ale i buňkami melanocytické řady (UTIKAL et al., 2007). Dnes je běžně používána jako citlivý marker melanomu, ale i některých dalších nádorů. U melanomových buněk je přítomna v jádře a cytoplasmě a citlivost jejího průkazu dosahuje 97 – 100%. Nicméně specifita S-100 pro melanocytické léze je omezená, protože je exprimován i astrocyty, Schwannovými, dendritickými, podpůrnými a myoepiteliálními buňkami, adipocyty, chondrocyty, Langerhansovými buňkami a nádory od nich odvozenými (MCNUTT, 1998; OHSIE et al., 2008). Udávaná specifita S-100 se pohybuje mezi 75 – 87%.

2.1.5.4.2. gp100/HMB45

HMB45, monoklonální protilátka proti cytoplazmatickému premelanozomálnímu glykoproteinu gp100, byla jedním z prvních objevených melanom-specifických markerů (GOWN et al., 1986). Zkratka HMB je odvozena z anglického Human Melanoma Black. Nedosahuje takové citlivosti jako S-100, ale vykazuje vyšší specifitu. V pozitivních buňkách je HMB45 lokalizován v cytoplasmě, protože reaguje s oligosacharidovým postranním řetězcem glykokonjugátu přítomného na nezralých melanozómech. Mnoho melanocytů přítomných v kůži či benigním névu je imunoreaktivní s HMB45 (BUSAM, 2004). Zaznamenaná senzitivita pro melanom se pohybuje mezi 69% a 93%. Maximální produkce byla pozorována u vzorků primárních melanomů (77 – 100%) a menší v metastázách (58 – 83%).

2.1.5.4.3. MART-1/Melan-A

MART-1, tj. melanomový antigen rozpoznávaný T-buňkami-1, a Melan-A jsou synonyma označující glykoprotein melanozomální diference rozpoznaný cytotoxickými T-lymfocyty. Gen Mart-1/Melan-A byl poprvé naklonován dvěma na sobě nezávislými výzkumnými skupinami, KAWAKAMI *et al.* (1994) a COULIE *et al.* (1994). K dispozici jsou v dnešní době protilátky proti tomuto proteinu a to klon M2-7C10, připravený proti MART-1 (MARINCOLA *et al.*, 1996), a klon A103, kde při

vývoji sloužil jako antigen klonovaný gen Melan-A (CHEN *et al.*, 1996). Tyto protilátky vykazující senzitivitu 75 – 92% a specifitu pro melanom 95 – 100%, a proto se používají nejen k prokázání melanomu ale i k odlišení od nádorů jiného původu (OHSIE *et al.*, 2008).

2.1.5.4.4. Tyrozináza

Tyrozináza je enzym katalyzující hydroxylaci tyrozinu v prvním kroku syntézy melaninu. Exprese tyrozinázy je omezena na melanocyty s výjimkou pigmentovaných schwannomů a nádorů perivaskulárních epiteliálních buněk (BUSAM, 2004). Pozitivní značení melanomu je granulární, lokalizované v cytoplazmě. Citlivost protilátky pro melanom je s 84 – 94% trochu lepší než HMB45 a klesá se zvyšujícím se klinickým stadiem choroby u metastatických lézí. Specifita dosahuje 97 – 100% (OHSIE *et al.*, 2008). Tyrozináza je nejen výborným markerem kožní melanocytické proliferace, ale zároveň se ukázala být užitečnou diagnostickou pomůckou i pro slizniční nádory (PRASAD *et al.*, 2001).

2.1.5.4.5. Ki-67

Proliferační marker Ki-67 je jaderný antigen přítomný ve všech aktivních fázích buněčného cyklu (G1, S, G2 a M), ale ne v klidové fázi G0. Lze ho tedy využít k detekci melanomu, který má na rozdíl od benigních névů vysokou proliferaci nejen v povrchových, ale i v hlubších strukturách (OHSIE *et al.*, 2008). Podle studie GIMOTTI *et al.* (2005) by tedy mohl sloužit jako alternativní prognostický biomarker k mitotického indexu (viz kapitola 2.1.5.3.6). Ki-67 pozitivita dosahuje <5% u benigního névu, oproti tomu u maligního melanomu je pozitivních 13 – 30% buněk, ačkoli v některé ojedinělých případech byla zaznamenána až 100% jaderná pozitivita. Použití Ki-67 jakožto prognostického markeru u maligního melanomu přináší rozporuplné výsledky. Z některých studií vyplývá nezávislá pozitivní korelace Ki-67 pozitivitou a metastatickým potenciálem a mortalitou pouze u melanomů s vysokou tloušťkou. Jiné výzkumy nacházejí tuto korelaci pouze u slabých melanomů. Mnoho studií prokázalo nárůst míry relapsu a mortality, který přímo koreluje s nárůstem positivity na Ki-67, nicméně z jiných plyne, že tato korelace není nezávislá na Breslowově tloušťce tumoru (OHSIE *et al.*, 2008).

2.1.5.5. Sérologie

Melanom je vysoce antigenní a metabolicky aktivní nádor, který do tělního oběhu uvolňuje řadu sloučenin, ať už se jedná o antigeny, cytokiny či enzymy. V krevním oběhu mohou být taktéž detekovány cirkulující nádorové buňky. Stejně tak po destrukci nádorové buňky mohou být do tělních tekutin uvolňovány různé detekovatelné látky. Existuje několik sérových markerů, které mohou být užitečné v diagnostice melanomu (viz tabulka 2.3.). V několika evropských státech jsou často, až téměř rutinně, k časné detekci recidivy onemocnění či metastazování během léčby pacientů používány proteiny S-100 (viz kapitola 2.1.5.4.1.) a MIA, autokrinní růstový faktor sekretovaný řadou nádorových buněk včetně melanomových (BOSSERHOFF a BUETTNER, 2002).

	Serologic Marker	References
Melanocyte lineage/differentiation antigens	S100-beta	Guo et al ⁴⁷ Schultz et al ⁴⁸ Hauschild et al ⁴⁹ Krähn et al ⁵⁰ Garbe et al ⁵¹
MIA (melanoma inhibitory activity)		Bogdahn et al ⁵² Blesch et al ⁵³ Stahlecker et al ⁵⁴ Garbe et al ⁵¹
Tyrosinase		Agrup et al ⁵⁵
5-S-cysteinyldopa		Wimmer et al ⁵⁶
L-Dopa/L-tyrosin		Stoitchkov et al ⁵⁷
Proangiogenic factors	VEGF (vascular endothelial growth factor) bFGF (basic fibroblast growth factor) IL-8 (interleukin-8)	Ugurel et al ⁵⁸ Ugurel et al ⁵⁸ Ugurel et al ⁵⁸
Molecules involved in cell adhesion and motility	sICAM-1 (soluble intracellular adhesion molecule 1) sVCAM (soluble vascular cell adhesion molecule 1) matrix metalloproteinases (MMP)-1 and -9 Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-1 and -2)	Hirai et al ⁵⁹ Vuoristo et al ⁶⁰ Franzke et al ⁶¹ Vuoristo et al ⁶⁰ Nikkola et al ⁶² Yoshino et al ⁶³
Cytokines and cytokine receptors	IL-6 (interleukin-6) IL-10 (interleukin-10)	Mouawad et al ⁶⁴ Dummer et al ⁶⁵ Nemunaitis et al ⁶⁶
HLA molecules	sIL-2R (soluble interleukin-2-receptor) sHLA-DR (soluble HLA-DR) sHLA-class I (soluble HLA-class I)	Boyano et al ⁶⁷ Rebmann et al ⁶⁸ Westhoff et al ⁶⁹
Others	LDH (lactate dehydrogenase) CRP (C-reactive protein) albumin TuM2-PK (tumor pyruvate kinase type M2) CD95 (sFas/CD95) YKL-40 CYT-MAA (cytoplasmic melanoma-associated antigen) HMW-MAA (high-molecular-weight melanoma-associated antigen) human endogenous retrovirus K	Sirott et al ⁷⁰ Deichmann et al ⁷¹ Sirott et al ⁷⁰ Ugurel et al ⁷² Ugurel et al ⁷³ Schmidt et al ⁷⁴ Schmidt et al ⁷⁵ Vergilis et al ⁷⁶ Hahn et al ⁷⁷

Modified from Utikal J, Schadendorf D, Ugurel S. Serologic and immunohistochemical prognostic biomarkers of cutaneous malignancies. *Arch Dermatol Res.* 2007;298(10):469-477. Copyright 2007. With kind permission of Springer Science+Business Media.

Tabulka 2.3.: Sérologické markery maligního melanomu. Převzato z UGURUEL et al. (2009)

2.1.6. Terapie

Díky neustálému prohlubování vědomostí týkajících se molekulárních mechanismů zapojených do komplikované patogeneze melanomu a její regulace dochází i k cílenému vývoji nových terapeutických přístupů a optimalizaci a zdokonalování těch stávajících. Bohužel ale ještě nebyl objeven postup, který by byl aplikovatelný na všechny pacienty ve všech stadiích progresu choroby a jehož účinek by byl kurativní ve 100% případů. Tato skutečnost je ovšem naprosto pochopitelná pokud vezmeme v úvahu individuální charakter každého jednoho tumoru. Odlišnosti je totiž možné nalézt nejen mezi jednotlivými případy maligního melanomu, ale i v rámci samotného ložiska, které je představováno poměrně heterogenní skupinou transformovaných buněk. Navíc značná agresivita melanomu vyžaduje léčbu velmi radikální, která sice může vést k prodloužení přežití pacienta, ale mnohdy se neobejde bez vyvolání závažných vedlejších účinků. Proto je hlavním cílem řady výzkumných skupin vyvinout nejen účinnou a přesně cílenou, ale vedle toho i dobře snášenou léčbu s minimem negativních efektů, které by nevedla k výraznému snížení kvality života pacientů. Pole této oblasti výzkumu je však tak nesmírně široké, že obsáhnout toto obrovské množství různých, v minulé i současné době testovaných, přístupů a preparátů není v daném přiměřeném rozsahu práce možné. Nicméně jsou zde rozebrány způsoby léčby, které byly ve své době pokrokové a určitou měrou přispěly k dalšímu vývoji léčby. Dále tu budou zmíněny přístupy, které jsou široce testovány v poslední době a mohli bychom je označit za nejslibnější.

V případě maligního melanomu je léčbou první volby, pokud to okolnosti dovolují, chirurgická excize ložiska. Dále je možné přistoupit k různým druhům adjuvantní terapie. Nejčastěji je využívána chemoterapie, imunoterapie či jejich kombinace.

2.1.6.1. Chirurgická terapie maligního melanomu

Jedinou účinnou léčebnou metodou je v současné době včasné chirurgické odstranění primárního ložiska spolu s dostatečným ochranným lemlem okolní zdravé tkáně. I u pokročilého stadia choroby, kdy už došlo ke vzniku intrazitních či dokonce vzdálených metastáz, stejně jako při relapsu onemocnění, je možné přistoupit k chirurgickému zákroku, který, přestože by mohl být v konečné fázi progresu nemoci

již považován za zbytečný, může za určitých podmínek prodloužit přežití pacienta (MARKOVIC *et al.*, 2007b; MANSFIELD a MARKOVIC, 2009).

Kromě odstranění primární léze se nezdávka přistupuje také k biopsii sentinelové, tzn. první spádové, uzliny. Tato diagnostická, nikoli terapeutická, metoda postupně nahradila dříve používanou a řadou rizik provázenou elektivní lymfadenektomií, tedy preventivní odstranění regionálních lymfatických uzlin (KLENER *et al.*, 2002; KRAISOVÁ, 2006).

2.1.6.2. Chemoterapie a biochemoterapie

Chemoterapie a biochemoterapie jsou založeny na předpokladu destruktivního účinku cytostatik na dělící se nádorové buňky, která by měla vést k prodloužení období celkového přežití. Aby byl účinek co léčby největší, bývá aplikována společně s imunoterapií. Chemoterapie by měla snížit celkové množství nádorových buněk, což by mělo vést k vyšší citlivosti reziduálního nádoru k účinkům imunoterapie. Opačně např. kaskáda aktivovaná IL-2 zvyšuje cytotoxickou aktivitu některých cytostatik. Aplikační schémata a dávkování terapeutik se mezi jednotlivými klinickými zkouškami různí, avšak společnými rysy bohužel jsou vysoká toxicita, nízká účinnost a tedy i všeobecně neuspokojivé výsledky, které přinášejí. Tato adjuvantní léčba proto není používána příliš často a přistupuje se k ní spíše u vysoce rizikových pacientů III. stadia choroby nebo po odstranění orgánových metastáz (KRAISOVÁ, 2006).

2.1.6.3. Imunoterapie

Melanom je, na rozdíl od mnohých jiných, považován za velmi imunogenní nádor, čehož se snaží využít mnoho výzkumných skupin k vývoji účinné imunoterapie. Exprimuje celou řadu s tumorem-asociovaných antigenů (TAA), které mohou být rozděleny přibližně do 4 skupin (DRANOFF, 2009):

- **nádorové/testikulární antigeny** – např. s melanocyty-asociované antigeny (MAGEs), B melanomový antigen (BAGE), G-antigen (GAGE), antigen New York esophageálního spinocelulárního karcinomu 1 (NY-ESO 1, New York esophageal squamous cell carcinoma)
- **melanocytické diferenciační antigeny** – např. tyrozináza, Melan AMART-1, protein příbuzný tyrozináze 1 a 2 (TYRP-1 and TYRP-2), glykoprotein 100 (gp100)

- **tumor-specifické mutované proteiny** – např. cyklin-dependentní kináza 4, b-catenin, fibronectin)
- **skupina aberantně translatovaných intronových sekvencí** – např. s melanomem-asociovaný mutovaný antigen-1 (MUM-1), p15, N-acetylglukosaminyltransferáza V

Seznam charakterizovaných nádorových antigenů asociovaných s melanomem restringovaných MHC-I a MHC-II se v posledních letech neustále rozrůstá a je dostupný na webové stránce

<http://www.cancerimmunity.org/peptidedatabase/Tcellepitopes.htm> (JANDUS *et al.*, 2009).

Hlavních důvodů, proč je předpokládán úspěch imunoterapie u melanomu, je několik:

- časté parciální i kompletní spontánní regrese primárního nádoru (viz kapitola 2.1.5.3.7.)
- častá přítomnost lymfocytárního infiltrátu na spodině a v okolí nádoru (viz kapitola 2.1.5.3.5.)
- průkaz T-lymfocytů rozpoznávajících melanomové antigeny u nemocných s melanomem (viz kapitola 2.1.5.3.5.)
- tvorba protilátek proti GM 2 gangliosidu (častý malanomový antigen) u pacientů s melanomem
- vzácné, ale popisované, spontánní regrese metastáz melanomu

Výzkum v oblasti imunoterapie melanomu se ve své podstatě zaměřuje především na 4 hlavní cíle a těmi jsou cytokinová terapie, léčba využívající protilátky modulující imunitu, adoptivní T-buněčná terapie a vývoj protinádorových vakcín (SIVENDRAN *et al.*, 2010). Zatímco cytokinová terapie je již poměrně zavedenou léčebnou technikou pro pokročilá stadia melanomu, protilátky modulující imunitu jsou novým trendem v oblasti výzkumu, který se objevil teprve relativně nedávno, a jejichž účinnost je nyní ověřována klinickými testy. Adoptivní T-buněčná terapie vychází z předpokladu, že T-buňky jsou schopny ve vhodných podmínkách zaútočit na tumor a eliminovat ho. Nicméně je zatím obtížné přizpůsobit tuto léčbu pro širší použití. Melanomové vakcíny prozatím zaostávají za očekávanými, která v ně odborníci vkládali. V současnosti jsou testovány různé typy vakcín, alogenní s celými buňkami, autologní buněčné lyzáty, vakcíny peptidové a gangliosidové, DNA vakcíny, vakcíny

s dendritickými buňkami nebo vakcíny s virovými vektory. Důvodů, proč výzkum v této oblasti dosud nepřinesl tolik kýžené pozitivní výsledky, je zřejmě více. Tím hlavním je asi vysoká míra tolerance imunitního systému vůči nádorovým buňkám. Dalšími vlivy, které nelze opomenout a které určitě svou měrou přispívají k prozatímnímu neúspěchu těchto vakcín, jsou jistě i náročnost a nákladnost přípravy takovéto vakcíny (KRAISOVÁ, 2006; SIVENDRAN *et al.*, 2010) a zejména schopnost melanomových buněk ovlivňovat své bezprostřední okolí uvolňováním látek, které suprimují imunitní systém. Tyto látky tlumí antigenní prezentaci na povrchu nádorových buněk, inhibují produkci cytokinů, vyvolávají toleranci T-lymfocytů, inhibují migraci leukocytů z krevního řečiště, vyvolávají rezistenci nádorových buněk k apoptóze, tlumí cytotoxické účinky T-lymfocytů (viz kapitola 2.1.5.3.7.) (KRAISOVÁ, 2006). Proto je hlavním cílem vyvinout imunoterapii natolik účinnou, aby byla schopna překonat všechny tyto nástrahy a cílila reakci imunitního systému správným směrem a to proti již zmíněným konkrétním nádorovým antigenům, a vedla tak ke zničení odolávajících nádorově transformovaných buněk. Rozsáhlou problematikou imunologické terapie maligního melanomu a rozbořením výsledků jednotlivých studií se zabývá nepřeberné množství původních i souborných článků, přehledně shrnujících současný stav poznání (např. KIM *et al.*, 2002; FANG *et al.*, 2008; JANDUS *et al.*, 2009; MANSFIELD a MARKOVIC, 2009; SIVENDRAN *et al.*, 2010 a řada dalších).

2.1.6.3.1. Interferon α (IFN α)

Přesný mechanismus potvrzeného protinádorového účinku IFN α není znám, ale nejspíše je způsoben jeho biologickými aktivitami, mezi které můžeme zařadit stimulaci fagocytózy makrofágů, aktivaci NK buněk, zvýšení exprese HLA antigenů, zvýšení exprese nádorových antigenů, přímý cytotoxický účinek, inhibici růstu nádorových buněk, inhibici angiogeneze, snížení exprese řady onkogenů a snížení syntézy DNA (KRAISOVÁ, 2006). Adujvantní terapie vysokými dávkami IFN je schválena jak americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (US FDA, US Food and Drug Administration), tak i Evropskou agenturou pro léčiva (EMA, European Medicine Evaluation Agency) pro léčbu pacientů po resekci rizikového melanomu (EGGERMONT a GORE, 2007). Pro léčbu melanomu byla v klinických studiích, sledujících vliv IFN α na prodloužení období do relapsu choroby a doby celkového přežití, vyzkoušena řada postupů a různé dávkování IFN α , ale žádná z nich nepotvrdila

výrazný přínos této terapie (LENS a DAWES, 2002). Toxicita léčby je poměrně značná a v závislosti na výši dávky, způsobu aplikace a zdravotním stavu pacienta vyvolává množství nežádoucích účinků různé závažnosti (SIVENDRAN *et al.*, 2010).

2.1.6.3.2. Interleukin-2 (IL-2)

IL-2 je cytokin vykazující výrazný aktivační a proliferační účinek na T- i B-lymfocyty, NK buňky i zabíječe aktivované lymfokinem (LAK) (KRAISOVÁ, 2006). Aplikace vysokých dávek IL-2 byla první imunoterapií schválenou americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (US FDA) (SIVENDRAN *et al.*, 2010). Jednalo se o poměrně efektivní léčbu pokročilého melanomu, díky níž bylo v některých případech dosaženo úplné či alespoň částečné regrese choroby, ale bohužel je toto ošetření doprovázeno vysokou toxicitou, která vedla nejen k vedlejším účinkům (především k hemodynamické nestabilitě), ale dokonce ke smrti několika pacientů (ROSENBERG *et al.*, 1994; ATKINS *et al.*, 1999). Právě pro toxicitu vysokých dávek IL-2 se vědci zaměřili na vývoj nových, lépe tolerovatelných schémat léčby, a na identifikaci pacientů, pro které by tato léčba znamenala největší přínos. Jedním z nedávno vyvinutých přístupů je intratumorální aplikace IL-2 u pacientů s metastazujícím melanomem. Úplná odpověď trvající více než 6 měsíců byla pozorována u 70 % ošetřených metastáz, ale nedošlo k žádné odezvě na viscerální úrovni (WEIDE *et al.*, 2010). V nižších dávkách je IL-2 kombinován s podáváním lymfocytů infiltrujících nádor (TIL) při tzv. adoptivní imunoterapii. Testován je také IL-2 ve spojení s GM-SCF nebo s nádorovými vakcínami (KRAISOVÁ, 2006).

2.1.6.3.3. Faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (GM-SCF)

Jako adjuvancia v léčbě melanomu bylo využito i GM-SCF, ve snaze podpořit lýzu tumoru nábořem monocytů z periferní krve a aktivací cytotoxických makrofágů (MARKOVIC *et al.*, 2007b; SIVENDRAN *et al.*, 2010). Tento cytokin reguluje diferenciaci a proliferaci hematopoetických buněk a ovlivňuje funkce a životnost neutrofilů, makrofágů a dendritických buněk. Dendritické buňky aktivuje zvýšením antigenní prezentace nutné pro imunitní odpověď zprostředkovanou T-buňkami (SIVENDRAN *et al.*, 2010). Zvyšuje oxidační metabolismus, fagocytární schopnosti a protinádorovou cytotoxicitu. Je produkován hematopoetickými a endoteliálními buňkami i některými buňkami nádorovými. V adjuvantní léčbě melanomu se používá jak v monoterapii tak i v kombinaci s dalšími cytokiny (IL-2, IFN) (KRAISOVÁ,

2006). Je využíván k léčbě pacientů s vysokým rizikem recidivy, kteří si nepřejí podstoupit terapii vysokými dávkami IFN α či kteří nemohli být z různých důvodů zařazeni do jiných adjuvantních klinických testů. Analýza výsledků předpokládá možný selektivní přínos pro pacienty IV. stadia choroby, ale ten musí být nejdříve potvrzen randomizovanou zkouškou (MARKOVIC *et al.*, 2007b).

2.1.6.3.4. Imunoregulační protilátky

- **Anti-CTLA-4**

Optimální aktivace T-lymfocytů vyžaduje dvojitou signalizaci prostřednictvím T-buněčného receptoru a receptoru CD28, který je také exprimován na jejich povrchu a který se váže na kostimulační molekuly B7 (např. CD80 nebo CD86) vyskytující se na zralých antigen-prezentujících buňkách. Tato vazba podporuje produkci cytokinů a ovlivňuje další cíle, které indukují progresi buněčného cyklu. V průběhu této aktivace je zvýšena exprese antigenu asociovaného s cytotoxickými T-lymfocyty 4 (CTLA-4, cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4), inhibičního koreceptoru, a dochází ke kompetici mezi ním a CD28 o vazbu s B7. Připojený CTLA-4 vysílá inhibiční signály, díky kterým se snižuje produkce cytokinů (např. IL-2) a průchod buněk buněčným cyklem. Kromě toho je CTLA-4 také konstitutivně exprimován regulačními T-buňkami (FANG *et al.*, 2008; MANSFIELD a MARKOVIC, 2009; SIVENDRAN *et al.*, 2010). Přestože se zdá, že CTLA-4 představuje homeostatický mechanismus omezení nekontrolované lymfoproliferace, taktéž pravděpodobně limituje T-buněčnou odpověď proti melanomu (MANSFIELD a MARKOVIC, 2009). Odhalení účinku CTLA-4 na imunitní odpovědi organismu podnítl směřování dalšího výzkumu na inhibici vazby B7/CTLA-4, která by vedla k podpoře aktivace T-buněk a ke snížení tolerance vůči nádorovým buňkám. Výsledkem jsou plně humanizované monoklonální protilátky **IPILIMUMAB** a **TREMELIMUMAB**. V klinických zkouškách jsou testovány nejen samostatně v různých dávkovacích a imunizačních schématech ale i v různých kombinacích, např. s peptidovými vakcínami proti gp100 či cytokiny (IL-2). Blokáda CTLA-4 má v samostatném podání omezenou efektivitu, ale ve spojení s jinými terapiemi by mohla být prospěšná (MANSFIELD a MARKOVIC, 2009). Léčba je však nezdědka provázena nežádoucími autoimunitními projevy postihujícími nejčastěji kůži a gastrointestinální trakt (FANG *et al.*, 2008).

- **Anti-Programmed-1**

PD-1 (Programmed cell death 1), patří do rodiny koreceptorů CD28 exprimovaných aktivovanými T- a B-buňkami. Váží 2 ligandy, PD-L1 a PD-L2. První z nich se vyskytuje na povrchu T-buněk, B-buněk, makrofágů a dendritických buněk, druhý na dendritických buňkách a aktivovaných makrofázích. Nádory a jejich mikroprostředí taktéž vykazují produkci PD-L1 a proto se zablokování tohoto ligandu stalo jednou ze strategií imunoterapie. V současné době probíhají zkoušky prověřující nejen dávkování a různá schémata podání samotných protilátek proti PD-1, ale i různé kombinace s anti-CTLA-4 či peptidovými vakcínami (SIVENDRAN *et al.*, 2010).

- **Anti-CD137**

CD137 je součástí rodiny receptorů faktoru nekrotizujícího nádory, který slouží jako kostimulační signál T-buňkám a je exprimován na povrchu řady aktivovaných imunitních buněk, jako např. T-buněk, NK buněk, dendritických buněk, eosinofilů a žírných buněk. Připojení ligandu k tomuto receptoru vede ke zvýšení exprese antiapoptotických genů a zabraňuje smrti T-lymfocytů. Protilátky namířené proti CD137 by potenciálně mohly zvýšit odpověď a efektorovou paměť T-buněk (SIVENDRAN *et al.*, 2010).

- **Anti-CD40**

Dalším členem rodiny TNF receptorů je CD40. Tento transmembránový protein je zapojen do imunitní aktivace a apoptózy tumorů. Za normálních okolností je exprimován na povrchu makrofágů, dendritických buněk, B-buněk, krevních destiček a dalších neimunitních buněk. Po spojení s ligandem vyjádřeným na povrchu aktivovaných T-buněk a krevních destiček dochází k signalizaci zánětlivými cytokiny a následné aktivaci T-buněk a nárůstu exprese MHC a kostimulačních molekul. Byly vyvinuty protilátky působící jako agonisté CD40, které jsou testované na různých typech nádorů (SIVENDRAN *et al.*, 2010).

2.1.6.3.5. Agonisté Toll-like receptorů (TLR)

TLR rozpoznávají konzervované molekulární vzorce patogenů, přítomné např. v bakteriální či virové DNA. Jejich stimulace podporuje imunitní systém ve vyvinutí odpovědi prostřednictvím aktivace signálních kaskád vyvolávajících antigenní prezentaci a vypuštění prozánětlivých cytokinů (např. IFN α). Existuje nejméně 10

subtypů TLR. TLR-9 je exprimován plazmacytoidními dendritickými buňkami a B-buňkami a rozpoznává nemethylované CpG motivy bakteriální DNA. Terapeutický potenciál synteticky připravených agonistů TLR-9 je ověřován klinickými zkouškami. První zkouška těchto syntetických deoxycytidyl-deoxyguanosinových oligonukleotidů použitých coby adjuvantní složky k vakcinaci melanomovými peptidy ukázala výrazné zvýšení cirkulujících Melan-A-specifických CD8⁺ T-lymfocytů ve srovnání s množstvím vyvolanými samostatnou aplikací peptidovou vakcínou. Další látkou této skupiny je i Imiquimod, agonista TLR-7, který podporuje syntézu a uvolňování IFN α . Jeho použití může být přínosem pro nabuzení imunitní odpovědi u metastazujícího melanomu (FANG *et al.*, 2008; SIVENDRAN *et al.*, 2010).

2.1.6.3.6. Nádorové vakcíny

Vakcíny jsou už po staletí velmi úspěšným a platným prostředkem v boji proti mnoha různým infekčním onemocněním. Jejich využití k poražení nádorových onemocnění je založeno na zjištění, že imunitní systém je schopen vyvinout odpověď zaměřenou proti nádorovým buňkám (KIM *et al.*, 2002). Hlavním požadavkem na přípravu funkční a účinné vakcíny proti melanomu je její schopnost vyvolat cílenou specifickou imunitní odpověď organismu proti melanomovým buňkám. K cytotoxické odpovědi na antigeny specifické pro melanom dochází u některých nemocných přirozeně a je to pravděpodobně právě reakce CTL, která zodpovídá za již popsanou spontánní regresí (viz kapitola 2.1.5.3.7.). S narůstajícím počtem identifikovaných a charakterizovaných antigenů asociovaných s melanomem nastal i velký rozmach vývoje protinádorových vakcín. Vakcinační strategie se samozřejmě značně různí, ale společným cílem je podpořit utlumený imunitní systém v zahubení nádorově transformovaných buněk, ať už cestou zvýšení rozpoznání nádorových buněk jakožto „cizorodých a nežádoucích“ či zvýšením aktivace lymfocytů (KIM *et al.*, 2002; MANSFIELD a MARKOVIC, 2009). Vzhledem k tomu, že přirozená odpověď je při použití nádorových antigenů příliš slabá, je vhodné ji podpořit použitím adjuvans, které zvyšuje imunogenicitu vakcíny. V medicíně se používá řada adjuvantních látek různého původu. Jedná se např. o vakcínu BCG, purifikovaný saponin QS-21, Alum, Detox nebo imunomodulačních sloučenin typu IL-2, INF γ či GM-SCF (KRAISOVÁ, 2006). Protinádorové vakcíny je ve své podstatě možné rozdělit do několika skupin, lišících se nejen složením, použitým adjuvanciem, frekvencí a způsobem podání, ale do určité míry i účinkem. Kromě celobuněčných, peptidových/proteinových a gangliosidových

vakcíny, lze s výhodou využít techniky molekulární biologie a exprimovat příslušné antigeny na nepatogenních virech či zabalit vakcínu spolu s adjuvans do lipozómů. Dále je také možno použít ke zpracování antigenu dendritické buňky, které ho poté prezentují na svém povrchu T-buňkám a podněcují tak silnější buněčnou protinádorovou odpověď (KIM *et al.*, 2002; FANG *et al.*, 2008; JANDUS *et al.*, 2009; SIVENDRAN *et al.*, 2010). V současné době je po celém světě prováděna celá řada studií používajících různá léčebná schémata a hodnotící především úroveň vyvolané protinádorové buněčné i humorální odpovědi. Bohužel výsledky jsou často do značné míry protichůdné a zatímco jedna vypovídá o relativním úspěchu a přínosu léčby, další tento výsledek není schopna potvrdit, či ho dokonce vyvrací. Důvodů proč zatím nebylo dosaženo úspěchu melanomových vakcín je více. Tím hlavním je, jak již bylo řečeno, asi vysoká míra tolerance organismu vůči nádorovým buňkám. Také exprese HLA antigenů, nutných pro vazbu a prezentování antigenů, má velký vliv na spuštění imunitní reakce. Ne všechny typy HLA dokáží daný antigen navázat, a díky tomu, že exprese HLA v populaci je značně rozdílná, jsou vakcíny účinné jen u omezeného procenta pacientů. Dále také ne každá melanomová buňka exprimuje všechny antigeny a i exprese jednotlivých antigenů v průběhu onemocnění značně kolísá, což značně komplikuje výběr vhodných antigenů použitelných v terapii. (KRAISOVÁ, 2006)

- **Celobuněčné vakcíny**

V tomto případě se jedná o vakcíny polyvalentní, vyvolávající odpověď proti celé řadě nádorových antigenů, využívající celé nádorové buňky či jejich lyzát. Odpadá tak nutnost výběru antigenu vyvolávajícího co největší imunitní odpověď (FANG *et al.*, 2008). Celobuněčné vakcíny mohou být odvozeny z autologních nebo alogenních buněk. Vyšší účinnost lze předpokládat u vakcín autologních, protože jsou odvozeny přímo od nádorových buněk konkrétního pacienta (KRAISOVÁ, 2006). Příprava takovýchto vakcín je však náročná a nákladná. Buňky používané k imunizaci musí být ozářeny či jinak inaktivovány, aby bylo zabráněno jejich proliferaci *in vivo*, a poté injikovány pacientovi buď samostatně, nebo v kombinaci s imunomodulačními látkami. Vzhledem ke komplikacím spojeným s přípravou autologních vakcín jsou dostupnějším řešením vakcíny alogenní, odvozené z ustavených stabilních nádorových buněčných kultur (KIM *et al.*, 2002).

- **Peptidové/proteinové vakcíny**

Další vakcinační strategií je podání antigenů asociovaných s melanomem (viz kapitola 2.1.6.3.) buď samostatně nebo v různých kombinacích (MANSFIELD a MARKOVIC, 2009). Za imunogenní vlastnosti těchto antigenů, vyvolávající protinádorovou reakci, jsou odpovědné krátké peptidové fragmenty, které jsou endogenně zpracovány nádorovými či antigen-prezentujícími buňkami a následně v asociaci s MHC molekulami prezentovány T-buňkám. Mechanismus peptidové vakcinace tedy vyžaduje nabití prázdných MHC-I či MHC-II molekul peptidovými fragmenty (KIM *et al.*, 2002). Aplikace volných přirozených antigenních peptidů, emulzifikovaných v některém z dostupných humánních adjuvancií, sice vede k detekovatelné, ale značně omezené, imunitní odpovědi (JANDUS *et al.*, 2009). Proto byly vakcinační postupy založené na peptidech postupně inovovány a bylo vyzkoušeno mnoho různých variant této metody. V různé fázi testování bychom našli např. analogy přirozených peptidů vykazující vyšší imunogenicitu, současné podání více antigenů asociovaných s melanomem, přidání imunostimulačního adjuvancia jako je např. IL-2 či agonisté TLR (nemetylované CpG oligonuleotidy, Imiquimod), nebo použití epitopů dobře známých antigenů asociovaných s tumorem restringovaných MHC-II. Jedním z omezení použití peptidů jakožto imunogenů je potřeba selektovat pacienty na základě exprese definovaných HLA molekul, protože různé peptidy se váží jen na určitý MHC-I motiv (KIM *et al.*, 2002; JANDUS *et al.*, 2009). Epitopy také nemusí být nutně exprimovány na povrchu nádorových buněk a posttranslační modifikace některých z nich mohou bránit jejich rozpoznání (KIM *et al.*, 2002). Do imunizačních protokolů jsou často zahrnuty výhradně epitopy restringované MHC-I, což zamezuje aktivaci pomocných CD4+ T-buněk, které hrají důležitou roli v indukci účinné imunitní odpovědi (KIM *et al.*, 2002, JANDUS *et al.*, 2009). Z tohoto hlediska mají vakcinační strategie založené na rekombinantních proteinech, restringovaných jak MHC-I, tak i MHC-II, větší šanci cílit a aktivovat zároveň CD8+ i CD4+ T-lymfocyty specifické pro různé s tumorem-asociované antigeny bez ohledu na bariéru HLA (KIM *et al.*, 2002, JANDUS *et al.*, 2009). Díky možnosti syntetické přípravy antigenních peptidů z purifikovaných aminokyselin odpadá i nutnost získávat pacientovu tkáň (KIM *et al.*, 2002). Přes nesporné výhody použití rekombinantních proteinů byly odhaleny i nedostatky, které musí být odstraněny. Např. jsou tyto proteiny, na rozdíl od virových vektorů, všeobecně slabými prostředky ke křížové aktivaci MHC-I restringovaných CD8+ T-buněčných odpovědí, kvůli způsobu dopravy do buněk prostřednictvím

endocytického kompartmentu (JANDUS *et al.*, 2009). Dále existuje riziko, že při použití vakcíny sestávající pouze z jednoho konkrétního antigenu či peptidového fragmentu dojde u nádoru k mutaci, která mu umožní uniknout imunitnímu systému. Může se také stát, že k vyvolání adekvátní klinicky efektivní protinádorové odpovědi, nebude jeden antigen dostačující (KIM *et al.*, 2002). Tomu se dá částečně předejít právě použitím kombinace více antigenů, což by mělo rozšířit vyvolanou imunitní odpověď. Navíc může být z praktického hlediska produkce dostatečného množství rekombinativního proteinu ke klinickému použití značně nákladná a problematická např. u vysoce hydrofóbních proteinů (JANDUS *et al.*, 2009).

Dalším z řady cílů, které se dostaly do hledáčku výzkumných skupin, vyvíjejících protinádorové vakcíny, je i peptidový komplex proteinu teplotního šoku odvozený od nádoru (HSPPC, heat shock protein-peptide complex). Proteiny teplotního šoku jsou vysoce konzervovanou skupinou chaperonových proteinů, zapojených do buněčného transportu a obratu proteinů. HSPPC-96 (dříve Oncophage), autologní vakcína odvozená z pacientova tumoru, přinesla v klinických zkouškách poměrně slibné výsledky (SIVENDRAN *et al.*, 2010). Klinickými zkouškami prochází v současné době řada peptidových vakcín, velmi často založených na epitopech MAGE-1, MAGE-3, MART-1/Melan-A, NY-ESO-1, tyrozinázy a gp100. Jednotlivé zkoušky se samozřejmě liší imunizačními schémata, dávkováním i použitým adjuvans.

- **Gangliosidové vakcíny**

K přípravě melanomových vakcín nebyly použity pouze peptidové antigeny, ale i další molekuly, jako např. gangliosidy. Tyto komplexní sialoglykosfingolipidy s N-glykosidickou vazbou se nachází na povrchu nejen melanomových, ale i dalších nádorových buněk (SIVENDRAN *et al.*, 2010). Často bývají konjugovány s proteiny (např. nosičový protein KLH), aby byla zvýšena jejich imunogenicita. K vývoji vakcín jsou nejvíce využíván gangliosid GM2 a dále pak i GD2, GD3 a 9-O-Acetyl GD3, které vyvolávají protektivní protilátkovou odpověď (KRAISOVÁ, 2006).

- **Vakcíny založené na buňkách prezentujících antigen/dendritických buňkách**

Dendritické buňky jsou nejpotentnější profesionální antigen-prezentující buňky klíčové pro iniciaci buněčných odpovědí naivních T-lymfocytů. Pohlcují a zpracovávají antigen, migrují do sekundárních lymfoidních orgánů a stimulují klidové T-buňky prostřednictvím antigenů prezentovaných v kontextu molekul MHC-I a MHC-II (KIM

et al., 2002). Díky této schopnosti, která umožňuje vyvolání a zvýšení imunitní odpovědi, ztělesňují ve své podstatě ideální nástroj imunoterapie, protože právě účinná prezentace nádorových antigenů imunitnímu systému je jedním z problémů této oblasti výzkumu (FANG *et al.*, 2008). DC mohou být nabity antigenními peptidy a vyvolat specifickou protinádorovou odpověď. Nové metody, dovolující izolaci většího množství dendritických buněk z periferní krve, umožnily jejich využití jako terapeutického prostředku. DCs nabité autologními nádorovými lyzáty, proteiny, peptidy či dokonce mRNA jsou testovány klinickými zkouškami a v některých případech prokázaly efekt na indukci specifické CTL odpovědi (KIM *et al.*, 2002; JANDUS *et al.*, 2009; SIVENDRAN *et al.*, 2010). Některé studie byly naopak ukončeny kvůli nedostatečné účinnosti léčby (MANSFIELD a MARKOVIC, 2009; SIVENDRAN *et al.*, 2010). Pro konečný úspěch imunizace je třeba tuto strategii dále optimalizovat a prověřit její přínos dalšími klinickými zkouškami.

- **Rekombinantní virové vektory a DNA a RNA vakcíny**

Virové vektory kódující antigeny asociované s nádorem představují imunizační strategii potenciálně vedoucí k zahájení či posílení specifické CD8⁺ T-buněčné cytotoxické odpovědi. Dále mohou být exprimovány i cytokiny či kostimulační molekuly. Výhodou této metody je možnost transdukovat do virového vektoru celý nádorový antigen, čímž je docíleno aktivace širší palety T-buněčných odpovědí (SIVENDRAN *et al.*, 2010). Imunologická aktivita může být takto skutečně vyvolána a v některých případech byl pozorován příznivý účinek vakcinace na vývoj choroby (JANDUS *et al.*, 2009). Nevýhodou virových vektorů (např. poxvirových, adenovirových, herpesvirových) je jejich imunogenicita a možná imunodominance virových antigenů nad nádorovými (JANDUS *et al.*, 2009; SIVENDRAN *et al.*, 2010). U pacientů tak poměrně často dochází k produkci neutralizačních protilátek proti virové vakcíně (SIVENDRAN *et al.*, 2010)

Tento problém může být překonán použitím nahé DNA coby imunogenu. Bylo ukázáno, že plazmidová DNA může sloužit k expresi antigenu (např. ve svalových buňkách), který poté může být prezentován dendritickými buňkami *in vivo* (JANDUS *et al.*, 2009). Stejně jako v případě virových vektorů mohou být i zde exprimovány nejen nádorové antigeny, ale i cytokiny nebo kostimulační molekuly (KIM *et al.*, 2002). Bakteriální DNA nadto obsahuje CpG motivy působící jako přirozené adjuvans a silné stimulatory imunity. Další výhodou této formy imunizace je fakt, že nemusí být brán

v potaz haplotyp HLA a je tedy využitelná u širší skupiny pacientů (SIVENDRAN *et al.*, 2010). DNA může být pacientovi podána různými způsoby, ať už se jedná o přímou injekci, nástřel do kůže pomocí gene gun, či elektroporaci (JANDUS *et al.*, 2009).

Vedle DNA vakcín, byla testována i imunizace pomocí celkové nádorové mRNA v kombinaci s GM-SCF, která taktéž prokázala imunogenní účinek (JANDUS *et al.*, 2009).

Tyto přístupy byly z počátku atraktivní díky relativně nízkým nákladům a snadné aplikaci, ale zatím nevedly k jasnému pozitivnímu výsledku (FANG *et al.*, 2008).

2.1.6.3.7. Adoptivní buněčná terapie (ACT)

- **TIL terapie**

Tento způsob terapie využívá unikátní schopnost melanomu vyvolat produkci poměrně vysokých kvant protinádorových lymfocytů *in vivo* (viz kapitola 2.1.5.3.5.). Tyto lymfocyty mohou být, díky současným technologickým pokrokům, vyizolovány z nádorové tkáně nebo periferní krve a následně pěstovány a množeny *ex vivo*, díky čemuž je možné získat velké množství buněk, ze kterého lze vyselektovat nejvidnější buňky specifické pro určitý nádorový antigen. Připravené buňky jsou poté, často v kombinaci s IL-2, injikovány zpět pacientovi (MANSFIELD a MARKOVIC, 2007; SIVENDRAN *et al.*, 2010). Technika byla dále zdokonalena zavedením lymfodeplece pomocí nemyeloblastivní chemoterapie (např. fludarbin a cyklofosfamid), která by měla vést k vytvoření příznivějšího prostředí, např. díky odstranění potenciálně imunosupresivních regulačních T-lymfocytů, zvýšení dostupnosti cytokinů podporujících růst T-buněk a vylepšení funkcí či zvýšení dosažitelnosti APC (FANG *et al.*, 2008; JANDUS *et al.*, 2009; SIVENDRAN *et al.*, 2010). Léčba pomocí TIL dosáhla až 72% objektivní odpovědi, která trvala až 63 měsíců. Přestože jsou tyto výsledky velmi povzbudivé, přeci jenom existují limitace jako je nákladnost a fakt, že ne u každého pacienta lze kultivovat TIL (SIVENDRAN *et al.*, 2010).

- **Terapie pomocí geneticky manipulovaných T-buněk**

Další alternativou je transfer genů pro TCR určité specifity do krevních lymfocytů např. pomocí retrovirových vektorů. I tato metoda přinesla slibné výsledky. Nicméně je, stejně jako v ostatních případech ACT, nutné tyto postupy dále

optimalizovat např. z hlediska dopravy buněk do lymfatických uzlin, životnosti expandovaných a reinjiktovaných lymfocytů a jejich přetrvání v organismu. Jak se ukazuje, i kontrola přiměřené úrovně exprese TCR transgenů je pro vědce náročným úkolem a velkou výzvou, protože transdukované TCR musí obstát v konkurenci endogenních nebo dochází ke vzniku T-buněk nesoucích až 4 různé TCR vlivem nesprávného párování TCR řetězců. Některé z takovýchto buněk pak mohou působit imunopatologicky (FANG *et al.*, 2008; JANDUS *et al.*, 2009). Za zmínku taktéž stojí, že jsou vyvíjeny chimerické antigenní receptory, rozpoznávající nativní povrchové antigeny. Chimerické antigenní receptory jsou fúzní molekuly, které v sobě kombinují antigenní specifitu a schopnost aktivovat T-buňky. Jsou to právě různé kombinace aktivačních a kostimulačních domén, které dramaticky zvyšují jejich signalizační vlastnosti. Tento přístup dovoluje geneticky reprogramovat T-buňky tak, aby získaly schopnost rozpoznat povrchové antigeny nezávisle na kontextu MHC (JANDUS *et al.*, 2009; SADELAIN, 2009).

- **CTL terapie**

Mononukleární buňky izolované z periferní krve pacienta mohou být stimulovány autologními antigen prezentujícími buňkami, pulzovanými např. HLA-restringovanými epitopy např. z MART-1/Melan-A či gp100. Po několika kolech stimulace jsou *in vitro* selektovány jednotlivé klony na základě jejich schopnosti specificky zabít antigen-pozitivní nádorové cíle. Tyto cytotoxické klony jsou dále expandovány *in vitro* a poté přeneseny zpět do pacienta. Počáteční klinické zkoušky dosáhly pouze omezeného úspěchu, protože antigen-specifické CD8⁺ T-lymfocyty přerušovaly *in vivo* pouze omezenou krátkou dobu. Navíc se ukázalo, že rekurentní nádory mají tendenci selektivně ztrácet cílové antigeny (FANG *et al.*, 2008). Proto je potřeba tento přístup dále modifikovat.

2.1.6.4. Inhibitory angiogeneze

Angiogeneze hraje důležitou roli při vývoji melanomu. Maligní melanocyty jsou schopny sekretovat angiogenetické faktory jako např. VEGF nebo růstový faktor fibroblastů. Inhibitory angiogeneze by mohly zamezit růstu primárního nádoru a metastáz a potenciálně zlepšit klinické výsledky. Bohužel thalidomid, vykazující anti-angiogenetické vlastnosti, ani monoklonální protilátka proti VEGF nepřinesly při léčbě metastazujícího melanomu prozatím úspěch. Stejně tomu bylo i při použití kombinace

nízkých dávek IFN- α 2b s bevacizumabem, humanizovanou protilátkou proti VEGF, nebo thalidomidem. Ani syntetický analog inhibitoru trombospondinu neprojevil účinnost. Nicméně nedávná studie aplikace bevacizumabu, paclitaxelu a karboplatiny přinesla zřetelnější výsledky. Přínos terapie pomocí inhibitorů angiogeneze bude patrně největší v kombinaci s dalšími způsoby léčby (MANSFIELD a MARKOVIC, 2009).

2.1.6.5. Inhibitory proteinkináz

V současné době jsou testování podrobovány taktéž inhibitory kináz, které jsou častou obětí aktivačních mutací při vývoji maligního melanomu. Mezi inhibitory kináz můžeme zařadit např. imatinib, zaměřený proti mutaci c-kit, vemurafenib a sorafenib, bojující proti mutaci b-raf, ke které dochází až u 50% nádorů, a další. Zdá se, že tyto molekuly působí cytotoxicky na buňky nesoucí příslušnou mutaci (MARKOVIC *et al.*, 2007; MANSFIELD a MARKOVIC, 2009). Melanom je ale dynamické a heterogenní onemocnění a proto je často, k dosažení dlouhodobého účinku léčby, nejvhodnější použít kombinovanou léčbu. V tomto uspořádání by inhibitory kináz jistě měly v budoucnu najít své uplatnění.

2.1.6.6. Genová terapie

S rychlým rozvojem genomických a genově inženýrských metod úzce souvisí i pokrok v oblasti genové terapie nádorů. Předpokladů pro úspěch takovéto léčby je celá řada. Nejdříve je nutné získat co nejdetailnější molekulárně genetický popis specifických genových poškození stojících za nádorovou transformací buněk. Dále je třeba osekvenovat a nasyntetizovat zdravý gen, prostřednictvím různých dostupných rekombinantních technik ho vnést do vhodného, bezpečného a efektivního vektoru a jeho pomocí ho přenést do nádorové buňky. Již z tohoto stručného výčtu základních předpokladů pro úspěšnou terapii je zřejmé, že jde o přístup, který je mnohem složitější než ostatní dosud používané terapie. Hlavním obtížně překonatelným problémem této léčby je komplexnost genových změn podílejících se na maligní transformaci. Navíc hromadění různých genových změn v různých stádiích progresu choroby výrazně komplikuje výběr vhodného genu (KRAISOVÁ, 2006). Vzhledem k obtížnosti optimalizace genové terapie je doba, kdy bude standardní součástí léčby melanomu, ještě pravděpodobně velmi vzdálená.

2.2. POLYOMAVIRY

2.2.1. Klasifikace

Od roku 2000 jsou *Polyomaviridae* samostatnou virovou čeledí, zahrnující malé neobalené tumorogenní DNA viry, napadajících obratlovce (IMPERIALE a MAJOR, 2007, viz tab. 2.5.). Prvním objeveným polyomavirem byl roku 1953 virus napadající myši (GROSS, 1953). Právě od schopnosti myšího polyomaviru (MPyV), vyvolat po inokulaci u novorozeného myšího mláděte či imunokompromitované myši vznik mnoha různých nádorů, je odvozen název celé čeledi (z řeckého *poly* tj. mnoho a *oma* tedy nádor; IMPERIALE a MAJOR, 2007). Roku 1960 byl poté identifikován i první primátí virus, SV40, coby kontaminanta poliovirové vakcíny, k jejíž produkci byly používány kultury opičích buněk (SWEET a HILLEMANN, 1960). Tyto dva modelové viry posloužily jako nástroj studia řady buněčných procesů nejen *in vitro*, ale i *in vivo* a velkou měrou tak přispěly k vývoji molekulární biologie. Poskytly možnost blíže nahlédnout např. na děje spojené s buněčnou transformací, replikací a transkripcí DNA, regulací buněčného cyklu a vznikem a vývojem virem vyvolaných nádorů. Stejně tak posunuly o značný kus kupředu i vědomosti týkající se uspořádání viru-podobných částic. Myší polyomavirus posloužil také při studiu interakcí mezi nádory a imunitním systémem (ATKIN *et al.*, 2009; DALIANIS a GARCEA, 2009). Zatímco u permisivních buněk dochází k produktivní infekci, tedy probíhá zde kompletní životní cyklus viru zakončený destrukcí buněk, v buňkách nepermisivních jsou tvořeny pouze časné genové produkty způsobující transformaci, ale neprobíhá tu však účinná replikace viru ani tvorba virového potomstva (IMPERIALE a MAJOR, 2007).

Polyomavirů, které napadají člověka, bylo do této chvíle odhaleno pět. Dva z nich, viry BK (GARDNER *et al.*, 1971) a JC (PADGETT *et al.*, 1971), jsou známy již od roku 1971. Oba ustavují u zdravých osob asymptomatickou perzistentní infekci, avšak při imunosupresi může dojít k jejich reaktivaci a mohou způsobovat velmi závažné zdravotní komplikace. BK virus značně zhoršuje především stav pacientů po transplantaci ledvin, protože vyvolává post-transplantační nefropatie a záněty močových cest. JCV je pro změnu spojen s demyelinizací neuronů v podobě progresivní multifokální leukoencefalopatie (AHSAN a SHAH, 2006; IMPERIALE a MAJOR, 2007, BOOTHPUR a BRENNAN, 2010). V posledních čtyřech letech se díky použití nových detekčních metod řada lidských polyomavirů rozrostla hned o několik nových zástupců, a to o viry WU (GAYNOR *et al.*, 2007), KI (ALLANDER *et al.*, 2007), virus

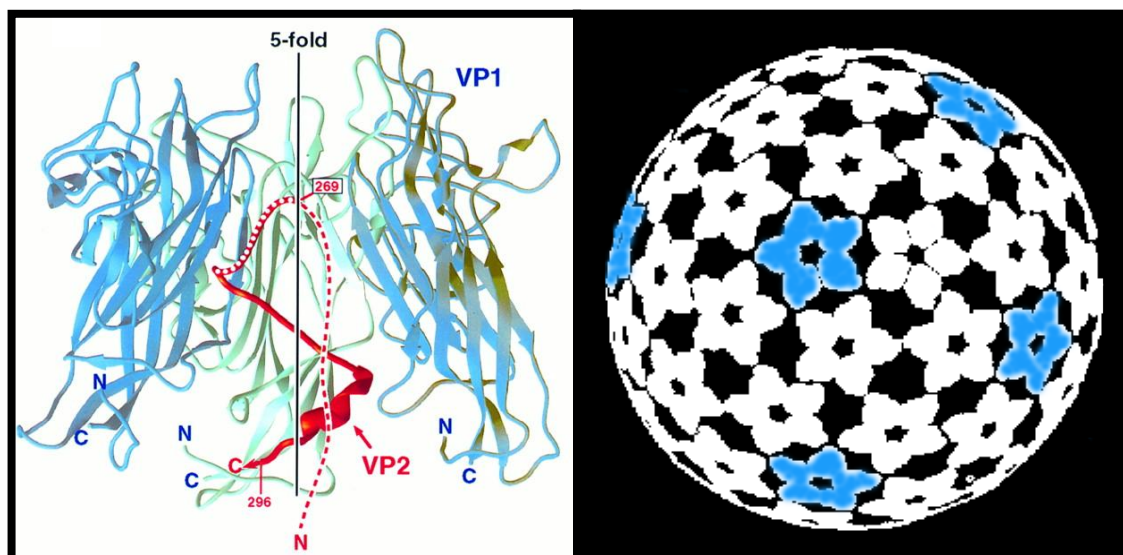
karcinomu Merkelových buněk (FENG et al., 2008) a zatím poslední virus TSV (VAN DER MEIJDEN *et al.*, 2010). Stejně jako předcházející dva představují riziko především pro imunosuprimované pacienty. Výsledky sérologických studií poukazují na skutečnost, že populace je lidskými polyomaviry značně promořena, nicméně jimi způsobená onemocnění postihnou pouze zlomek infikovaných osob (BOOTHPUR a BRENNAN, 2010).

Virus	Rok objevení	Hostitel	MT	Agnoprotein
Myší polyomavirus	1953	Myš	Ano	
Myší pneumotropní virus	1953	Myš		
SV40	1960	Opice (Makak rhesus)		Ano
SA12	1963	Opice (Pavián čakma)		Ano
Králičí polyomavirus	1964	Králík		
Křeččí polyomavirus	1968	Křeček	Ano	
BK virus	1971	Člověk		Ano
JC virus	1971	Člověk		Ano
Bovinní polyomavirus	1974	Skot		Ano
Lymfotropní papovavirus	1979	Opice (Kočkodan obecný)		
Ptačí polyomavirus	1981	Ptáci		Ano
Krysí polyomavirus	1984	Krysa		
Paviání polyomavirus typu 2	1989	Pavián		
Cynomolgus polyomavirus	1999	Opice (Opice javánská)		
Husí hemoragický polyomavirus	2000	Husa		Ano
Šimpanzí polyomavirus	2005	Šimpanz		
Vraní polyomavirus	2006	Vrána		Ano
Pěnkaví polyomavirus	2006	Pěnkava		Ano
KI polyomavirus	2007	Člověk		
WU polyomavirus	2007	Člověk		
Squirrel monkey polyomavirus	2008	Opice (Kotul veverkovitý)		Ano
MC polyomavirus	2008	Člověk		

Tabulka 2.5.: Polyomaviry známé na jaře 2009. Upraveno podle DALIANIS a GARCEA (2009).

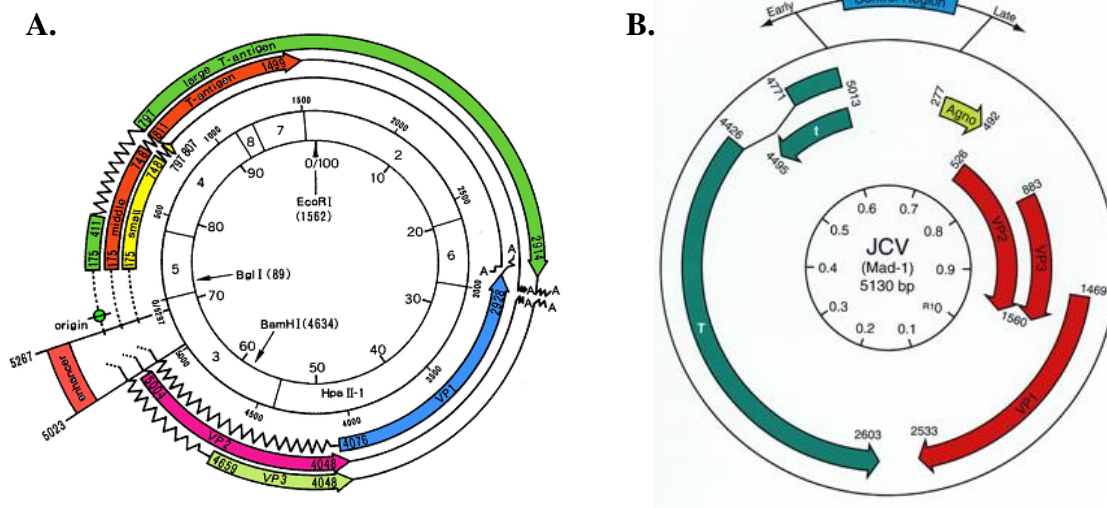
2.2.2. Struktura virionu a organizace genomu

Ikosahedrální kapsida těchto malých neobalených DNA virů je tvořena 360 molekulami hlavního strukturního proteinu VP1, který je uspořádán do 60 hexavalentních a 12 pentavaletních pentamer (viz obr. 2.6.; LIDDINGTON *et al.*, 1991). K centrální dutině uvnitř každé pentamery je nekovalentně připojena molekula jednoho ze dvou minoritních proteinů VP2 nebo VP3 (viz obr. 2.6.; BAROUCH a HARRISON, 1994).



Obr. 2.6.: Kapsida polyomaviru. Vlevo znázorněna pentamerní struktura VP1 s proteinem VP2 v centrální dutině. Převzato z CHEN *et al.*, 1998. Vpravo kapsida složená z pentamer proteinu VP1. Bílou barvou znázorněny hexavalentní pentamery, modrou pentavalentní. Převzato ze SALUNKE *et al.*, 1986.

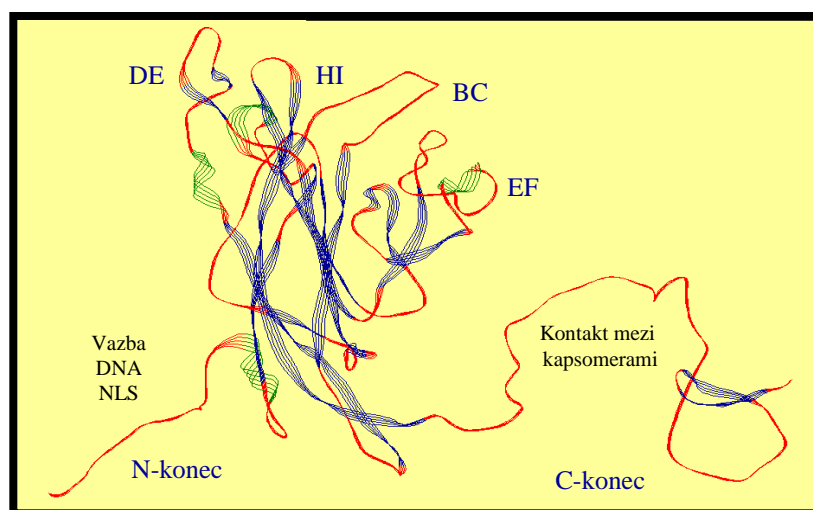
Kapsida dosahující velikosti 45 nm ve svém nitru uzavírá genom, tvořený jednou dvouřetězcovou kovalentně uzavřenou kruhovou molekulou DNA v komplexu s buněčnými histony H2A, H2B, H3 a H4 a virovým proteinem VP1, s jejichž pomocí je uspořádáván do struktury virového minichromozómu. Virový genom o velikosti přibližně 5,3 kbp je možné rozdělit na 3 oblasti – časnou (kódující nestrukturní T-antigeny), pozdní (exprimovanou až po replikaci viru, z níž jsou přepisovány strukturní proteiny), a regulační (v její sekvenci se nachází počátek replikace spolu s promotory a enhancery transkripce všech genů - viz obr. 2.7.). Přepis genů časné oblasti, mezi něž řadíme sekvence kódující proteiny LT, ST a u hlodavčích polyomavirů ještě MT, začíná ihned po vstupu do jádra a trvá i v pozdějších fázích infekce. Po zahájení dvousměrné replikace genomu z jediného počátku je spuštěna i transkripce z druhého řetězce DNA. Ta probíhá opačným směrem nežli tomu bylo u časných T-antigenů. Pozdní, strukturní, proteiny VP1, VP2 a VP3 dávají, jak již bylo řečeno, vzniknout virové kapsidě. Z pozdní oblasti je u primátích polyomavirů exprimován ještě regulační protein Agno (IMPERIALE a MAJOR, 2007).



Obr. 2.7.: Organizace genomu myšího polyomaviru (MPyV) a lidského polyomaviru JC (JCV). A. Genom myšího polyomaviru. Oblast pozdní transkripce obsahuje geny strukturálních proteinů VP1 (modrá), VP2 (růžová) a VP3 (světle zelená). V regulační oblasti leží počátek virové replikace ori (zelená), promotory a enhancery transkripce všech genů (červená). Oblast časně transkripce kóduje regulační nestrukturní proteiny LT (zelená), MT (červená) a ST (žlutá). Převzato z COLE (1996). B. Genom lidského polyomaviru JC. Regulační oblast (Control Region) s počátkem replikace, promotory a enhancery znázorněna modře. Kodující oblasti rozděleny na časnou a pozdní oblast. Časný region kóduje regulační proteiny – malý (t) a velký (T) antigen (tyrkysově). Z pozdní oblasti jsou přepisovány strukturální proteiny VP1, VP2, VP3 (červeně) a krátký regulační peptid Agno (světle zeleně). Převzato z SARIYER *et al.* (2004).

Hlavní strukturální protein VP1 lze rozčlenit na 3 důležité části, a to na N-koncovou, střední a C-koncovou. *N-terminus*, orientovaný do nitra pentamery, nese nejen 11 aminokyselin dlouhý jaderný lokalizační signál, ale také je schopen nespecificky interagovat s DNA (MORELAND *et al.*, 1991; MORELAND a GARCEA, 1991; CHANG *et al.*, 1992; 1993). Střední část monomeru VP1 je tvořena převážně β -listy, které jsou propojeny smyčkovými strukturami, a několika krátkými α -helixy. Smyčky BC, DE a HI jsou vystaveny na povrch kapsidy a díky tomu hrají významnou roli v rozpoznání buněčných receptorů a adsorpci virionu na povrch buňky. Za interakce s kyselinou sialovou, která je součástí těchto receptorů, je zodpovědných několik aminokyselinových zbytků nacházejících se ve smyčkách BC a HI. Smyčka FG, která je rovněž orientována na vnější straně kapsidy, tvoří součást Ca^{2+} vazebného místa. Ve smyčkových doménách jsou vzhledem k jejich lokalizaci obsaženy i hlavní

neutralizační epitopy. Pentamery jsou vzájemně propojeny velmi flexibilním C-koncem VP1 molekuly, který vystupuje z každého monomeru a invaduje do sousední pentamery. Interakce mezi kapsomerami jsou stabilizovány Ca^{2+} ionty a disulfidickými vazbami (viz obr. 2.8.; GARCEA *et al.*, 1987; LIDDINGTON *et al.*, 1991; STEHLE *et al.*, 1994; 1996; STEHLE a HARRISON, 1996; 1997; SAPP a DAY, 2009).



Obr. 2.8.: Monomer VP1. Modře znázorněny β -struktury, zeleně α -helixy. Smyčky vystavené na povrch kapsidy označeny jako DE, HI, BC a EF. N-konec orientovaný do nitra kapsidy nese NLS a nespecificky váže DNA. C-koncová část molekuly zprostředkovává kontakt mezi pentamerami. Upraveno z LIDDINGTON *et al.*, 1991.

Molekula VP1 prochází v hostitelské buňce řadou posttranslačních modifikací, mezi kterými jsou fosforylace (ANDERS a CONSIGLI, 1983), sulfatace (LUDLOW a CONSIGLI, 1987), acetylace (BOLEN *et al.*, 1981), hydroxylace (LUDLOW a CONSIGLI, 1989) a methylace (BURTON a CONSIGLI, 1996). Tyto úpravy různým způsobem ovlivňují jednotlivé funkce VP1. Například fosforylace jsou velmi zásadní nejen pro morfogenezi virionu, ale zřejmě i pro vazbu receptoru na povrchu buňky (LI a GARCEA, 1994). Methylace lysinových a argininových zbytků na N-konci VP1 pravděpodobně usnadňuje vazbu DNA (BURTON a CONSIGLI, 1996). Jednou z výjimečných vlastností hlavního kapsidového proteinu VP1 je jeho schopnost samovolně tvořit pentamery, které se mohou v roztoku nízké iontové síly a za přítomnosti Ca^{2+} iontů spontánně uspořádat do struktur podobných virovým kapsidám (VLPs), a to i v nepřítomnosti minoritních proteinů VP2 a VP3. K tomuto procesu tak

například dochází v jádrech hmyzích buněk Sf9 používaných pro expresi VP1. Stejně tak nejsou k tvorbě VLPs nutné ani posttranslační modifikace, protože purifikovaný VP1 je schopen se skládat do pseudokapsid i *in vitro* po produkci prokaryotickým expresním systémem bakterie *E. coli*, která příslušné úpravy neprovádí. Kromě klasických pseudokapsid tvořených 72 pentamerami, mohou z takto připraveného VP1 při změně podmínek vznikat i další struktury tvořené 36, 24 nebo 12 pentamerami (SALUNKE *et al.*, 1986; 1989; MONTROSS *et al.*, 1991, FORSTOVÁ *et al.*, 1993). V důsledku toho, že minoritní kapsidové proteiny VP2 a VP3 jsou čteny ze stejného čtecího rámce, je celá sekvence VP3 kompletně obsažena v sekvenci proteinu VP2. Je to právě společný C-konec molekul, kterým minoritní proteiny interagují s dutinou v pentamere VP1. Protein VP2 je však oproti VP3 přibližně o 1/3 delší a má ještě unikátní N-koncovou část. N-terminální glycin VP2 je navíc myristylován (IMPERIALE a MAJOR, 2007).

Myší polyomavirus, stejně jako umělé virové částice od něj odvozené, využívají ke vstupu do buňky receptorem zprostředkovanou endocytózu. Za rozpoznání povrchových receptorů, glykosylovaných gangliosidů GD1a a GT1b, je zodpovědný hlavní kapsidový protein VP1 (TSAI *et al.*, 2003; shrnuto v TSAI a QIAN, 2010).

2.3. UMĚLÉ VIROVÉ ČÁSTICE (VLPs)

V různých textech se můžeme setkat s řadou označení jako viru podobné částice, umělé virové částice, pseudokapsidy a VLPs, které nemusí být ve všech případech vždy zcela významově totožné, avšak všechny vyjadřují prakticky totéž – označují virové kapsidy, připravené *in vitro* či v heterologním expresním systému, které neobsahují virovou DNA. V této diplomové práci jsou drobné a nepatrné významové nuance zanedbány a výrazy jsou používány coby synonyma.

2.3.1. Obecné vlastnosti a produkce viru podobných částic

Kapsidové proteiny některých virů (např. papillomavirů, polyomavirů, rotavirů) vykazují schopnost uspořádat se spontánně do tzv. VLPs neboli viru podobných částic (KIRNBAUER *et al.*, 1992; SALUNKE *et al.*, 1986, REDMOND *et al.*, 1993). VLPs tak mohou být získány po purifikaci strukturních kapsidových proteinů exprimovaných v různých buňkách (savcích, kvasinkových, hmyzích, bakteriálních). Volba expresního systému závisí na podmínkách nutných pro samovolnou tvorbu pseudokapsid a dále na množství a typu proteinů k tomu nezbytných. Samozřejmě pro širší použití je vhodné přihlídnout i k jednoduchosti přípravy a neodmyslitelným ekonomickým nárokům. Při průmyslové přípravě VLPs se už velmi osvědčily kvasinkové a bakulovirové expresní systémy. Pokud je k tvorbě pseudokapsid potřebná koexprese několika proteinů, bývá častěji zvolena produkce bakulovirem (např. AN *et al.*, 1999; TEGERSTEDT *et al.*, 2005; BOUŘA *et al.*, 2005; HRUŠKOVÁ *et al.*, 2009). Na druhou stranu použití kvasinkových buněk s sebou přináší jiné výhody, jako např. rychlou produkci vysokého množství proteinu při přípravě částic sestávajících z jednoho typu molekul (např. PALKOVÁ *et al.*, 2000; SASNAUSKAS *et al.*, 2002). Ekonomicky nejprůzračnější je pravděpodobně příprava proteinů v *E. coli*, nicméně samouspořádání částic vyžaduje další kroky (např. CHEN *et al.*, 2001). VLPs se velikostí i tvarem podobají nativním virionům, od něhož jsou odvozeny, avšak neobsahují genovou informaci tohoto viru a nejsou proto infekční. Jsou sice schopny vstupovat do buněk majících příslušný receptor, vzhledem k absenci virového genomu ale nemůže dojít k replikaci. Některé pseudokapsidy mohou obsahovat DNA, nicméně se jedná o fragmenty DNA buněk či virů produkčního systému (GILLOCK *et al.*, 1997; AN *et al.*, 1999). Právě díky schopnostem umělých virových částic nespecificky enkapsidovat DNA, vázat receptor

na buněčném povrchu a díky tomu úspěšně vstupovat do buněk, ale i být rozpoznány imunitním systémem a vyvolat jeho odpověď, začala být intenzivně studována možnost jejich terapeutického využití coby vakcín a vektorů v genové a imunologické terapii. Mohly by kupříkladu představovat bezpečnější alternativu k používaným atenuovaným virům a virovým vektorům, které jsou sice účinné, nicméně u nich nelze vyloučit různá rizika. Může např. dojít k vyvolání nevíтанé imunitní odpovědi proti vektoru v genové terapii, nežádoucí interakci virových genů s geny hostitele či ke vzniku replikačně kompetentního viru, ať již vlivem nedostatečné atenuace nebo rekombinace.

V současné době jsou asi nejznámějším příkladem vakcín založených na VLP profylaktické očkovací látky proti lidským papillomavirům (HPV) Gardasil (u nás jako Silgard; Merck) a Cervarix (GlaxoSmithKline). Proteiny tvořící VLPs ve vakcíně Cervarix, (hlavní kapsidové proteiny HPV typu 16 a 18), jsou produkovány bakulovirovým expresním systémem. Gardasil, rekombinantní vakcína připravovaná v kvasinkových buňkách, je zacílen nejen proti HPV typu 16 a 18, ale i proti HPV typu 6 a 11, způsobujícím až 90% genitálních bradavic. Schválení a povolení jejich klinického použití vedlo k rozsáhlým vakcinacím u USA i Evropě. Opakovaně byla prokázána jak vysoká účinnost proti infekci HPV tak i minimum vážných vedlejších účinků (SCHMIEDESKAMP a KOCKLER, 2006; SPECK a TYRING, 2006). Jejich úspěch vedl k dalšímu zvýšení zájmu o umělé virové částice a intenzivnímu vývoji nových aplikací. Je testována celá řada přístupů využívajících VLPs nejen v roli vakcín, ale i imunoterapeutických prostředků pro léčbu rakoviny (např. KIMCHI-SARFATY a GOTTESMAN, 2004; TEGERSTEDT *et al.*, 2005), revmatoidní arthritidy (CHACKERIAN *et al.*, 2001) či dokonce závislosti na kouření (MAURER *et al.*, 2005). Dále je také zkoumáno použití VLPs k transferu proteinů nebo DNA do buněk. S velkou výhodou mohou být k tomuto účelu využity částice odvozené od jiných než lidských virů, vůči kterým nejsou v organizmu přítomny preexistující protilátky, které by snižovaly účinnost vektoru.

2.3.2. VLPs odvozené od polyomavirů

Hlavní strukturální protein polyomavirů, VP1, je, jak již bylo řečeno, za vhodných podmínek schopen samouspořádáním vytvořit VLPs. Částice víceméně morfologicky odpovídající infekčním virionům a je možné je snadno získat *in vitro* uspořádáním

purifikovaných VP1 kapsomer produkovaných bakteriemi *E. coli*, či použitím kvasinkových nebo bakulovirových expresních systémů (viz kapitoly 2.2.2. a 2.3.1.). Největšího zájmu se dostalo viru podobným částicím myšího polyomaviru a opičího viru SV40. Nicméně stejným způsobem jako tyto VLPs mohou být získány i částice odvozené od dalších zástupců čeledi Polyomaviridae. Jedním z nich je i myší pneumotropní virus (MPtV), dříve také nazývaný Kilham virus či K-virus. Druhý objevený myší polyomavirus, poprvé vyizolovaný roku 1953, způsobuje fatální pneumonii u novorozenech myší, zatímco infekce dospělých jedinců je asymptomatická a perzistentní (KILHAM a MURPHY, 1953; GREENLEE, 1981). Vzhledem k tomu, že se jedná o netumorigenní virus a je velmi obtížné ho kultivovat *in vitro*, nebyl předmětem tak intenzivního studia jako myší polyomavirus. Terapeutické VLPs odvozené od MPtV jsou usilovně zkoumány vědeckou skupinou ze švédské univerzity Karolinska University (TEGERSTEDT et al., 2003; ANDREASSON et al., 2009; 2010). Vzhledem k tomu, že mezi částicemi MPtV a MPyV se při sérologických testech neprojeví křížová reaktivita, bylo by potenciálně možné při terapeutických aplikacích částice odvozené od těchto dvou virů s výhodou použít režimu prime-boost (TEGERSTEDT et al., 2003). Stejně tak mohou být získány i částice lidských virů JC a BK (např. SASNAUSKAS et al., 2002), které byly s úspěchem připraveny i naší laboratoří a mohly by být eventuálně využity pro preventivní či terapeutickou vakcinaci proti těmto virům.

2.3.3. Využití částic odvozených od polyomavirů (především od MPyV)

2.3.3.1. Přenos DNA do buněk pomocí VLPs

Schopnost umělých virových částic inkorporovat exogenní DNA a přenést ji přes plazmatickou membránu do eukaryotických buněk *in vitro* i *in vivo*, byla potvrzena řadou studií. Limitujícím krokem transportu je pravděpodobně tvorba komplexů VP1 s DNA. Částice velmi účinně enkapsidují lineární DNA od volných konců. Méně stabilní komplexy se tvoří mezi VP1 a DNA uvnitř sekvence či v případě cirkulární molekuly. Pseudokapsidy dokáží, stejně jako infekční virus, vstoupit do celé řady buněčných typů, včetně buněk lidských, a zajistit zde stabilní a perzistentní expresi vneseného genu (např. FORSTOVÁ et al., 1993; SOEDA et al., 1998; ŠTOKROVÁ et al., 1999; HEIDARI et al., 2000; KRAUZEWICZ et al., 2000a). Na základě studie,

kteřou vypracovali FORSTOVÁ *et al.* (1995), se zdá, že přenos cizorodé DNA do buněk pomocí pseudokapsid má, v porovnání s jinými běžně používanými metodami jakými jsou např. kalcium-fosfátová koprecipitace nebo lipofekce, řadu výhod, týkajících se především udržení stability DNA a vyšší účinnosti genové exprese. Velikost holé exogenní DNA tvořící *in vitro* komplex s VLPs dosahovala, podle výsledků testu ochrany před působením DNáz, přibližně 3 kbp (FORSTOVÁ *et al.*, 1995). Nicméně částice mohou do svého nitra zavzít až 5 kbp DNA v komplexu s buněčnými histony (GILLOCK *et al.*, 1997). Velikostní limitaci se pokusili obejít SOEDA *et al.* (1998) použitím polykationického aminu polylysinu, který je schopen interagovat s DNA, kondenzovat ji a ochránit před degradací. Přidání polylysinu ke komplexům DNA s VLPs vedlo *in vitro* i *in vivo* ke zvýšení transientní exprese genu, z dlouhodobého hlediska však žádný přínos zaznamenán nebyl. Výsledky pokusů KRAUZEWICZ *et al.* (2000a) ukazují, že markerový gen byl pseudokapsidami *in vivo* úspěšně přenesen do širokého spektra orgánů a tkání pokusných zvířat včetně mozku (částice jsou tedy pravděpodobně schopny překonat hematoencefalickou bariéru). Opět bylo dosaženo výrazně dlouhodobější exprese přeneseného genu než při použití holé DNA bez VLPs. Zatímco účinnost adsorpce a internalizace se mezi pseudokapsidami a viriony infekčního viru podle pozorování RICHTEROVÉ *et al.* (2001) v ničem neliší, situace týkající se úspěšného dopravení DNA do jádra je rozdílná. Pouze malá část molekul DNA, které jsou nesený pseudokapsidami, dosáhne jádra. Mohlo by to být způsobeno absencí minoritních proteinů VP2 a VP3, jejichž přítomnost sice není nutná pro vytvoření VLP, ale hraje zásadní roli v infektivitě viru (MANNOVÁ *et al.*, 2002). *In vitro* studie KRAUZEWICZ *et al.* (2000b) naznačuje existenci druhé, neproduktivní, dráhy transferu do jádra, která je pseudokapsidami pravděpodobně využívána, zatímco infekční viriony jsou přednostně cíleny na dráhu efektivního transportu.

Částice odvozené od MPyV jsou vysoce stabilní, své morfologické a imunologické vlastnosti si uchovávají i po několikátýdenním skladování při pokojové teplotě (CAPARRÓS-WANDERLEY *et al.*, 2004). Jsou také mimořádně imunogenní a jejich podání vyvolává odpověď obou složek imunitního systému, buněčné i protilátkové. Dochází k proliferaci lymfocytů i produkci sérových a slizničních protilátek. Imunitní odpověď na produkt transgenu neseného pseudovirionem je silnější než odpověď proti transgenu vnesenému do organismu samostatně v podobě holé DNA. Imunogennost částic je ale možná až příliš vysoká, než aby mohly být použity k přenosu terapeutické DNA opakovaně (CLARK *et al.*, 2001). Zatímco při některých aplikacích

může být schopnost částic vstoupit do širokého spektra buněk výhodou, v některých případech může být naopak na překážku. Stejná situace platí i co se týče imunitní odpovědi, kterou částice vyvolávají. Proto bude pravděpodobně nutné částice pro účely různého terapeutického využití více či méně modifikovat např. s cílem zúžení spektra cílových buněk či snížení rozpoznání částic imunitním systémem (HEIDARI *et al.*, 2000). Jedním z možných řešení problému vysoké imunogenicity je použití pseudokapsid odvozených od virů, mezi nimiž neexistuje křížová reaktivita – např. MPyV a MPtV (TEGERSTEDT *et al.*, 2003). Jindy mohou být adjuvantní vlastnosti pseudokapsid MPyV naopak využity ve prospěch terapie.

Schopnost nespecificky vázat DNA a transportovat ji do buněk, a tedy i potenciální využitelnost k dopravě transgenů, byla samozřejmě testována i u částic odvozených od jiných členů čeledi *Polyomaviridae*. K úspěšnému přenosu DNA *in vitro* byly použity např. pseudokapsidy virů BK, JC či kreččího polyomaviru (HaPyV), nicméně úroveň exprese vneseného genu byla většinou opět velmi nízká stejně jako při transferu částicemi myšího polyomaviru (GOLDMANN *et al.*, 1999; OU *et al.*, 1999; TOUZÉ *et al.*, 2001; VORONKOVA *et al.*, 2007).

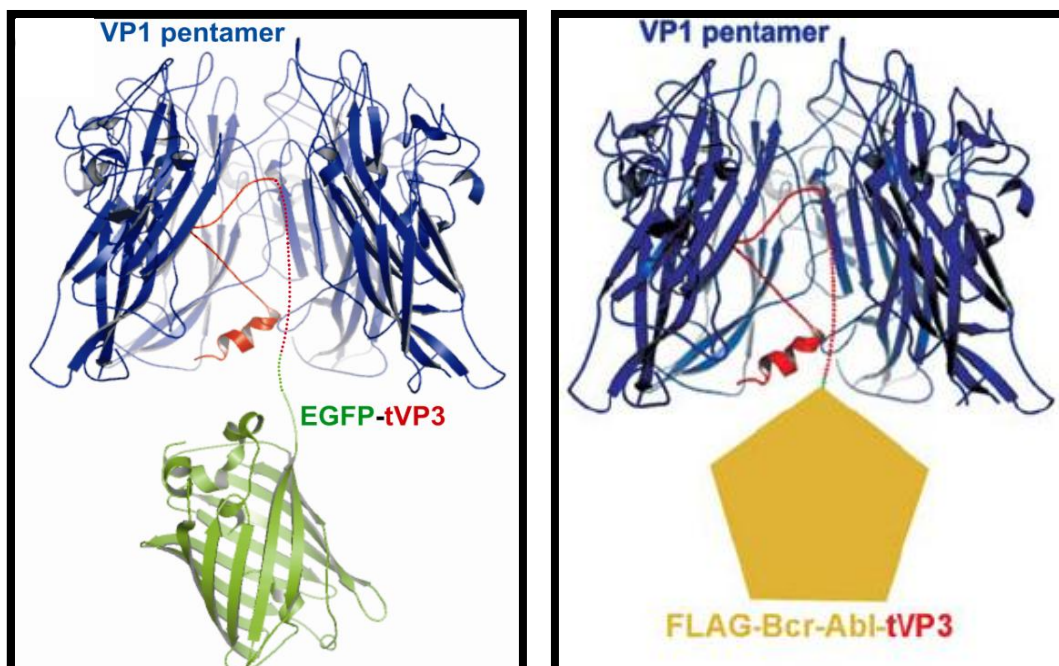
I částicím druhého modelového polyomaviru, opičího viru SV40, a jejich transportním vlastnostem byla věnována značná pozornost (SANDALON *et al.*, 1997; ARAD *et al.*, 2002; KIMCHI-SARFATY *et al.*, 2002). SV40 VLPs jsou schopny přenést překvapivě velkou molekulu DNA dosahující až 17 kbp (KIMCHI-SARFATY *et al.*, 2003).

2.3.3.2. Vyvolání imunitní odpovědi proti různým antigenům pomocí VLPs

MPyV VLPs jsou, jak již bylo řečeno výše, vysoce imunogenní, především díky mnohačetnému opakování strukturních motivů. Zatímco protilátková odpověď slouží v první řadě k zabránění infekce, buněčná naproti tomu jako obrana proti vzniku a vývoji virům vyvolaných nádorů. V případě, že jsou částice použity k dopravě terapeutické DNA, je vyvolání imunitní odpovědi proti nim nežádoucí a může vést ke značnému snížení úspěšnosti transferu, a proto je k tomuto účelu nezbytně nutné vyvinout takové částice, jejichž indukční vliv na imunitní systém nebude tak výrazný. Na druhou stranu lze vysoké imunogenosti pseudokapsid s výhodou využít při přípravě vakcín, a to nejen proti virům, od kterých jsou odvozeny, ale i dalším chorobám dokonce i neviróvého původu. V tomto případě splňují částice hned dvě funkce - slouží zároveň jako nosič antigenu i jako adjuvantní agens. Pokud částice nesou cizorodý

antigen (virový, nádorový), hovoříme o chimerických viru podobných částicích. Antigeny, nejčastěji proteinového původu, mohou být s pseudokapsidou spojeny několika různými způsoby.

První možností je fúze peptidového ligandu s jedním z minoritních proteinů VP2 nebo VP3 či jejich společným C-koncem, který je zodpovědný za vazbu molekul k pentameru VP1 (např. ABBING *et al.*, 2004; TEGERSTEDT *et al.*, 2005; BOUŘA *et al.*, 2005; ANDREASSON *et al.*, 2009; HRUŠKOVÁ *et al.*, 2009; aj.). Vzniklý fúzní protein je poté nekovalentně asociován s pentamerami VP1 a je ukryt uvnitř vytvořené pseudokapsidy. Teoretický maximální počet molekul takového proteinu na jednu částici je tedy 72, ovšem ve skutečnosti je řádově nižší. Vzhledem k lokalizaci uvnitř částice není velikostní limitace antigenu tak striktní. Tuto metodu zvolili např. i ABBING *et al.* (2004) při přípravě chimerických částic, kteří 49 aminokyselin dlouhou kotevní sekvenci proteinu VP2 fúzovali s GFP či na ní kovalentně připojili nízkomolekulární cytostatikum methotrexát. Částice vznikající z proteinů exprimovaných v *E. coli* byly pravidelného tvaru a jejich stabilita byla vysoká. Počet fúzních proteinů odvozených od VP2 sice nedosahoval teoretické hodnoty 72, ale byl v tomto případě i tak překvapivě poměrně vysoký – 64. Obdobný přístup použili BOUŘA *et al.* (2005) při konstrukci modelových chimerických VLPs myšího polyomaviru, které obsahovaly fúzní protein vzniklý spojením zkrácené formy minoritního proteinu VP3 a zeleného fluorescenčního proteinu EGFP (viz obr. 2.), které posloužily k testování řady procesů a metod. K přípravě obou proteinů tvořících chimerickou částici (VP1 i EGFP-t-VP3) zároveň byla využita koexprese bakulovirovým systémem.



Obr. 2.: Model pentameru VP1, který ve své dutině nese cizorodý antigen připojený ke zkrácenému minoritnímu proteinu VP2. Vlevo konstrukt obsahující EGFP-tVP3 (převzato z FRÍČ et al., 2008), vpravo pak schéma FLAG-Bcr-Abl-tVP3 (převzato z HRUŠKOVÁ et al., 2009)

Druhým možným způsobem přípravy chimerických částic je vložení cizorodého epitopu přímo do některé z povrchových smyček hlavního strukturního proteinu VP1 (GLEITER *et al.*, 1999; GELDVILAITE *et al.*, 2000; GLEITER a LILIE, 2001; STUBENRAUCH *et al.*, 2001; SKRASTINA *et al.*, 2008). Daný epitop je tak v 360 opakováních vystaven na vnější straně částice a je proto přístupný řadě interakcí. Ovšem při vkládání epitopu do VP1 je třeba mít na paměti, že může dojít k narušení jeho strukturních vlastností, a tedy i schopnosti tvorby stabilních částic či vstupu VLPs do cílových buněk. Existuje tu proto jasná limitace velikosti použitého antigenu, která se většinou pohybuje mezi 20 a 40 aminokyselinami. Často se také pro vložení cizorodého epitopu používají flexibilní nástavce (např. glycin-serinové), které napomáhají molekule zaujmout nejvýhodnější konformaci. GLEITER *et al.* (1999) vložili do HI smyčky VP1 dokonce celý 18 kDa enzym, a to dihydrofolátreduktázu *E. coli*. Záměrně zvolili HI smyčku, protože vložení cizorodého peptidu do tohoto místa ruší schopnost VP1 vázat sialovou kyselinu, která je součástí přirozených receptorů pro vstup částic do buněk. Jejich záměrem bylo totiž v budoucnu do stejného místa vkládat jiné peptidy, které by částicím propůjčily nové vlastnosti a navíc vedly ke změně

vazebné specifity částic a jejich vstupu jen do úzkého spektra konkrétních buněk. Na modelovém konstruktu ověřili, že je možné vložit celý funkční protein do sekvence VP1. Funkce hlavního kapsidového proteinu, jako např. tvorba pentamerních kapsomer a jejich skládání do pseudokapsid nebyla touto inzercí nijak narušena. Ve struktuře a termální stabilitě vložené dihydrogenfolátreduktázy naproti tomu došlo ke značným změnám ve srovnání s divokým typem, nicméně její enzymová aktivita zůstala takřka nedotčená (GLEITER *et al.*, 1999). Na základě tohoto původního modelu skutečně vyvinuli buněčně specifický transportní systém. Do HI smyčky vložili negativně nabitý peptid, který nejen, že bránil interakci částic s jejich přirozeným vazebným místem na buněčných receptorech, ale navíc sloužil jako adaptér pro připojení fragmentů protilátek, které obsahovaly komplementárně nabitě fúzní peptidy. Takto tedy inzercí polyionického peptidu (Glu₈Cys) a následným připojením Fv fragmentu nádorově-specifické protilátky B3 připravili systém, který byl schopný se preferenčně vázat na nádorové buňky exprimující protilátkou rozpoznávaný antigen Lewis Y (STUBENRAUCH *et al.*, 2001). Tyto částice byly *in vitro* použity ke specifickému transferu reportérového genu do daných buněk. Zatímco cílení antigen exprimujících buněk bylo velice úspěšné, jen u velmi malé části z nich došlo k efektivnímu přenosu transportované DNA, pravděpodobně vlivem degradace částic v lysozomech (MAY *et al.*, 2002). Dalším konstruktem stejné výzkumné skupiny byl protein VP1-Z. Jednalo se o protein VP1 myšího polyomaviru, který obsahoval v HI smyčce inzert v podobě proteinu Z, imunoglobulin-vazebné domény *Staphylococcus aureus*. Tato sekvence sloužila jako vazebný modul pro nasednutí protilátek, které vedlo ke změně přirozeného tropismu částic a jejich přesnému zacílení (GLEITER a LILIE, 2001). Na pseudokapsidy tvořené VP1-Z byl připojen např. Herceptin, protilátka proti receptorové tyrozinové kináze ErbB2, což umožnilo cílení takovýchto částic na buňky exprimující příslušnou kinázu a ty transdukovat přenášeným reportérovým plazmidem (GLEITER a LILIE, 2003). Do HI smyčky VP1 myšího polyomaviru byla umístěna i hydrofilní komponenta preS1 sekvence viru hepatitidy B. Po imunizaci částicemi vzniklými samspořádáním tohoto chimerického proteinu byla pozorována silná protilátková odpověď proti nesenému antigenu a překvapivě došlo k utlumení jindy velmi vysoké produkce specifických protilátek vůči nosičovému VP1. Proliferace specifických cytotoxických buněk však při použití tohoto konstruktu detekována nebyla (SKRASTINA *et al.*, 2008). V naší laboratoři byl již dříve do HI smyčky vnesen epitop tvořený úsekem proteinu Bcr-Abl dlouhým 25 aminokyselin a sekvencí FLAG. Bohužel

tento konstrukt netvořil stabilní částice a navíc byla vložením cizorodého peptidu narušena schopnost částic rozeznávat kyselinu sialovou přítomnou na buněčných receptorech a následně účinně vstupovat do buněk (ŠPANILOVÁ, LUDVÍKOVÁ, nepublikované výsledky). Další vědecké skupina se dlouhodobě zabývá přípravou a úpravami částic odvozených od hlavního kapsidového proteinu křeččího polyomaviru (SASNAUSKAS *et al.*, 1999; GEDVILAITE *et al.*, 2000; GEDVILAITE *et al.*, 2004; LAWATSCHECK *et al.*, 2007; DORN *et al.*, 2008). Právě HaPyV VLPs sloužily jako základ pro vývoj vysoce imunogenních částic obsahujících vložený cizorodý epitop. V sekvenci VP1 byly na základě predikované 3D struktury vytypovány 4 oblasti, které by měly dobře snášet inzerci cizorodého epitopu. Pozice 1. se nacházela mezi aminokyselinami 80-89, 2. mezi rezidui 221-224, 3. mezi 243-247 a 4. mezi 288-295. Podle předpokladů měly tři z těchto čtyř míst být vystaveny na vnějším povrchu vzniklé pseudokapsidy. Oblast 2. se jako jediná nenacházela ve smyčkové oblasti, ale na začátku jednoho z β -listů proteinu VP1. Do předpovězených akceptorových oblastí byl vložen S1 epitop odvozený od preS1 regionu viru hepatitidy B dlouhý pět aminokyselin. Celkem bylo vytvořeno šest různých konstruktů – čtyři obsahovaly pouze jednu inzerci do jednotlivých předurčených míst, dva poté po dvou inzertech naráz (1 + 2 a 1 + 3). Všechny byly schopny úspěšně tvořit VLPs. Jak se ukázalo při *in vitro* analýze western blotem a enzymovou imunoanalýzou, antigenní vlastnosti nosičového VP1 se vložením epitopu nezměnily, zatímco imunoreaktivita vloženého peptidu silně závisela na místě inserce, protože jednotlivé částice se značně lišily ve schopnosti vázat specifickou protilátku. Protilátková odpověď testovaných myší proti S1 antigenu korespondovala s povrchovou lokalizací epitopu. Nejvíce specifických protilátek bylo produkováno jako odpověď na imunizaci částicemi nesoucími dva inzerty najednou. Z konstruktů s jediným vloženým epitopem byl nejúčinnější ve vzbuzení imunitní reakce ten, kde byla antigenní sekvence lokalizována v pozici 1. (GEDVILAITE *et al.*, 2000). V následující studii byly do stejných míst vloženy delší segmenty tentokrát odvozené od N-konce nukleokapsidového proteinu Puumala hantaviru, tvořené 45 nebo dokonce 120 aminokyselinami. Vložení do míst 1. a 4. umožnilo vysoce účinnou tvorbu VLPs, zatímco inserce do oblastí 2. a 3. vedlo k dramatickému snížení exprese rekombinantního proteinu i následné tvorby chimerických částic. Opět byly po imunizaci myší získány vysoké titry protilátek proti cizorodému antigenu, dokonce i pokud nebylo přidáno žádné adjuvans. Nejsilnější protilátkové odpovědi bylo dosaženo při použití imunogenní sekvence dlouhé 120 aminokyselin. Hantavirový antigen i

nosičový protein VP1 vyvolávaly shodně smíšenou Th1/Th2 odpověď, která byla ovšem v případě VP1 snížena při imunizaci částicemi s delším inzertem (GEDVILAITE *et al.*, 2004). Dalším antigenem vloženým do sekvence VP1 křeččího polyomaviru byl epitop rozeznávaný T-buňkami odvozený od karcinoembryonického antigenu CAP-1-6D, tzv. CEA. K inzerci CEA byla vybrána místa 1. a 4., do kterých byl vložen buď samostatně do každého zvlášť, nebo do obou najednou. Všechny konstrukty byly schopny úspěšně tvořit pseudokapsidy nezávisle na přítomnosti či nepřítomnosti flexibilních glycin-serinových spojek. Imunizované myši i přes absenci jakékoli adjuvantní látky vyvinuly protilátkovou odpověď nejen proti VP1, ale i proti nesenému epitopu CEA, ovšem úroveň reakce byla ovlivněna místem inserce, počtem inzertů a přítomností spojek. Jako nejvíce imunogenní se ukázal konstrukt nesoucí CEA v pozici 1. bez zjevného vlivu přidaného spojkového úseku. Navíc byly CEA-specifické protilátky u myši vakcinovaných těmito částicemi detekovatelné šest měsíců po poslední vyvolávací imunizaci (LAWATSCHECK *et al.*, 2007). V další studii byly umělé virové částice křeččího polyomaviru využity jako nosič pro epitop odvozený od lidského mucinu 1 (MUC1) rozpoznávaný v kontextu HLA-*A2 cytotoxickými T-lymfocyty. Tento antigen asociovaný s nádorem byl vložen nezávisle i současně do dvou míst VP1 HaPyV (opět pozice 1. a 4.). Všechny konstrukty byly, opět bez výrazné závislosti na flexibilní spojce, schopny tvořit intaktní částice. Částice se nijak nelišily od nemodifikovaných v otázkách vstupu do buněk či potenciálu vyvolat maturaci lidských dendritických buněk. Po společné kultivaci lidských dendritických buněk stimulovaných chimerickými VLPs s leukocyty periferní krve došlo k aktivaci MUC1-specifických CD8⁺ T-lymfocytů, což bylo doloženo sekrecí IFN γ těmito namnoženými T-buňkami. Nejsilnějšími induktory T-buněčných odpovědí *in vitro* byly pseudokapsidy nesoucí jediný inzert obklopený spojkovou sekvencí buď v pozici 1. anebo 4. Po imunizaci myši pseudokapsidami tvořenými rekombinantním proteinem VP1 se dvěma inzerty byly získány monoklonální protilátky specifické pro MUC1, které byly schopny specificky reagovat s lidskými nádorovými buňkami (DORN *et al.*, 2008).

Méně častou variantou je připojení cizorodého epitopu k C-konci molekuly VP1, což ale může vést k narušení přirozených vzájemných interakcí molekul hlavního strukturního proteinu a tak k zamezení vzniku intaktních částic. Tímto způsobem byly připraveny rekombinantní molekuly VP1 nesoucí na svém C-terminálním konci sekvence odvozené od ovalbuminu (OVA) nebo proteinu příbuzného tyrozináze 2 (TRP2). Oba byly schopny tvořit pentamery, ovšem u druhého konstruktu byla tvorba

intaktních částic výrazně narušena. Subkutánní vakcinace myši chimerickými částicemi tvořenými VP1-ovalbumin (OVA252-270) vyvolávaly specifickou, H-2Kb zprostředkovanou, odpověď CD8⁺ T-buněk vůči OVA257-264. Ovšem pouze dvojitá opakování imunizace s týdenním odstupem vyvolalo dostatečnou protektivní imunitu myši proti melanomovým buňkám exprimujícím ovalbumin (MO5). I chimerické pentamery nesoucí epitop ovalbuminu nebo tyrozináze příbuzného proteinu 2 měly indukční účinek na specifické CD8⁺ T-buňky a na modelu myšího melanomu prokázaly své pozitivní imunoterapeutické vlastnosti (BICKERT *et al.*, 2005; BRINKMAN *et al.*, 2007).

Další alternativou je kovalentní připojení proteinových epitopů nebo malých molekul k povrchu již sestavených purifikovaných pseudokapsid. Tento postup byl ale prozatím testován především na papillomavirových VLPs. Výhodou této metody možnost připojení celé řady odlišných molekul na preformované VLPs. Další předností je možnost selekce nejimunogenějších molekul, které budou vystaveny na povrchu částic, a které vyvolají co nejsilnější protilátkovou odpověď. Byly například připraveny biotinylované částice HPV, které byly kombinovány s TNF- α fúzovaným se streptavidinem. Takto modifikované pseudokapsidy dokázaly po imunizaci prolomit toleranci a vyvolat tvorbu protilátek proti příslušným autoantigenům. VLPs s epitopem TNF- α byly u myšího modelu použity k inhibici vývoje revmatoidní artritidy vyvolané kolagenem typu II (CHACKERIAN *et al.*, 2001). Vysoká hustota a pravidelné rozložení vystavených epitopů na vnější straně částic jsou zásadními faktory pro překonání tolerance a získání silné protilátkové odpovědi. Tato technika by tedy mohla být užitečná k získání imunitních odpovědí vůči neviróvým nádorovým antigenům, kde hrají i protilátky důležitou roli při odhojení nádoru.

Detailnější přiblížení úskalí jednotlivých modifikací částic a úspěchů dosažených při jejich použití následuje níže.

2.3.3.2.1. Imunitní odpovědi proti přirozeným polyomavirovým antigenům

Pseudokapsidy myšího polyomaviru byly s úspěchem použity k vakcinaci proti infekci MPyV, a to nejen u normálních, ale i u myši deficientních v T-buňkách (CD4^{-/-} CD8^{-/-}). K lepším výsledkům vedlo subkutánní podání oproti intraperitoneálnímu, bez výrazné závislosti na přítomnosti kompletního či nekompletního Freundova adjuvans (HEIDARI *et al.*, 2002; VLASTOS *et al.*, 2003). Nicméně titry anti-VLP protilátek byly obecně vyšší u normálních myši než u T-buněčně deficientních, nejspíše následkem

méně efektivního IgG přesmyku při absenci funkčních T-buněk. Účinnost MPyV VLPs coby vakcíny byla také porovnána s použitím fúzního proteinu vytvořeného z VP1 a glutathion-S-transferázy (GST-VP1). Tento konstrukt, snadno produkovatelný bakteriálním expresním systémem *E. coli*, sice tvoří dimery a pentamery, ale ne kompletní intaktní částice. Zatímco VLPs odvozené od myšího polyomaviru měly protektivní účinek na všechny myši včetně imunokompromitovaných, GST-VP1 sice zabránilo infekci 100% normálních myší, ale z $CD4^{-/-}CD8^{-/-}$ myší bylo ochráněno pouhých 60%, pravděpodobně v důsledku méně účinné produkce protilátek proti VP1. Zdá se tedy, že umělé virové částice jsou právě díky svému uspořádání a opakování struktur silnějšími imunogeny vyvolávajícími vrozenou i adaptivní odpověď (VLASTOS *et al.*, 2003).

Předpokládaným cílem T-buněčných imunitních odpovědí, které jsou schopny zabránit vývoji nádoru polyomavirového původu a zprostředkovávají i jeho odhojení, jsou peptidy odvozené od T-antigenů myšího polyomaviru prezentované pomocí MHC. Tyto peptidy jsou označovány jako nádorově specifické transplantační antigeny (TSTA) myšího polyomaviru. S ohledem na účinnost vakcín založených na VLPs by bylo velmi výhodné, kdyby kapsidové proteiny sloužily nejen jako terapeutické prostředky ale zároveň i jako cíl imunitní reakce. U některých MPyV tumorů skutečně dochází k expresi hlavního strukturního proteinu VP1, a proto by peptidy od něj odvozené mohly potenciálně sloužit jako TSTA. Tato hypotéza byla experimentálně prověřena očkováním pomocí MPyV VLPs, které mělo předejít propuknutí tří odlišných druhů nádorů vyvolaných myším polyomavirem. U jednoho z tumorů byla pozorována kompletní protekce, u dalšího částečná a u posledního nulová (FRANZÉN *et al.*, 2005).

Skutečnost, že VLPs odvozené od myšího polyomaviru mohou být využity k vakcinaci proti infekci MPyV i v kontextu T-buněčné deficiencie, dokazuje jejich imunostimulační účinky. Ty byly využity například k podpoření působení vakcinace pomocí plazmidu kódujícího nukleokapsidový protein viru HIV, který byl do myši vpraven metodou „gene gun“. Zatímco přidání 2 μ g VLPs k jednotné dávce 20 μ g plazmidu nemělo na výsledek vakcinace žádný vliv, 20 μ g a 100 μ g množství částic vedlo u části imunizovaných myší ke zvýšení humorální odpovědi. Tento účinek byl autory připisován právě potenciálně adjuvantním vlastnostem částic a schopnosti přenášet cizorodou DNA (ROLLMAN *et al.*, 2003).

2.3.3.2.2. Imunitní odpovědi proti cizorodým antigenům vyvolané chimerickými částicemi

Schopnost vyvolat reakci imunitních buněk proti antigenům virového i nevirového původu je velmi žádoucí při vývoji různých terapeutických i profylaktických vakcín. Proto byla soustředěna značná pozornost vědců na vývoj různých prostředků, které by tento účinek vykazovaly a zároveň ho v sobě spojovaly s dalšími důležitými vlastnostmi, jako jsou např. minimální nežádoucí účinky a tedy i bezpečnost pro ošetřený organizmus, relativně snadná příprava a způsob podání, nízké náklady spojené s výrobou a další. Jedním z velmi zásadních úkolů, před kterým stojí zástupci lékařů i vědců po celém světě, je vyvinutí účinné léčby nádorů, které v poslední době postihují čím dál více pacientů. Zhoubně transformované buňky zatím ale ve většině případů vytrvale odolávají snahám o eliminaci, a metod, úspěšně bojujících proti zhoubnému bujení buněk, je pořád zoufale málo. To je samozřejmě způsobeno mnoha faktory a nejspíš především skutečností, že nádory jsou útvary velmi individuálního a heterogenního charakteru. Při imunoterapii nádorů nevirového původu je hlavním cílem navodit imunitní odpověď proti autoantigenům, tedy prolomit bariéru tolerance ustavené vůči nádoru. Na protinádorové vakcíny jsou tím pádem kladeny velmi vysoké nároky. Použití VLPs v tomto kontextu by mohlo mít před sebou poměrně velkou budoucnost, nicméně zatím bylo různých studií zkoumajících vliv chimerických virových částic na vyvolání odpovědi proti nevirovým antigenům vypracováno jen omezené množství.

V několika takovýchto studiích byl použit coby autoantigen protoonkogen Her-2/*neu* (Her2), jehož exprese je zvýšena v 10-40% případů nádorů prsu, glioblastomů, nádorů vaječníku, karcinomů ledvinných buněk a dalších typech tumorů. Transformovaný fenotyp navíc často závisí na expresi Her-2/*neu* a u některých pacientů majících Her-2/*neu* pozitivní rakovinu prsu byla identifikována imunitní odpověď namířená právě proti tomuto nádorovému antigenu, což naznačuje, že tolerance vůči němu může být prolomena. Proto byla zkoumána možnost vyvolat imunitní odpověď proti Her-2/*neu* pomocí chimerických částic odvozených od MPyV. Za tímto účelem byla extracelulární a transmembránová část lidského Her-2/*neu* fúzována s minoritním proteinem VP2 myšího polyomaviru. Fúzní protein byl poté koexprimován společně s VP1 bakulovirovým produkčním systémem. Z hmyzích buněk byly následně izolovány a purifikovány pseudokapsidy obsahující několik málo kopií VP2-Her2. Pokusy s vakcinací těmito částicemi byly provedeny na dvou odlišných nádorových *in*

vivo modelech. Prvním z nich byl model odhojení nádoru, kdy byly myši vystaveny působení nádorové buněčné linie exprimující lidský Her2 protein. Druhým modelem pak byly transgenní myši BALB-*neuT* nesoucí aktivní mutovaný krysí gen pro Her-2/*neu*, u kterých ve stáří 15 týdnů docházelo k vývoji *neuT*-indukovaných nádorů ve všech mléčných žlázách. Jediná 50 µg dávka Her2 VLPs stačila k vyvolání plné ochrany proti vývoji nádoru u obou modelů. U modelu rejekce nádoru byla vakcinace provedena 14 dní před inokulací nádoru. Terapeutickou imunitní odpověď proti stejnému Her2- pozitivnímu nádoru bylo možné získat už 6 dní po inokulaci nádoru při imunizaci 50 µg Her2 částicemi spolu s CpG. V případě transgenního modelu, bylo k získání kompletní protekce nutné, aby byla vakcinace provedena u myši starých 6 týdnů. Pokud byla imunizace provedena až později, ve stáří 10 týdnů, ochranný efekt byl zpožděn. Při podání vakcíny myším, které dosáhly věku 14 týdnů, už nebyl pozorován žádný protektivní účinek. Ani u jednoho z modelů nebyla pozorována protilátková odpověď proti Her2. Ochrana vyvolaná vakcinací je s nejvyšší pravděpodobností způsobena buněčnou složkou imunitní odpovědi, přičemž přítomnost Her2 specifických buněk byla prokázána testem ELISPOT. Zdá se tedy, že chimerické částice nesoucí Her2 fúzní protein představují bezpečnou a účinnou vakcínu proti nádorům exprimujícím Her2 (TEGERSTEDT *et al.*, 2005). Stejná výzkumná skupina připravila ještě další chimerické částice odvozené od jiného polyomaviru, myšího pneumotropního viru (MPtV), nesoucí stejný antigen, a to část proteinu Her-2/*neu*. Opět se zabývala profylaktickým a terapeutickým potenciálem těchto částic cíleným proti nádorům exprimujícím Her-2/*neu*. Imunizace částicemi s lidskou variantou Her2 v kombinaci CpG aplikovaná 6 dní po vnesení D2F2/E2 buněk, exprimujících lidský Her2, měla terapeutické účinky a vedla k odhojení k nádorových buněk (ANDREASSON *et al.*, 2009). Chimerické pseudokapsidy odvozené od myšího pneumotropního viru obstály v modelu odhojení nádoru coby profylaktická vakcína stejně dobře, jako obdobné částice myšího polyomaviru v předchozí studii (ANDREASSON *et al.*, 2009). Další ze série švédských studií potvrdila, že chimerické částice odvozené od MPtV stimulují nejen CD8⁺ buňky, jejichž role v odhojení nádoru byla prokázána, ale i další součásti imunitního systému, jejichž úloha v tomto procesu zatím nebyla zkoumána. Podle výsledků získaných na pokusných myších deficientních v různých složkách imunitního systému vědci usoudili, že CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocyty mohou v odhojení nádoru po vakcinaci působit do jisté míry nezávisle, protože pouze u zvířat s depletovanými CD4^{-/-} i CD8^{-/-} T-buňkami došlo k úplné ztrátě ochrany před vývojem nádoru. V kombinaci s

CpG byly navíc tyto chimerické pseudokapsidy schopny navodit dlouhodobou imunologickou paměť přetrvávající minimálně 10 týdnů (ANDREASSON *et al.*, 2010).

V naší laboratoři byly připraveny částice obsahující zkrácenou formu minoritního proteinu VP3 fúzovanou se 171 aminokyselin dlouhým epitopem odvozeným od proteinu Bcr-Abl a značkou v podobě FLAG sekvence. Skupina proteinů Bcr-Abl jsou samy taktéž fúzními proteiny vytvořené následkem reciproké translokace mezi chromozomy 9 a 22, ke které dochází při chronické myeloidní leukémii (CML). Ke zlomům chromozomů dochází právě v oblastech genů bcr a abl a jejich spojením tak vznikají naprosto unikátní sekvence. Právě z důvodů jedinečnosti Bcr-Abl a jeho výskytu pouze v leukemických buňkách byl tento protein vybrán jako autoantigen pro přípravu imunoterapeutických chimerických VLPs, které měly sloužit k léčbě CML. Částice vyizolované z hmyzích buněk byly trochu větší a méně pravidelné než VLPs divokého typu, nicméně byly stabilní. Obsahovaly 11-12 molekul rekombinantního proteinu FLAG-Bcr-Abl-tVP3 a úspěšně vstupovaly do savčích buněk. Bohužel se ukázalo, že imunizace pomocí těchto částic sice vyvolává silnou protilátkovou odpověď proti proteinu VP1, ale nevede k produkci protilátek proti Bcr-Abl, ani aktivaci cytotoxických T-buněk specifických pro Bcr-Abl (HRUŠKOVÁ *et al.*, 2008).

Ve studiích BRINKMAN *et al.* (2005) a BICKERT *et al.* (2007) byl použit již zmíněný ovalbuminový epitop exprimovaný myším melanomem. Tento epitop byl vložen přímo na C-konec VP1. Částice vzniklé z tohoto chimerického proteinu byly použity i inokulací myší 4 a 11 dní po vnesení melanomových buněk. Tento přístup poskytl myším kompletní ochranu vůči vývoji nádoru a byla pozorována přítomnost CD8⁺ T-buněk specifických pro ovalbuminový epitop.

Jedním ze způsobů, kterým lze dosáhnout zvýšení odpovědi T-buněk po vakcinaci VLPs, je před samotnou vakcinací předložit částice a antigeny ke zpracování dendritickým buňkám *in vitro* a ty poté podat zpět imunizovanému zvířeti. Pseudokapsidy jsou dendritickými buňkami přijímány spontánně, bez potřeby předchozího speciální ošetření. Ovšem ne všechny částice stimulují maturaci dendritických buněk stejně efektivně. Zatímco u pseudokapsid myšího a křeččího polyomaviru byl pozorován pozitivní vliv na dozrávání dendritických buněk a následnou produkci IL-12 a stimulaci CD8⁺ T-buněčných odpovědí, částice primátích polyomavirů včetně lidských virů JC a BK tento účinek nevykazovaly (GEDVILAITE *et al.*, 2006). Nicméně ne všechny studie provedené s částicemi odvozenými od myšího polyomaviru vedly k podobným závěrům. Zatímco BICKERT *et al.* (2007) zaznamenali

po stimulaci pseudokapsidami MPyV zvýšenou expresi povrchových markerů dendritických buněk naznačující jejich maturaci, skupiny TEGERSTEDT *et al.* (2007) ani BOUŘA *et al.* (2005) při svých *in vitro* pokusech podobně pozitivních výsledků nedosáhli. Nicméně ve všech těchto případech bylo dosaženo zvýšené produkce IL-12 dendritickými buňkami (BOUŘA *et al.*, 2005; BICKERT *et al.*, 2007; TEGERSTEDT *et al.*, 2007). Ke stejným závěrům, tedy ke konstatování žádných výrazných změn v expresi povrchových molekul dendritických buněk a zvýšení sekrece IL-12, dospěli i ANDREASSON *et al.* (2009) při použití chimerických částic odvozených od myšího pneumotropního viru. V případě částic křeččího polyomaviru byly výsledky studií mnohem jednodušší (GEDVILAITE *et al.*, 2006; DORN *et al.*, 2008).

Při vakcinaci *in vivo* vstupují částice do širokého spektra buněk. K podpoření přednostní vazby na dendritické buňky je tedy možné před vakcinací *in vivo* inkubovat VLPs s dendritickými buňkami *in vitro*. Tak by mělo být zajištěno, že velké množství VLPs nesoucích vložený antigen vstoupí dovnitř „správných“ buněk a tím je zvýšena pravděpodobnost vyvolání účinné imunitní odpovědi.

U modelu odhojení nádoru exprimujícího Her2 (popsán např. v TEGERSTEDT *et al.*, 2005) bylo možné po inkubaci s dendritickými buňkami snížit imunizační dávku až 10x (na 5 µg) při zachování stejného účinku vakcinace. Došlo tedy k ochraně 100% ošetřených zvířat i po jediné imunizaci dendritickými buňkami, kterým byla ke zpracování předložena 5 µg dávka VLPs nesoucích fúzní protein VP2-Her2. Dalším příznivým účinkem bylo šestinásobné snížení protilátkové odpovědi proti VLPs, ovšem bez snížení účinnosti imunizací. Ať už byly k vakcinaci použity chimerické částice samotné či zpracované dendritickými buňkami, byla prokázána specifická odpověď T-buněk proti Her2 avšak produkce Her2-specifických protilátek detekována nebyla. Stejně tak nebyla *in vitro* pozorována maturace dendritických buněk způsobená chimerickými pseudokapsidami, ale naproti tomu byla výrazně zvýšena produkce IL-12 (TEGERSTEDT *et al.*, 2007).

3. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Laboratoř virologie PřF UK se dlouhodobě zabývá studiem polyomavirů, včetně jejich případného terapeutického využití. Jedním ze směrů našeho výzkumu je vývoj různých viru podobných částic odvozených od kapsidových proteinů myšího polyomaviru, které by mohly sloužit jako vektor terapeutických molekul v genové terapii či imunoterapii.

Hlavním cílem této práce bylo zkonstruovat chimerické VLPs nesoucí v DE smyčce proteinu VP1 epitop maligního melanomu. Pro účely konstrukce byla vybrána mutantní forma VP1 proteinu (nazvaná VP1_7less), zkrácená o 7 aminokyselin (GARCIA *et al.*, 2000). Předpokladem, ze kterého návrh konstruktů vychází, je, že odstraněním části VP1 a jejím nahrazením cizorodým epitopem nebude velikost a snad ani stabilita rekombinantního proteinu změněna natolik, aby dopad tohoto zásahu do struktury částic zásadně měnil jejich vlastnosti. Pro konstrukci byly zvoleny tři různé cizorodé epitopy – kontrolní ovalbuminový (10 aminokyselin) a dva melanomové (myší a lidský). Oba epitopy v rozsahu 8 aminokyselin jsou odvozeny od melanomového proteinu Melan-A/MART-1, jejich sekvence se ovšem odlišuje v jediné aminokyselině.

Druhým záměrem bylo produkovat VLPs odvozené od hlavního strukturního proteinu lidského viru JC, které by mohly být použity k různými imunologickým aplikacím. K tomuto účelu byl taktéž zvolen systém Bac-to-Bac.

Konkrétní cíle této diplomové práce tedy byly následující:

- 1. a) Zkonstruovat 3 typy rekombinantního proteinu VP1 nesoucího cizorodý epitop a exprimovat je pomocí systému Bac-to-Bac v hmyzích buňkách Sf9**
 - „ovalbuminové“ VLPs, nesoucí epitop kuřecího ovalbuminu SIINFEKL
 - „myší melanomové“ VLPs, nesoucí epitop myšího melanomového proteinu Melan-A/MART-1 EAAGIGILIV
 - „lidské melanomové“ VLPs, nesoucí epitop lidského melanomového proteinu Melan-A/MART-1 EAAGIGILTV
 - b) ověřit jejich stabilitu**
 - c) ověřit jejich schopnost vstupovat do buněk**
- 2. Připravit VLP odvozené od lidského polyomaviru JC pro imunizační a screeningové účely, taktéž systémem Bac-to-Bac.**

4. MATERIÁL A METODY

4.1. MATERIÁL

4.1.1. Použité přístroje

Analytické váhy Pioneer (Schoeller Pharmacia Praha)
Aparatura pro horizontální agarózovou DNA elektroforézu multiSub Mini (Clever Scientific)
Aparatura pro SDS-PAAGE SE 260 (Hofer)
Aparatura pro western blot TE 22 (Amersham Biosciences)
Centrifuga Beckman Centrifuge GS-15R, rotor S4180 (Beckman)
Centrifuga Megafuge 1.0R (Heraeus Sepatech)
Centrifuga Microfuge Lite 16, rotor A46544 (Beckman)
Centrifuga Microfuge Lite, rotor F1802 (Beckman)
Centrifuga Microfuge R, rotor F241,5 (Beckman)
Centrifuga MiniSpin plus, rotor IL 016 (Eppendorf)
Centrifuga 3K30, rotory 12171, 12154-H, 18776-H (Sigma)
Centrifuga s výkyvným rotorem MSE (MSE)
CO₂ termostat (Forma Scientific)
Elektronový mikroskop JEOL JEM 1200EX
Elektroporátor Gene Pulser Apparatus (Biorad)
Fluorescenční mikroskop BX-60 (Olympus)
Fluorescenční invertovaný mikroskop IX71 (Olympus)
Chladicí a vyhřívací termoblok BIOSAN typ CH-100 s blokem CH-2, 20x1,5 ml
Invertovaný mikroskop (Carl Zeiss-Jena)
Invertovaný mikroskop Olympus CK40 (Olympus)
Konfokální mikroskop Leica TCS SP2 (Leica)
Kultivační třepačka Orbital Shaker (Forma Scientific)
Kultivační třepačka Orbi-Safe TS (Gallenkamp)
Laminární box (Forma Scientific)
Lupa s bočním osvětlením (Olympus)
Magnetická míchačka B212 (Bibby)
Magnetická míchačka Bigsquid (Ika)
Nanodrop – Spektrofotometr ND-1000 (NanoDrop Technologies)
PCR cykler Mastercycler EPgradient S (Eppendorf)
pH metr PH 114 (Snail Instruments)

pH metr S20 SevenEasy (Mettler Toledo)
Refraktometr ABBE (Carl Zeiss-Jena)
Rozkládač gradientu (Beckman)
Sonikátor Bransonic 5 (Cole-Parmer Instrument Company)
Sonikátor Soniprep 150 (Schoeller Pharmacia Praha)
Sonikátor UP50H (Schoeller Pharmacia Praha)
Spektrofotometr Helios β (Thermo Electron Corporation)
Svářečka fólií Bio-Vacufresh 2 (MIA)
Termostat TCH 100 (laboratorní přístroje Praha)
Třepačky (Labnet, Lab Therm)
Ultracentrifuga Optima L-90K, rotor SW 41 (Beckman)
UV transluminátor (BioLum)
Vortex-Genie 2 (Scientific Industries)
Vodní lázeň SUB (Grant)
Zdroj elektrického napětí Consort EV265 (Isogen)
Zdroj elektrického napětí E-C Apparatus EC3000P (Lehman)
Zdroj elektrického napětí Gene Line Power Supply (Beckman)
Zdroj elektrického napětí OSP-250L Power Supply (Lightning Volt)

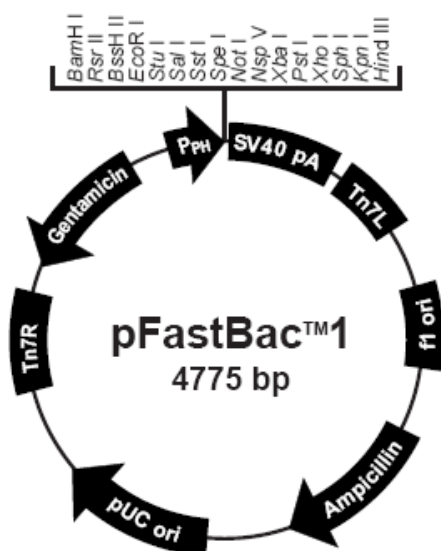
4.1.2. Chemikálie

Chemikálie	Výrobce
Agaróza	Sigma, Serva
Akrylamid	Serva
Amonium persulfát	Serva
Ampicilin	Léčiva
Antibiotika pro TK	KRD
Baktopepton	Imuna
Bovinní sérum albumin (BSA)	Sigma
Bromfenolová modř (BFM)	Lachema
Bromo-chloro-indolyl-galactopyranosid (X-gal)	Fermentas
Cesium chlorid (CsCl)	Serva
Coomassie Brilliant Blue G250 (CBB)	Serva
Disodná sůl kyseliny diethyltetraoctové (EDTA)	Sigma
dNTP	Sigma
Dithiotreitol (DTT)	Roche
Ethanol	Lachema
Ethidium bromid	Lachema
Fenol	Lachema
Fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Fetální telecí sérum (FCS)	Sigma
Gentamicin	Gibco
Glycerol	Lachema
Glukóza	Serva
Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného	Lachema
HEPES (kyselina 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperaziny] ethansulfonová)	Sigma
Hydroxyd sodný	Lachema
Chlorid draselný	Lachema
Chlorid sodný	Sigma
Chlorid hořečnatý	Lachema
Chlorid vápenatý	Sigma
Chloroform	Lachema

Isopropyl- β -D-thiogalaktosid (IPTG)	Fermentas
Izopropanol	Lachema
Kanamycin	Sigma
Kyselina boritá	Serva
Kyselina fosforečná	Lachema
Kyselina chloristá	Lachema
Kyselina chlorovodíková	Lachema
Kyselina octová	Lachema
Kyselina p-kumarová	Sigma
Kvasničný autolyzát	Imuna
L-glutamin	Sigma
LUMINOL	Serva
β -merkatoethanol	Serva
Methanol	Lachema
<i>N,N'</i> -methylenbisakrylamid	Serva
Nonidet P-40 (NP-40)	Sigma
Octan draselný (KAc)	Lachema
Octan hořečnatý (MgAc ₂)	Lachema
Octan sodný (NaAc)	Lachema
Polyethylenglykol (PEG)	Serva
SeaPlaque agaróza	FMC BioProducts
Síran hořečnatý	Lachema
Dodecylsulfát sodný (SDS)	Sigma
Tetracyklin	Sigma
<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Sigma
Triton X-100	Sigma
Verzen	Sevac
Živný agar č. 2 (ŽA č. 2)	Imuna
Živný bujón č. 2 (ŽB č. 2)	Imuna

4.1.3. Použité plazmidy

- pFastBac 1 (Invitrogen)** Vektorový plazmid firmy Invitrogen určený pro systém Bac-to-Bac. Obsahuje silný polyhedrinový promotor. Slouží k expresi proteinů v hmyzích buňkách. Selektce pomocí amp^r a gen^r . Mapa plazmidu je na obr. 3.1.
- pFastBac Dual (Invitrogen)** Bakulovirový transferový vektor, který je součástí Bac-to-Bac expresního systému. Obsahuje dva silné promotory (polyhedrinový a p10), což umožňuje současnou expresi dvou proteinů v hmyzích buňkách. Selektce je možná pomocí amp^r a gen^r . Mapa plazmidu je na obr. 3.2.
- pMJG** Plazmidový vektor odvozený od plazmidu pMJ1, do kterého je vložen kompletní genom MPyV linearizovaný enzymem EcoRI (KRAUZEWICZ *et al.*, 1990; poskytnuto Mgr. Lenkou Horníkovou).
- pBRJCV-MAD-1** Plazmidový vektor odvozený od plazmidu pBR322, do kterého je vložen celý genom JCV kmene MAD-1 linearizovaný enzymem EcoRI (poskytnuto ÚHKT)

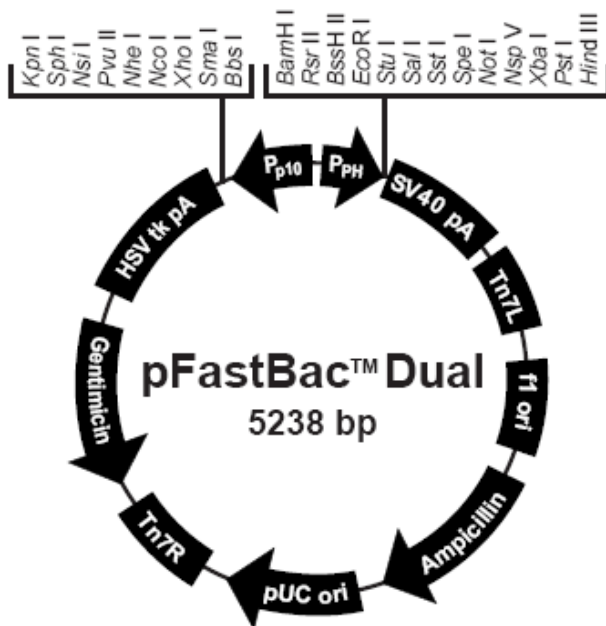


Obr. 3.1.: Mapa plazmidu pFastBac 1

Plazmid obsahuje silný polyhedrinový promotor, pro zajištění exprese vloženého genu. Za promotorem je umístěn polylinker s cílovými místy pro štěpení restrikčními endonukleázami (označovaný též Multiple Cloning Site, MCS). Plazmid nese geny pro rezistenci ke gentamicinu a ampicilinu.

Převzato z

http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pfastbac1_map.pdf



Obr. 3.1.: Mapa plazmidu pFastBac Dual

Plazmid obsahuje dva silné promotory (polyhedrinový a p10), pro zajištění exprese vložených genů. Za promotory jsou umístěny polylinkery s cílovými místy pro štěpení restrikčními endonukleázami. Plazmid nese geny pro rezistenci ke gentamicinu a ampicilinu.

Převzato z

http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pfastbacdual_map.pdf

4.1.4. Použité buněčné linie

- **Sf9** Stabilní linie hmyzích buněk odvozená z tkání ovarií motýla *Spodoptera frugiperda*
- **NIH 3T6** Stabilní buněčná linie myších fibroblastů (poskytnuto prof. Griffin, Royal Postgraduate School, London)
- **B16-F10** Stabilní buněčná linie myších melanomových buněk (poskytnuto RNDr. Vratislavem Horákem, Csc.; ÚŽFG AV ČR; Sekce embryologie živočichů, buněčné a tkáňové diference; Laboratoř biologie nádorů; Liběchov)

4.1.5. Použité bakteriální kmeny

- ***Escherichia coli* XL-1 Blue** [recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)] (poskytnuto Mgr. Martinem Fraiberkem).

- *Escherichia coli* **DH10Bac** [F- mcrA (mrr-hsdRSM-mcrBC) f80lacZDM15 lacX74 deo R recA1 endA1 araD139 (ara, leu)7697 ga/U ga/K – rpsL nupG/bMON14272/pMON7124] (poskytnuto Mgr. Martinem Fraiberkem)

4.1.6. Primery pro PCR reakce

- Syntéza veškerých primerů byla zajištěna firmou KRD.

Primer MPyV VP1_1F: 5' GAT GAT GAA TTC **ATG** GCC CCC AAA AGA AAA **AGC GGC** 3'

Červeně je vyznačeno restrikční místo pro **EcoRI**, zeleně iniciační kodon a tučně modře sekvence komplementární k amplifikovanému genu.

Primer MPyV VP1_2R: 5' GAT GAT GGA TCC TGA GCC GCT ACC **GGG TTT** **GTT GAA CCC ATG** 3'

Červeně je vyznačeno restrikční místo pro **BamHI**, tučně modře sekvence komplementární k amplifikovanému genu.

Primer MPyV VP1_3F: 5' GAT GAT GGA TCC GGG TCT GGC TCT **GGA ATT** **TCC ACT CCA GTG** 3'

Červeně je vyznačeno restrikční místo pro **BamHI**, tučně modře sekvence komplementární k amplifikovanému genu.

Primer MPyV VP1_4R: 5' GCT GCT GGT ACC **TTA** **ATT TCC AGG AAA TAC** **AGT CTT TG** 3'

Červeně je vyznačeno restrikční místo pro **KpnI**, zeleně stop kodon a tučně modře sekvence komplementární k amplifikovanému genu.

Primer MELAN-A (L)1: 5' GA TCC **GAG GCC GCT GGG ATC GGC ATC CTG** **ACA GTG** G 3'

Tučně modře vyznačena sekvence odpovídající danému epitopu.

Primer MELAN-A (L)2: 5' GA TCC **CAC TGT CAG GAT GCC GAT CCC AGC GGC CTC** G 3'

Tučně modře vyznačena sekvence odpovídající danému epitopu.

Primer MELAN-A (M)1: 5' GA TCC **GAG GCC GCA GGG ATC GGC ATC CTG ATC GTG** G 3'

Tučně modře vyznačena sekvence odpovídající danému epitopu.

Primer MELAN-A (M)2: 5' GA TCC **CAC GAT CAG GAT GCC GAT CCC TGC GGC CTC** G 3'

Tučně modře vyznačena sekvence odpovídající danému epitopu.

Primer OVA 1: 5' GA TCC **AGT ATA ATC AAC TTT GAA AAA CTG** G 3'

Tučně modře vyznačena sekvence odpovídající danému epitopu.

Primer OVA 2: 5' GA TCC **CAG TTT TTC AAA GTT GAT TAT ACT** G 3'

Tučně modře vyznačena sekvence odpovídající danému epitopu.

4.1.7. Epitopy

- Syntéza epitopů ve formě ssDNA byla zajištěna firmou KR.D.

P znázorňuje fosforylaci 5' konce epitopů. Tučně modře jsou vyznačeny sekvence odpovídající danému epitopu.

Epitop MELAN-A (L)1: 5' P-GA TCC **GAG GCC GCT GGG ATC GGC ATC CTG ACA GTG** G 3'

Epitop MELAN-A (L)2: 5' P-GA TCC **CAC TGT CAG GAT GCC GAT CCC AGC GGC CTC** G 3'

Epitop MELAN-A (M)1: 5' P-GA TCC **GAG GCC GCA GGG ATC GGC ATC CTG ATC GTG** G 3'

Epitop MELAN-A (M)2: 5' P-GA TCC **CAC GAT CAG GAT GCC GAT CCC**
TGC GGC CTC G 3'

Epitop OVA 1: 5' P-GA TCC **AGT ATA ATC AAC TTT GAA AAA CTG** G 3'

Epitop OVA 2: 5' P-GA TCC **CAG TTT TTC AAA GTT GAT TAT ACT** G 3'

4.1.8. Antibiotika

Ampicilin (Léčiva) – používaná konečná koncentrace 100 µg/ml

Kanamycin (Sigma) – používaná konečná koncentrace 50 µg/ml

Gentamicin (Gibco) – používaná konečná koncentrace 7 µg/ml

Tetracyklin (Sigma) – používaná konečná koncentrace 10 µg/ml

Směs antibiotik pro tkáňové kultury (Sigma): 100x koncentrovaný roztok obsahuje 10000 jednotek/ml penicilinu, 10 mg/ml streptomycinu, 25 mg/ml amphotericinu B

4.1.9. Protilátky

4.1.9.1. Primární protilátky

Myší monoklonální protilátka proti proteinu VP1 myšího polyomaviru. Pro western blot a dot-blot ředěno 10x (FORSTOVÁ *et al.*, 1993)

Králičí polyklonální protilátka proti VP1 proteinu myšího polyomaviru. Pro nepřímé imunofluorescenční značení ředěno 1500x (připravena v naší laboratoři)

Králičí polyklonální protilátka proti melanovému proteinu Melan-A. Pro western blot a dot-blot ředěno 50x (Santa Cruz)

Králičí polyklonální protilátka proti kuřecímu ovalbuminu. Pro western blot a dot-blot ředěno 1000x (Abcam)

Králičí polyklonální protilátka proti proteinu VP1 viru SV40. Pro western blot a dot-blot ředěno 500x (Abcam)

Myší polyklonální protilátka proti tubulinu, klon TU-O2. Pro nepřímé imunofluorescenční značení ředěno 100x (EXBIO Praha)

4.1.9.2. Sekundární protilátky

Kozí protilátka proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s Alexa Fluor 546. Pro imunofluorescenční značení ředěno 1000x (Molecular Probes).

Kozí protilátka proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou.

Pro western blot a dot-blot ředěno 1000x (Pierce).

Kozí protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s Alexa Fluor 488. Pro imunofluorescenční značení ředěno 1000x (Molecular Probes).

Kozí protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou.

Pro western blot a dot-blot ředěno 1000x (Bio-Rad).

Oslí protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s Alexa Fluor 488. Pro imunofluorescenční značení ředěno 1000x (Molecular Probes).

4.2. METODY

4.2.1. Sterilizace

Roztoky, špičky na pipety a mikrozkušavky byly sterilizovány v autoklávu 30 minut, při tlaku 120 kPa a teplotě 127 °C. Sklo bylo sterilizováno horkým vzduchem 3 hodiny při teplotě 160°C. Roztoky, které nemohou být sterilizovány pomocí autoklávu, byly filtrovány pomocí prefiltru a sterilního filtru s póry o velikosti 0,22 µm. Umělohmotné centrifugační zkumavky byly sterilizovány 24 hodin kyselinou peroctovou. Pinzety, kovové lžičky, mikrobiologické klíčky a hokejky byly sterilizovány namočením v ethanolu a vyžiháním v plameni.

Materiál:

Denaturovaný ethanol

4.2.2. Práce s bakteriálními kulturami

4.2.2.1. Kultivace bakterií

Kultivace bakterií probíhala v tekutém médiu (Živný bujón č. 2, ŽB č. 2) v třepačce při 37 °C přes noc (16 – 18 hodin) nebo na pevném médiu (Živný agar č. 2, ŽA č. 2). Do médií byla podle plazmidem nesených rezistencí přidána příslušná selekční antibiotika (viz kapitola 4.1.8.)

Materiál:

ŽA č. 2 (Imuna)

ŽB č. 2 (Imuna)

Antibiotika (viz kapitola 4.1.8.)

4.2.2.2. Příprava kompetentních bakterií pro elektroporaci

Bakterie z konzervy byly zaočkovány do 10 ml média TPN v Erlenmeyerově baňce. Suspenze bakterií byla kultivována přes noc v třepačce (150 rpm, 37 °C). Po inkubaci byla suspenze 25x naředěna a následně byla změřena optická denzita při 560 nm (spektrofotometr Helios β). Následně byla bakteriální kultura naředěna do 400 ml TPN tak, aby výsledná optická denzita po zaočkování byla $A = 0,1$. Poté byla kultura dále pěstována v třepačce při 150 rpm a 37 °C. Po 1,5 h byla znovu změřena optická

denzita kultury, která má dosáhnout hodnoty 0,5 – 0,7. Další měření byla provedena s 20 minutovým a 5 minutovým odstupem. Po dosažení příslušné hodnoty OD byla bakteriální suspence rozdělena do osmi 50 ml zkumavek Falcon a centrifugována (4000 g, 10 min, 4 °C). Buněčné pelety byly resuspendovány v každé zkumavce v 50 ml sterilní ddH₂O a opět zcentrifugovány (4000 g, 10 min, 4 °C). Sedimenty byly resuspendovány ve 25 ml ddH₂O a suspence byly následně spojeny do čtyř zkumavek a znovu centrifugovány (4000 g, 10 min, 4 °C). Každý ze sedimentů byl po centrifugaci resuspendován ve 4 ml 10% glycerolu a suspence byly převedeny do 2 zkumavek a opět centrifugovány (4000 g, 10 min, 4 °C). Pelet byl resuspendován v 8 ml 10% glycerolu a naposledy centrifugován (4000 g, 10 min, 4 °C). Nakonec byly bakterie resuspendovány v 800 µl 10% glycerolu a rozděleny po 100 µl alikvótách do mikrozkušavek a ihned zamrazeny v tekutém dusíku a uskladněny v hlubokomrazícím boxu při -80 °C. Kompetence bakterií byla ověřena zkušební elektroporací plazmidové DNA.

Materiál:

ŽA č. 2 (Imuna)

TPN médium (2% pepton pro bakteriologii; 0,5% kvasničný extrakt; 0,5% NaCl)

10% glycerol

4.2.2.3. Elektroporace plazmidové DNA do kompetentních bakterií *E. coli* XL1-Blue nebo *E. coli* DH10Bac

Kompetentní bakterie byly rozmrazeny na ledu (tedy při 0 °C). K 50 µl bakterií byl přidán 1 – 2 µl plazmidové DNA (podle toho o jaký plazmid se jednalo) a směs byla 1 minutu ponechána na ledu. Poté byla pomocí pipety přenesena do elektroporační kyvety vychlazené na 0 °C. Na elektroporátoru byly nastaveny hodnoty 25 µF, 2,5 kV, 200 Ω, 2 mm a následně byl aplikován puls (optimální délka pulsu je 5 ms ± 0,5 ms). K bakteriím byl neprodleně přidán 1 ml SOC média a suspence byla přenesena do sterilní 100 ml Erlenmeyerovy baňky a 1 hodinu třepána při 155 rpm a 37°C. Po kultivaci byly bakterie vysety na plotny s pevným médiem s přídatkem příslušných antibiotik (ŽA č. 2) a kultivovány přes noc (cca 16 – 18 hodin) v termostatu při 37 °C.

Materiál:

SOC médium (2% pepton pro bakteriologii; 0,5% kvasničný autolyzát; 10 mM NaCl;

2,5 mM KCl; 20 mM glukóza; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄)

MgCl₂ (100 mM zásobní roztok)

MgSO₄ (100 mM zásobní roztok)

Glukóza (filtrovaná pomocí prefiltru a sterilního filtru s průměrem pórů 22 μm)

ŽA č. 2 (Imuna)

4.2.2.4. Příprava konzerv z bakterií *E. coli*

Bakterie byly pěstovány v živném bujónu č. 2 s příslušným antibiotikem přes noc při 37 °C za soustavného třepání (155 rpm). Pak byly rozděleny po 400 μl do mikrozkuvek a ke každé alikvotě bylo přidáno 400 μl 40% glycerolu, takže výsledná koncentrace glycerolu byla 20%. Konzervy byly skladovány v hlubokomrazícím boxu při – 80 °C.

Materiál:

40% glycerol

ŽB č. 2 (Imuna)

4.2.3. Práce s tkáňovými kulturami

4.2.3.1. Práce s kulturou hmyzích buněk Sf9

4.2.3.1.1. Pasážování hmyzích buněk

Kultura hmyzích buněk Sf9 byla pěstována na Petriho miskách o průměru 6 nebo 10 cm v médiu TNM-FH s 10% sérem. Po dosažení konfluence byla oškrábána do média a převedena do 50 ml centrifugační zkušavky Falcon. K suspenzi buněk bylo přidáno TNM-FH médium vytemperované na laboratorní teplotu v poměru 1:4 a vzniklá směs byla resuspendována opakovaným protažením skleněnou pipetou. Buňky byly pomocí skleněné pipety vysety na nové sterilní Petriho misky a pokud nebyly v den pasáže použity k infekci či transfekci, byly inkubovány v termostatu při 28 °C po dobu 3-4 dnů a poté zpracovány na lyzát (viz kapitola 4.2.5.1.) nebo znovu zpasážovány.

Materiál:

TNM-FH médium (Sigma)

10% FBS (Sigma)

Směs antibiotik pro tkáňové kultury (Sigma; viz. kapitola 4.1.8.)

4.2.3.1.2. Transfekce hmyzích buněk rekombinantním bakmidem

Petriho miska s konfluentně narostlou kulturou hmyzích buněk Sf9 byla oškrábána do média a suspenze byla převedena do sterilní zkumavky Falcon. Na sterilní misku o průměru 6 cm bylo vyseto 2×10^6 buněk a množství bylo doplněno do 5 ml médiem TNM-FH bez séra. Po přisednutí buněk (1 hodina) bylo bezsérové médium odsáto a byly přidány 2 ml TNM-FH s 10% sérem a antibiotiky. Byla připravena transfekční směs: 50 μ l 2,5 M CaCl_2

10 nebo 15 μ l bakmidové DNA (viz kapitola 4.2.4.13.)

940 nebo 935 μ l HEBS roztoku

Tato směs byla opatrně promíchána, 30 minut inkubována při laboratorní teplotě a poté opatrně rovnoměrně po kapkách přidána na kulturu buněk. Následovala inkubace 4 hodiny při 28 °C. Po uplynutí této doby bylo médium odsáto, buňky opláchnuty 5 ml sérového TNM-FH, zality 5 ml čerstvého média s 10% sérem a antibiotiky a inkubovány 4 – 6 dní při 28 °C. Médium bylo následně použito k získání rekombinantního bakuloviru pomocí plakových zkoušek (viz kapitola 4.2.3.1.4.).

Materiál:

TNM-FH médium (Sigma)

10% FBS (Sigma)

Směs antibiotik pro tkáňové kultury (Sigma; viz kapitola 4.1.8.)

1x koncentrovaný roztok HEBS (0,137 M NaCl; 6 mM glukóza; 5 mM KCl; 0,7 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 0,02 M HEPES)

Bakmidová DNA (viz kapitola 4.3.4.13.)

CaCl_2 (Sigma)

4.2.3.1.3. Infekce hmyzích buněk rekombinantním bakulovirem a sklizení infikovaných buněk

Buňky byly zpasážovány do bezsérového TNM-FH média tak, aby dosahovaly 60% konfluency. Poté, co buňky přisedly na Petriho misku (30 minut – 1 hodiny), bylo médium odsáto a bylo přidáno bakulovirové inokulum (10 pfu na buňku). Následovala inkubace za stálého kolébání 1 hodinu při laboratorní teplotě. Po uplynutí 1 hodiny bylo přidáno TNM-FH hmyzí médium s 10% sérem tak, aby celkové množství média bylo 5 ml u 6 cm Petriho misky a 10 ml u 10 cm misky. Infekce probíhala 3-4 dny při 28°C.

Poté byly buňky seškrabány do média a převedeny do 50 ml zkumavky Falcon a centrifugovány 10 minut při 2000 rpm a 4 °C (centrifuga Sigma 3K30, rotor 18776-H). Supernatant převeden do sterilní zkumavky Falcon a uchován při 4 °C. Sediment byl resuspendován ve sterilním PBS a znovu zcentrifugován 10 minut při 2000 rpm a 4 °C (centrifuga Sigma 3K30, rotor 18776-H) a poté použit pro izolaci kapsidových struktur (viz kapitola 4.2.3.1.5.), k přípravě lyzátu (viz kapitola 4.2.5.1.) nebo uskladněn při -20 °C.

Materiál:

TNM-FH médium (Sigma)

10% FBS (Sigma)

Směs antibiotik pro tkáňové kultury (Sigma; viz. kapitola 4.1.8.)

1x PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM Na₂HPO₄; 6,5 mM KH₂PO₄; pH 7,4)

4.3.3.1.4 Plaková zkouška a izolace rekombinantních plaků

Na sterilní Petriho misky o průměru 6 cm bylo vyseto 2×10^6 hmyzích buněk Sf9, které byly získány oškrábáním konfluentně narostlé kultury. Suspenze bylo doplněna do 5 ml médiem TNM-FH bez séra. Po přichycení buněk na dno misky (1 hodina) bylo médium odsáto a bylo přidáno 0,6 ml vhodně naředěného virového inokula (obvykle byla používána ředící řada od 10^{-4} do 10^{-7}). Buňky byly inkubovány 1 hodinu při laboratorní teplotě na kývačce. Poté bylo inokulum odsáto a na buňky byly velmi opatrně napipetovány 4 ml na 40 °C zahřáté, sterilní 1,5% SeaPlaque agarózy v TNM-FH s 10% sérem a antibiotiky. Po ztuhnutí agarózy byly buňky inkubovány 6-8 dní při 28 °C. Vyvinuté rekombinantní plaky byly označeny pod lupou s bočním osvětlením při zvětšení 30x, vypíchnuty sterilní špičkou a přeneseny na misku s hmyzími buňkami, aby se v nich získaný rekombinantní bakulovirus pomnožil. Buňky byly inkubovány 4 dny při 28 °C a poté oškrabány do média, převedeny do 50 ml zkumavky Falcon a centrifugovány 10 minut při 2000 rpm a 4 °C (centrifuga Sigma 3K30, rotor 18776-H). Supernatant byl použit jako inokulum pro infekci (viz kapitola 4.2.3.3.)

Materiál:

TNM-FH médium (Sigma)

10% FBS (Sigma)

Směs antibiotik pro tkáňové kultury (Sigma; viz. kapitola 4.1.8.)

SeaPlaque agaróza (FMC BioProducts)

4.2.3.1.5. Izolace umělých virových kapsid z hmyzích buněk

Hmyzí buňky infikované rekombinantním bakulovirem byly oškrábány do média a přeneseny do 50 ml zkumavky Falcon a centrifugovány 10 minut při 2000 rpm a 4°C (Centrifuga GS-15R, rotor S4180). Supernatant byl uschován pro další použití a sediment byl propláchnut PBS, znovu zcentrifugován (10 min, 2000 rpm, 4°C, centrifuga GS-15R, rotor S4180) a resuspendován ve sterilním pufru B. Následovala sonikace 3x30 sekund (sonikátor Soniprep 150, Schoeller Pharmacia Praha). Mezi jednotlivými sonikacemi byla suspenze buněk vždy 30 sekund inkubována na ledu. Po sonikaci byla provedena centrifugace (10 min, 4800 rpm, 4 °C, centrifuga GS-15R, rotor S4180). Supernatant byl odebrán do centrifugační zkumavky (Beckman Polyallomer Ultra-Clear Centrifuge Tubes 14×89 mm) a ze sedimentu resuspendovaném v 1 ml B pufru bylo odebráno 5 µl pro mikroskopické ověření kompletní destrukce buněk. Sediment byl poté znovu sonikován 3x30 sekund a centrifugován (10 min, 4800 rpm, 4 °C, centrifuga GS-15R, rotor S4180), aby byl získán co nejvyšší výtěžek virového proteinu. Sediment byl opět odebrán a spojen s předchozím v centrifugační zkumavce. Následovala centrifugace přes 10% sacharózový polštář v B pufru 3 hod při 35000 rpm při 4°C (viz kapitola 4.2.3.1.6.). Získaný sediment byl resuspendován v B pufru a opět sonikován 3x 30s (sonikátor Soniprep 150, Schoeller Pharmacia Praha). Poté byla suspenze centrifugována v rovnovážném CsCl gradientu 20 – 24 hodin při 35000 rpm a 18°C (viz kapitola 4.2.3.1.7.). Po ukončení centrifugace byl vzniklý gradient rozebrán rozkládačem gradientu (Beckman) na jednotlivé frakce, u kterých byl změřen refraktometrický index (refraktometr ABBE, Carl Zeiss-Jena) a imunologicky ověřena přítomnost hlavního virového kapsidového proteinu (viz kapitoly 4.2.5.5. a 4.2.5.6.). Na základě získaných hodnot byly jednotlivé frakce pospojovány do 3 výsledných frakcí, které byly přes noc dialyzovány proti pufru B (viz kapitola 4.2.3.1.8.). Frakce po dialýze byly převedeny do centrifugačních zkumavek a zahuštěny přes 10% sacharózový polštář (viz kapitola 4.2.3.1.6.) nebo pomocí PEG 20000 (viz kapitola 4.2.3.1.9.). Sediment získaný centrifugací přes sacharózový polštář byl resuspendován v B pufru. Přítomnost hlavního kapsidového proteinu byla prokázána pomocí SDS-PAAGE (viz kapitola 4.2.5.2.), western blot (viz kapitola 4.2.5.4.) a imunodetekce (viz kapitola 4.2.5.6.). Intaktnost kapsidových struktur byla ověřena elektronovou mikroskopií (viz kapitola 4.2.5.9.).

Materiál:

1x PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM Na₂HPO₄; 6,5 mM KH₂PO₄; pH 7,4)

Puf B (10 mM Tris-HCl, pH= 7,4; 150 mM NaCl; 0,01 mM CaCl₂)

CsCl

10% sacharóza v pufru B

4.2.3.1.6. Centrifugace přes 10% sacharózový polštář

Vzorek umělých virových kapsid v pufru B byl centrifugační zkumavce (Beckman Polyallomer Ultra-Clear Centrifuge Tubes 14×89 mm) opatrně podvrstven pomocí kapiláry 1 – 1,5 cm silnou vrstvou 10% sacharózy. Zkumavky byly vyváženy B pufrem a opatrně umístěny do centrifugačních kyvet tak, aby nedošlo k porušení sacharózové vrstvy. Centrifugace probíhala 3 h při 35000 rpm a 4°C (centrifuga Optima L-90K, rotor SW41, Beckman). Supernatant byl slit a sediment resuspendován v B pufru opakovanou sonikací (sonikátor Soniprep 150, Schoeller Pharmacia Praha).

Materiál:

Puf B (10 mM Tris-HCl, pH= 7,4; 150 mM NaCl; 0,01 mM CaCl₂)

10% sacharóza v pufru B

4.2.3.1.7. Izopyknická centrifugace v rovnovážném CsCl gradientu

Izopyknická centrifugace v rovnovážném gradientu CsCl umožňuje separovat molekuly na základě rozdílu jejich vznášivé hustoty. Lze tak od sebe rozdělit i plné a prázdné virové kapsidy, které v ustáleném gradientu tvoří opaleskující proužek.

Vzorek resuspendovaný v pufru B byl převeden do centrifugační zkumavky (Beckman Polyallomer Ultra-Clear Centrifuge Tubes 14×89 mm), dovážen pufrem do 7,9 g a smíchan s 3,79 g CsCl. Po rozpuštění CsCl byla směs převrstvena vrstvou parafinového oleje, kterým byly vyváženy i zkumavky. Zkumavky byly vsazeny do centrifugačních kyvet a následovala centrifugace při 35000 rpm a 18°C trvající 20 – 24 hodin (centrifuga Optima L-90K, rotor SW 41, Beckman). Poté byl vzniklý gradient rozložen na frakce rozkládačem gradientu (Beckman). Z jednotlivých frakcí byly odebrány kapky o objemu 8 µl, u nichž byl určen refraktometrický index pomocí refraktometru (Carl Zeiss-Jena). Dále byla ve vzorcích zjišťována přítomnost hlavního kapsidového proteinu metodou Dot-blot (viz kapitola 4.2.5.5) a imunologickou detekcí (viz kapitola 4.2.5.6.). Na základě výsledků těchto testů byly frakce pospojovány do 3

výsledných frakcí, které byly přes noc dialyzovány proti pufru B (viz kapitola 4.2.3.1.8.).

Materiál:

Pufir B (10 mM Tris-HCl, pH= 7,4; 150 mM NaCl; 0,01 mM CaCl₂)

CsCl

4.2.3.1.8. Dialýza

Při dialýze dochází k průchodu nízkomolekulárních látek jako jsou např. soli přes semipermeabilní membránu z prostředí o vyšší koncentraci do prostředí o koncentraci nižší. Vysokomolekulární sloučeniny (proteiny, DNA a další) jsou moc velká na to, aby mohly projít pórem membrány a proto zůstávají uvnitř. Zároveň přes membránu vstupují molekuly pufru, čímž dochází k rozředění vzorku.

Nejdříve bylo nezbytné povařit celulóзовou dialyzační membránu o průměru 16 mm (průměr póru 2,5 nm; Serva) 10 minut v destilované vodě, aby došlo k jejímu změknutí a bylo možné do ní nanést vzorek. Po povaření byla membrána přemístěna do pufru B a z jedné strany uzavřena svorkou. Po nanesení vzorku do membrány byla na opačnou stranu membrány umístěna druhá svorka tak, aby uvnitř membrány zůstal dostatek volného prostoru a vzorek mohl nasáváním čistého pufru B zvětšovat svůj objem. Membrány byly umístěny do 2 l vychlazeného pufru B, kde byla za stálého míchání ponechány 2 hodiny. Po uplynutí této doby byly přemístěny do 2 l čistého vychlazeného pufru B, ve kterém probíhala dialýza přes noc za stálého míchání a 4 °C. Poté, co byly vzorky dialýzou zbaveny iontů solí, byly zahuštěny centrifugací přes 10% sacharózový polštář (viz kapitola 4.2.3.1.6.) a resuspendovány v B pufru.

Materiál:

Pufir B (10 mM Tris-HCl, pH= 7,4; 150 mM NaCl; 0,01 mM CaCl₂)

4.2.3.1.9. Zahuštění frakcí po dialýze pomocí PEG

Frakce dialyzované přes noc při 4 °C proti pufru B, které nemohly být z důvodu očekávaného nízkého výtěžku přečištěny a zakoncentrovány centrifugací přes 10% sacharózový polštář, byly zahuštěny pomocí vysokomolekulárního PEG (M_w = 20000). Dialyzační střevo bylo vyjmutο z pufru B a zasypáno dostatečným množstvím PEG, tak aby bylo dokonale pokryto. Poté co PEG absorboval požadované množství tekutiny a

frakce tak byla dostatečně zahuštěna, byla membrána očištěna od zbytků PEG a frakce byla přemístěna do mikrozkuřavky. Získaný vzorek byl sonikován (sonikátor Branson 5, Cole-Parmer Instrument Company) po dobu 3x 30 sekund a přítomnost hlavního kapsidového proteinu byla prokázána pomocí SDS-PAAGE (viz kapitola 4.2.5.2.), western blotu (viz kapitola 4.2.5.4.) a imunodetekce (viz kapitola 4.2.5.6.). Intaktnost kapsidových struktur byla ověřena elektronovou mikroskopií (viz kapitola 4.2.5.9.)

Materiál:

PEG 20000 (Serva)

4.2.3.2. Práce s kulturami savčích buněk

4.2.3.2.1. Pasážování savčích buněk

Kultury myších fibroblastů 3T6 nebo myšího melanomu B16-F10 byly pěstovány v DMEM médiu se sérem na 6 cm Petriho miskách. Po dosažení konfluence bylo z misek s buněčnou kulturou odsáto médium a buňky byly opláchnuty 5 ml verzenou a poté k nim byl přidáno 300 μ l roztoku trypsinu. V něm byly ponechány dokud se neuvolnily ode dna misticčky. Aktivita trypsinu byla zastavena přidáním sérového DMEM média. Buňky byly resuspendovány opakovaným protažením skleněnou pipetou a rozděleny na nové sterilní Petriho misky do kompletního sérového média v poměru 1:10. Pokud byly buňky pasážovány na mikroskopická sklíčka ve 24-jamkové destičce bylo použito 30 μ l buněčné suspenze a 1 ml DMEM sérového média. Buňky byly inkubovány v termostatu s 5% atmosféře CO₂ při 37°C.

Materiál:

Roztok verzenou (0,25% verzen v PBS)

Roztok trypsinu (0,25% trypsin v PBS)

DMEM médium (Sigma)

10% FBS (Sigma)

2 mM glutamin (Sigma)

Směs antibiotik pro tkáňové kultury (Sigma; viz. kapitola 4.1.8.)

4.2.3.2.2. Infekce myších fibroblastů 3T6 umělými virovými kapsidami za účelem ověření vstupu kapsid do buněk

K infekci byla použita kultura myších fibroblastů rostoucí na mikroskopických sklíčkách obvykle 24 hodin po pasáži. Z jamek bylo odsáto médium a bylo nahrazeno 200 μ l bezsérového média. Poté byla destička inkubována 30 minut na ledu. Bezsérové médium bylo odstraněno a bylo přidáno 200 μ l vychlazeného inokula s kapsidami naředěného v bezsérovém DMEM médiu na požadovanou multiplicitu infekce a destička byla opět inkubována na ledu, tentokrát 1 hodinu. Po uplynutí 1 hodiny byly buňky buď fixovány (viz kapitola 4.2.3.2.5.) nebo inkubovány 1 hodinu v termostatu s 5% atmosférou CO₂ a 37 °C a fixovány až poté.

Materiál:

DMEM médium (Sigma)

10% FBS (Sigma)

2 mM glutamin (Sigma)

Směs antibiotik pro tkáňové kultury (Sigma, viz kapitola 4.1.8.)

4.2.3.2.3. Sklizení savčích buněk

Buňky byly seškrabány do média a převedeny do 50 ml zkumavky Falcon a centrifugovány při laboratorní teplotě, 10 minut, 1500 rpm (centrifuga MSE). Sediment byl resuspendován ve sterilním PBS a znovu zcentrifugován při laboratorní teplotě, 10 minut, 1500 rpm (centrifuga MSE) a poté použit k přípravě lyzátu (viz kapitola 4.2.5.1.) nebo uskladněn při -20 °C.

Materiál:

1x PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM Na₂HPO₄; 6,5 mM KH₂PO₄; pH 7,4)

4.2.3.2.4. Příprava konzerv savčích buněk

Z buněk po dosažení 80% konfluency bylo odsáto médium a byly opláchnuty 3 ml roztoku verzeny. Poté bylo aplikováno 300 μ l roztoku trypsinu, jehož aktivita byla po uvolnění buněk zastaven přidáním 3 – 5 ml DMEM média s 10% sérem. Po důkladném resuspendování buněčné suspenze několikanásobným protažením skleněnou pipetou byla provedena centrifugace v 50 ml zkumavce 6 minut, při laboratorní teplotě a 1500 rpm (centrifuga MSE). Supernatant byl opatrně odsát a pelet resuspendován v

mrazícím médiu a inkubován 10 minut při pokojové teplotě. Buněčná suspenze byla po 1 ml rozplněna do kryozkumavek a na 15 minut uložena do $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Odtud byly zkumavky přemístěny na 24 hodin do $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a nakonec uloženy do tekutého dusíku k dlouhodobému uchování.

Materiál:

Roztok verzenu (0,25% verzen v PBS)

Roztok trypsinu (0,25% trypsin v PBS)

DMEM médium (Sigma)

10% FBS (Sigma)

2 mM glutamin (Sigma)

Směs antibiotik pro tkáňové kultury (Sigma; viz. kapitola 4.1.8.)

Mrazící médium (95% DMEM médium s 10% FBS a 2 mM glutaminem; 5 % DMSO)

4.2.3.2.5. Fixace buněk na mikroskopických sklíčkách

Z hmyzích buněk narostlých na sklíčku ve 24-jamkové destičce bylo odsáto médium a byly opláchnuty 0,5 ml roztoku PBS. Poté byly fixovány při pokojové teplotě přidáním roztoku 3% paraformaldehydu v PBS. Buňky byly v roztoku ponechány 15 minut a poté byl odstraněn a buňky byly promyty 5 minut v PBS a následně permeabilizovány 5-minutovou inkubací v 0,5% roztoku Tritonu X-100 v PBS. Po permeabilizaci byly buňky opět opláchnuty PBS (3x 5 minut) a sklíčka s fixovanými buňkami byla vysycena 30-minutovou inkubací v roztoku 0,25% želatiny a 0,25% BSA v PBS. Takto připravená sklíčka s buňkami byla použita k nepřímému imunofluorescenčnímu značení (viz kapitola 4.2.5.7.).

Materiál:

1x PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM Na_2HPO_4 ; 6,5 mM KH_2PO_4 ; pH 7,4)

Fixační roztok (3% paraformaldehyd v PBS)

Blokovací roztok (0,25% želatina, 0,25% BSA v PBS)

Permeabilizační roztok (0,5% Triton X-100 v PBS)

4.2.4. Práce s DNA

4.2.4.1. Separace molekul DNA pomocí horizontální gelové elektroforézy

Nejdříve byl připraven 1% agarózový gel krátkým povařením agarózy v 0,5x koncentrovaném TBE pufru. Po zchladnutí gelu na 50 °C byl kvůli vizualizaci DNA přidán ethidium bromid a gel byl nalit do připravené formičky, která je součástí aparatury pro horizontální elektroforézu firmy Cleaver Scientific. Do gelu byl ponořen hřeben, který v gelu vytváří jamky pro nanesení vzorků. Gel tuhnul při laboratorní teplotě asi 30 – 45 minut. Po ztuhnutí gelu byl opatrně vyjmut hřeben a byly odstraněny 2 odnímací strany formičky a gel byl i s nádobkou vložen do elektroforetické aparatury a zalit 0,5x koncentrovaným pufrům tak, aby byl zcela ponořen. Vzorky DNA byly před nanesením do jamek v gelu smíchány v poměru 6:1 s nanášecí barvičkou 6x Orange Loading Dye (Fermentas). Jako standard molekulových hmotností byl použit marker GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder, 75 – 20 000 bp (Fermentas – viz obr. 4.1.). Velikost použitého napětí se pohybovala od 50 – 90 V a od toho se odvíjela i doba potřebná k rozdělení DNA (asi 45 – 60 minut). Gel byl poté vyjmut z nádoby, vložen pod UV transluminátor a vyfotografován.

Materiál:

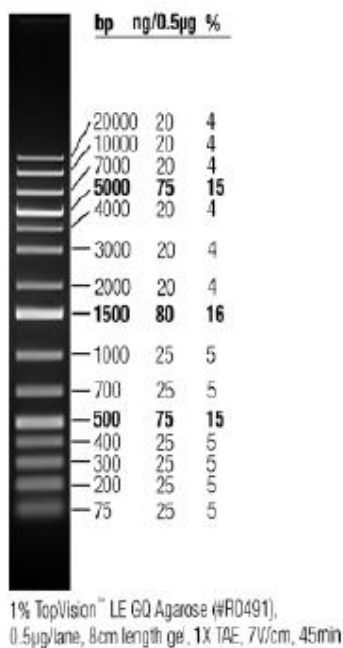
0,5x koncentrovaný TBE pufr (45 mM Tris-HCl, pH = 8,0; 45 mM H₃BO₃, 1 mM EDTA, pH = 8,0)

6x DNA Orange Loading Dye (Fermentas)

Agaróza pro elektroforézu (Amresco)

2000x ethidium bromid (Serva) 1 mg/ml H₂O

Marker molekulových hmotností GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder, 75 – 20 000 bp (Fermentas)



Obr. 4.1.: Marker molekulových hmotností DNA GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Fermentas).
Převzato z www.fermentas.com

4.2.4.2. Maxiparace plazmidové DNA – alkalická metoda

Monokolonie bakterie *E. coli* nesoucí žádaný plazmid byla zaočkována do 100 ml ŽB č. 2 s příslušným antibiotikem a třepána přes noc (150 rpm, 16 – 18 hodin, 37 °C). Po kultivaci byl objem rozdělen do 2 zkumavek Falcon a centrifugován 15 minut při 4000 g a 4 °C. Supernatant byl slit a jeho zbytky opatrně odsáty buničitou vatou. Sedimenty byly resuspendovány ve 2 ml Roztoku I a převedeny do 1 zkumavky. Poté bylo přidáno 8 ml Roztoku II a suspence byla velmi opatrně promíchána převrácením zkumavky a inkubována maximálně 10 min při laboratorní teplotě. Následně bylo přidáno 6 ml ledově vychlazeného Roztoku III, suspence byla opět promíchána otáčením zkumavky a inkubována 20 min na ledu. Po inkubaci byla směs centrifugována (15 000 g, 15 min, 4 °C). Supernatant byl přefiltrován přes vrstvu čisté gázy do nové zkumavky. Centrifugace a filtrace byla zopakována ještě jednou. K supernatantu byl poté přidána 0,6 objemu izopropanolu, směs byla promíchána a inkubována 10 min při laboratorní teplotě. Následovala centrifugace (4800 rpm, 30 min, 18 °C). Sediment byl propláchnut 1 ml 70% EtOH a vysušen při laboratorní teplotě. Po vyschnutí byl resuspendován ve 300 µl ddH₂O nebo sterilního TE pufru a převeden do mikrozkušavky. Získaný resuspendovaný sediment byl zbaven RNA inkubací s

RNázou (viz kapitola 4.2.4.5.), zbylých proteinů a RNázy pomocí extrakce směsí fenol/chloroform 1:1 (viz kapitola 4.2.4.6.). DNA byla vysrážena přidáním 3M octanu sodného a 96% EtOH (viz kapitola 4.2.4.7.) a převedena do menšího objemu resuspendováním v ddH₂O nebo sterilním TE pufru (obvykle v 50 μl). Kvalita a identita vyzolovaného plazmidu byla ověřena elektroforeticky (viz kapitola 4.2.4.1.) a pomocí restriční analýzy a jeho koncentrace byla změřena nanodropem. Takto připravená plazmidová DNA byla použita k dalším manipulacím.

Materiál:

ŽB č. 2 (Imuna)

Roztok I (25 mM Tris-HCl, pH = 8,0; 10 mM EDTA-NaOH, pH = 8,0; 50 mM glukóza)

Roztok II (1% SDS; 0,2 M NaOH)

Roztok III (60 ml 5 M octanu draselného; 11,5 ml ledové kyseliny octové; 28,5 ml dH₂O)

1x koncentrovaný TE pufr (10 mM Tris-HCl, pH = 8,0; 1 mM EDTA-NaOH, pH = 8,0)

100% izopropanol

3 M octan sodný (pH 5,2)

96% ethanol

70% ethanol

RNáza A (10 mg/ml)

4.2.4.3. Minipreparace plazmidové DNA – alkalická metoda

Monokolonie bakterií *E. coli* byly zaočkovány do 700 μl ŽB č. 2 s příslušným antibiotikem a byly přes noc (16 – 18 hodin) kultivovány v třepačce při 37 °C a 150 rpm. Buňky byly centrifugovány 5 minut při 4000 g a 4 °C. Pelet byl resuspendován v 250 μl Roztoku I. K suspenzi bylo poté přidáno 250 μl Roztoku II a následovalo opatrné promíchání otáčením mikrozkuhavky a inkubace 10 minut při laboratorní teplotě. Pak bylo přidáno 200 μl ledově vychlazeného Roztoku III a směs byla opět velmi opatrně promíchána a inkubována 10 minut na ledu. Směs byla po inkubaci centrifugována 10 minut, 17530 g, 4 °C. Supernatant byl přenesen do nové sterilní mikrozkuhavky a bylo k němu přidáno 500 μl 100% izopropanolu. Směs byla promíchána pomocí vortexu a inkubována 10 minut na stole. Následovala centrifugace 20 minut, 20000 g, 4 °C, po níž byl supernatant slit a sediment byl promyt 70%

ethanolem. Zbytky ethanolu byly odstraněny opatrným vytřením mikroskopické buničité vaty a pelet byl usušen při laboratorní teplotě a resuspendován v 15 – 25 μ l ddH₂O nebo sterilního TE pufru s 1/10 objemu RNázy A.

Materiál:

ŽB č. 2 (Imuna)

Roztok I (25 mM Tris-HCl, pH = 8,0; 10 mM EDTA-NaOH, pH = 8,0; 50 mM glukóza)

Roztok II (1% SDS; 0,2 M NaOH)

Roztok III (60 ml 5 M octanu draselného; 11,5 ml ledové kyseliny octové; 28,5 ml dH₂O)

1x koncentrovaný TE pufr (10 mM Tris-HCl, pH = 8,0; 1 mM EDTA-NaOH, pH = 8,0)

100% izopropanol

70% ethanol

RNáza A (10 mg/ml)

4.2.4.4. Izolace plazmidu ve vysoké čistotě pomocí kitu QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)

Pro izolaci rekombinantních plazmidů pFastBac 1, které byly použity ke klonování a následné transfekci do kompetentních buněk byl používán kit QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN). Plazmid byl vyizolován přesně dle návodu a s použitím materiálů dodaného výrobcem. Čistota vyizolovaného plazmidu byla ověřena elektroforeticky (viz kapitola 4.2.4.1.) a pomocí nanodropu. Izolace tímto kitem však není nejlevnější a proto se nehodí například pro izolaci při ověřování rekombinantních plazmidů. Množství vyizolované DNA bylo dostačující pro většinu prováděných experimentů.

Materiál:

QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)

4.2.4.5. Odstranění RNA ze vzorku při izolaci DNA

Ke vzorku DNA byla přidána 1/100 objemu RNázy A a vzorek byl inkubován 1 hodinu při 37 °C. Aktivita RNázy A byla zastavena přečištěním vzorku pomocí fenol/chloroformové extrakce (viz kapitola 4.2.4.6.).

Materiál:

RNáza A (10 mg/ml)

4.2.4.6. Odstranění proteinů ze vzorku DNA – fenol/chloroformová extrakce

Ke vzorku DNA v mikrozkuhavce (pokud byl objem menší než 100 μ l, byl na toto hodnotu doplněn ddH₂O) byl přidán 1x objem upraveného fenolu, směs byla zvortexována a centrifugována 5 minut při 15000 rpm na stolní centrifuze (centrifuga Microfuge Lite, rotor F1802, Beckman). Horní vodná fáze byla poté přenesena do nové mikrozkuhavky a byl k ní přidán 1x objem směsi fenol/chloroformu 1:1 a opět následovalo vortexování a centrifugace (5 minut, 15000 rpm). Tento krok byl opakován tak dlouho, dokud nezmizela bílá vrstva proteinů na rozhraní horní vodné a dolní organické fáze. Horní fáze byla poté opět odebrána a vortexováním promísená s 1x objemem upraveného chloroformu a poté byla směs zcentrifugována (5 minut, 15000 rpm, centrifuga Microfuge Lite, rotor F1802, Beckman). DNA obsažená v horní vodné fázi byla dále srážena pomocí 3 M NaAc a 96% EtOH (viz kapitola 4.2.4.7.)

Materiál:

Upravený fenol (Sigma-Aldrich)

Chloroform s izoamylalkoholem 24:1

4.2.4.7. Přesrážení DNA pomocí 3M octanu sodného a 96% EtOH

Do mikrozkuhavky s roztokem DNA bylo přidáno 0,1 objemu 3 M NaAc a 2,5 objemu 96% EtOH. Roztok byl inkubován 30 minut v – 20 °C. Po srážení následovala centrifugace 25 minut, 15300 rpm, 4 °C (centrifuga Microfuge R; rotor F241,5; Beckman). Pelet byl promyt 1 ml 70% EtOH a pro jistotu znovu centrifugován 20 min, 15300 rpm, 18 °C. Supernatant byl slit, zbytky EtOH opatrně odstraněny odsátím buničitou vatou a sediment byl vysušen při laboratorní teplotě. DNA byla poté rozpuštěna v ddH₂O nebo sterilním TE pufru před dalším použitím uchována při – 20 °C.

Materiál:

3 M octan sodný

96% ethanol

70% ethanol

1x koncentrovaný TE pufr (10 mM Tris-HCl, pH = 8,0; 1 mM EDTA-NaOH, pH = 8,0)

4.2.4.8. Štěpení DNA pomocí restrikčních endonukleáz

Při použití restrikčních enzymů ke štěpení DNA bylo postupováno dle doporučení výrobce (Fermentas). Do mikrozkušavek byla napipetována DNA v doporučeném množství, přidán 10x koncentrovaný pufr pro příslušný restrikční enzym tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 1x a směs byla doplněna ddH₂O do konečného objemu. Jako poslední byl do restrikční směsi přidán enzym dle doporučení výrobce (většinou 1U/μg DNA). Směs byla inkubována při 37 °C. Doba inkubace se pohybovala od 3 hodin při ověřování plazmidu do 16 hodin, pokud bylo potřeba naštěpit veškerou DNA. Pokud bylo potřeba naštěpit DNA dvěma enzymy, byl k navrženému postupu využit vyhodnocovací program DoubleDigest umístěný na webových stránkách výrobce restrikčních enzymů (Fermentas), který je schopen určit a doporučit nejlepší podmínky pro reakci (<http://www.fermentas.com/en/tools/doubledigest>).

Naštěpení bylo ověřeno pomocí horizontální gelové elektroforézy (viz kapitola 4.2.4.1.).

Materiál:

Restrikční endonukleázy (Fermentas): BamHI, EcoRI, EcoRV, KpnI, HindIII

Pufry pro restrikční enzym (Fermentas): pufr TANGO, R, BamHI, KpnI

4.2.4.9. Defosforylace 5' konců plazmidu naštěpeného restrikčními enzymy pomocí fosfatázy

Po štěpení plazmidu restrikčními endonukleázami zůstává na 5' koncích DNA fosfátová skupina, kterou je vhodné odstranit, aby tak bylo zabráněno zpětné recirkularizaci plazmidu. Fosfátová skupina slouží jako zdroj energie pro další enzym, ligázu, která dokáže spojit dva konce lineární DNA (viz kapitola 4.3.4.11.). Ke spojení dvou konců DNA ovšem plně dostačuje jedna fosfátová skupina, kterou do reakce přináší vkládaný fragment a proto může být fosfátová skupina plazmidu odstraněna fosfatázou.

Reakční směs na defosforylacii byla připravena dle návodu výrobce:

Lineární DNA 1-5 μg (do 10 pmol konců)

10x FastAP™ pufr 5 μl

ddH₂O do 49 μl

FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Fermentas) 1 µl (1 U)

Pak byla mikrozkušavka s reakční směsí inkubována 1 hodinu při 37 °C. Reakce byla ukončena tepelnou inaktivací enzymu 5 min při 75 °C nebo extrakcí fenol/chloroformem (viz kapitola 4.2.4.6.).

Materiál:

Fosfatáza FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Fermentas) 1 U/µl

10x koncentrovaný FastAP™ pufr (Fermentas)

4.2.4.10. Amplifikace úseků DNA polymerázovou řetězovou reakcí - PCR

Reakční směs byla namíchána podle doporučení výrobce polymerázy:

- 5 µl 10x koncentrovaného pufru pro polymerázu (Vent nebo High Fidelity PCR enzyme mix – obě Fermentas)
- 1,5 µl forward primeru (10 µM)
- 1,5 µl reverse primeru (10 µM)
- 1 µl dNTP mix (10 µM)
- 1 µl DNA (1 – 1,2 ng/µl)
- 0,5 µl polymerázy (Vent nebo Fidelity PCR enzyme mix – obě Fermentas)
- 39,5 µl ddH₂O

Program PCR byl nastaven podle doporučení výrobce polymerázy a optimalizován podle konkrétních použitých primerů a délky amplifikovaného úseku:

1. krok (počáteční denaturace DNA) – 3 min při 94°C
2. krok (denaturace DNA) – 40 sec při 94°C
3. krok (hybridizace primerů na templát) – teplota dána teplotou tání primeru a čas určen délkou amplifikovaného úseku
4. krok (polymerizace) – 1 min při 72°C
5. krok – 30x opakování kroků 2. - 4.
6. krok (polymerizace) – 7 min při 72°C

Pro amplifikace byly používány dva enzymy a to Vent polymeráza (Fermentas) a High Fidelity PCR enzyme mix (Fermentas). Jako templáty byl použity plazmidy

pMJG se zaklonovaným genomem MPyV a plazmid pBRJCV-MAD-1 se zaklonovaným genomem JCV (viz kapitola 4.1.3.). Kvalita PCR produktu byla ověřena elektroforeticky (viz kapitola 4.2.4.1.).

Materiál:

Polymeráza High Fidelity PCR enzyme mix (Fermentas)

Polymeráza Vent polymerase (Fermentas)

10mM dNTPs (směs byla připravena ze zásobních roztoků 100mM dATP, 100mM dTTP, 100mM dGTP a 100mM dCTP – všechny Fermentas)

10x koncentrovaný pufr pro polymerázu

Primery (viz kapitola 4.1.6.)

Templátová DNA (viz kapitola 4.1.3.)

4.2.4.11. Hybridizace syntetických oligonukleotidů

Komplementární syntetické oligonukleotidy (sekvence viz kapitola 4.2.6.) byly smíchány v molárním poměru 1:1 a poté k nim byl v poměru 1:1 přidán 2x TEN pufr. Směs byla 10 minut zahřívána na 95 stupňů a pak pomalu vychlazena na laboratorní teplotu.

Materiál:

2x koncentrovaný TEN pufr (20 mM Tris-HCl, pH = 8; 1 mM EDTA, pH = 8; 0,1 M NaCl)

Syntetické oligonukleotidy (viz kapitola 4.2.6.)

4.2.4.12. Ligace

Plazmid byl nejdříve naštěpen zvolenými restričními enzymy (viz kapitola 4.2.4.8.) a defosforylován (viz kapitola 4.2.4.9.), aby v případě, že byla k linearizaci použita pouze jedna restriční endonukleáza, nedošlo po přidání ligázy k jeho zpětné recirkularizaci. Takto připravený vektor byl následně smíchán s vhodně restričně upravenými inzerty v molárním poměru 1:3. K ligaci byla použita T4 DNA ligáza od firmy Fermentas. Směs byla připravena podle doporučení výrobce a inkubována přes noc při laboratorní teplotě:

Lineární DNA 1-5 µg (do 10 pmol konců) – vektor + inzerť

10x pufr pro T4 DNA ligázu 5 µl

ddH₂O do 49 µl

T4 DNA ligáza 1 µl (1 U)

Produkt ligace byl použit k elektroporaci do kompetentních bakterií XL1-Blue (viz kapitola 4.2.2.3.)

Materiál:

Ligáza T4 DNA ligase (Fermentas)

10x koncentrovaný pufr pro T4 DNA ligázu (Fermentas)

4.2.4.13. Izolace bakmidové DNA

Bakterie DH10Bac byly po elektroporaci (viz kapitola 4.2.2.3.) vysety na agarové plotny (ŽA č.2) s přidavkem antibiotik kanamycinu, gentamicinu a tetracyklinu, X-gal a induktorem IPTG a kultivovány 48 hodin v termostatu při 37 °C. Pozitivní (bílé) kolonie byly poté přečárkovány na novou plotnu a pěstovány dalších 48 hodin při 37 °C. Získané monokolonie byly sterilním párátkem zaočkovány do 2 ml tekutého média (ŽB č.2) s přidavkem týchž antibiotik a kultivovány v třepačce při 150 rpm a 37 °C 16 – 18 hodin. Následující den bylo odebráno 1,5 ml kultury do mikrozkušavky a centrifugováno 1 minutu při 14000 g. Supernatant byl odsát a buněčný pelet resuspendován v 0,3 ml přefiltrovaného sterilního roztoku I. Dále bylo přidáno 0,3 ml filtrovaného sterilního roztoku II a směs byla opatrně promíchána a inkubována 5 minut při laboratorní teplotě. Následně bylo opatrně přimícháno 0,3 ml KAc (pH = 5,5) a suspenze byla 10 minut inkubována na ledu. V dalším kroku byla centrifugována 10 minut při 14000 g. Supernatant byl opatrně přemístěn do nové mikrozkušavky obsahující 0,8 ml izopropanolu, promíchán opakovaným opatrným převrácením zkumavky a inkubován na ledu po dobu 10 minut. Vzorek byl poté centrifugován 15 minut při 14000 g. Supernatant byl opatrně odstraněn a pelet přelit 0,5 ml 70% ethanolu a promyt opatrným převrácením zkumavky. Po 10-minutové centrifugaci při 14000 g byl pelet ještě jednou promyt stejným způsobem a znovu zcentrifugován 10 minut při 14000 g. Supernatant byl opatrně odstraněn, aby nedošlo k porušení peletu a ten byl následně vysušen inkubací 10 minut při pokojové teplotě. Získaná DNA byla rozpuštěna ve 40 µl 1x TE pufru (pH = 8). Aby se předešlo rozlámání, nebyla DNA resuspendována mechanicky, ale pouze rozpuštěna za občasného poklepání na dno zkumavky. Přítomnost vkládaného genu byla ověřena

pomocí PCR (viz kapitola 4.2.4.10.). DNA byla uložena při 4 °C a dále použita k transfekci hmyzích buněk Sf9 (viz kapitola 4.2.3.1.2.).

Materiál:

ŽA č.2

ŽB č.2

Kanamycin (50 µg/ml)

Gentamicin (7 µg/ml)

Tetracyklin (10 µg/ml)

X-gal (100 µg/ml)

IPTG (40 µg/ml)

Roztok I (15 mM Tris-HCl, pH = 8; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNáza A)

Roztok II (0,2 M NaOH; 1% SDS)

KAc (3 M; pH = 5,5)

Izopropanol

70% ethanol

1x koncentrovaný TE pufr (10 mM Tris-HCl, pH = 8,0; 1 mM EDTA-NaOH, pH = 8,0)

4.2.5. Práce s proteiny

4.2.5.1. Příprava buněčných lyzátů pro SDS-PAAGE

Buněčná kultura narostlá na Petriho misce byla gumovým škrábátkem oškrábána do média a suspenze byla převedena do sterilní zkumavky Falcon. Následovala centrifugace při laboratorní teplotě, 10 minut, 1500 rpm (centrifuga MSE). Sediment byl resuspendován v 1 ml 1x PBS a ještě jednou centrifugován (10 minut, 1500 rpm, laboratorní teplota, centrifuga MSE), aby byly dokonale odstraněny proteiny ze séra, které je obsaženo v médiu pro pěstování buněk. Pak byl sediment podle množství resuspendován v 50 – 200 µl RIPA pufru s přidaným inhibitorem proteáz PMSF (0,1 mg/ml), převeden do mikrozukavky a inkubován po dobu nejméně 20 minut na ledu. Následně byl vzorek centrifugován 5 minut, 15 300 rpm, 4 °C (centrifuga Microfuge R; rotor F241,5; Beckman). Supernatant byl opatrně odebrán do nové mikrozukavky a smíchán s ¼ objemu 5x koncentrovaného Laemmliho pufru. Takto připravený vzorek

byl 5 minut povařen a po vychladnutí rozdělen pomocí SDS-PAAGE (viz kapitola 4.2.5.2.).

Materiál:

1x PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM Na₂HPO₄; 6,5 mM KH₂PO₄; pH 7,4)

RIPA pufr (150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 50 mM Tris-HCl, pH=7,4; 0,05% NP-40; 1% deoxycholát sodný; 1% Triton X-100; 0,1% SDS)

PMSF (0,1 mg/ml)

Laemmliho pufr (5% SDS; 50mM Tris-HCl, pH=6,8; 50% glycerol;

25% β -merkaptoethanol; 0,005% bromfenolová modř)

4.2.5.2. SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAAGE)

Skla a „spacery“ pro elektroforézu byly postupně umyty čistícím prostředkem, destilovanou vodou a denaturovaným lihem, osušeny a nakonec uchyceny do aparatury na nalévání gelů. Poté byl vložen hřeben na vytvoření jamek a na předním skle byl vyznačen spodní okraj zubů hřebenu. Hřeben byl vyjmut a do připravené aparatury byl nalit spodní 10% dělicí gel do výšky 1 cm pod značku a převrstven demineralizovanou vodou. Po 30 minutách polymerace spodního gelu byla voda slita a byl nanesen vrchní 5% zaostřovací gel, do něhož byl zasunut hřeben. Zuby tvořící budoucí jamky pro nanášení vzorků byly obtaženy lihovým popisovačem.

Spodní 10% dělicí gel (celkový objem 12 ml):

4 ml 30% akrylamidu

4,5 ml 1M Tris-HCl (pH=8,8)

120 μl 10% SDS (Sigma)

3,25 ml demineralizované vody

*40 μl 10% amonium persulfátu

*8,5 μl TEMED

Vrchní 5% zaostřovací gel (celkový objem 3 ml):

0,5 ml 30% akrylamidu

0,375 ml 1M Tris-HCl (pH=6,8)

30 μl 10% SDS (Sigma)

2,11 ml demineralizované vody

*20 μ l 10% amonium persulfátu

*5 μ l TEMED

*Přidáno těsně před nalitím gelu v uvedeném pořadí.

Po zpolymerování vrchního gelu (30 minut) byl opatrně vysunut hřeben, gel byl vyjmut z nalévací aparatury a vložen do aparatury elektroforetické, která byla po okraj naplněna elektroforetickým pufrem. Do jedné z jamek vzniklých vložením hřebenu byl nanesen marker molekulových hmotností a do zbylých jamek byly naneseny vzorky (2-20 μ l; příprava viz kapitola 4.2.5.1.). Ty byly nejdříve zaostřeny ve vrchním gelu při intenzitě elektrického pole 80 V/cm, a poté, co dosáhly rozhraní gelů a intenzita byla zvýšena na 120 V/cm, byly děleny tak dlouho, dokud čelo označené bromfenolovou modří nedorazilo ke spodnímu okraji gelu. Gel byl po elektroforéze fixován a barven (viz kapitola 4.2.5.3.) nebo zpracován metodou western blotu (viz kapitola 4.2.5.4.).

Materiál:

Spodní dělicí 10% PAA gel

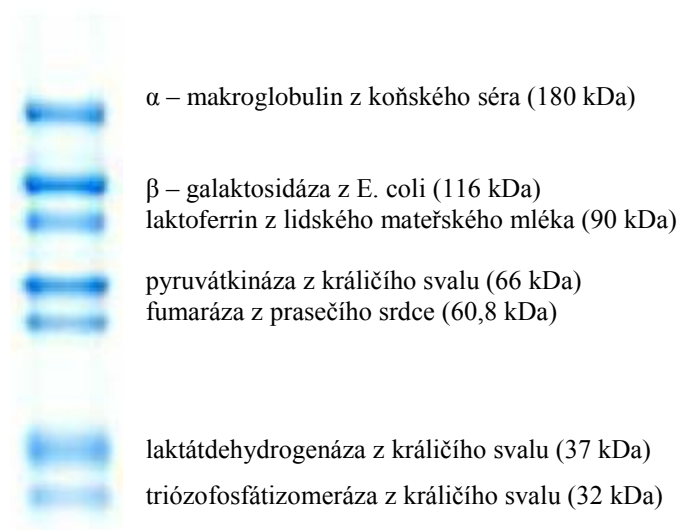
Vrchní zaostřovací 5% PAA gel

5x koncentrovaný Laemmliho pufř (5% SDS; 50mM Tris-HCl, pH=6,8; 50% glycerol;
25% β -merkaptoethanol; 0,005% bromfenolová
modř)

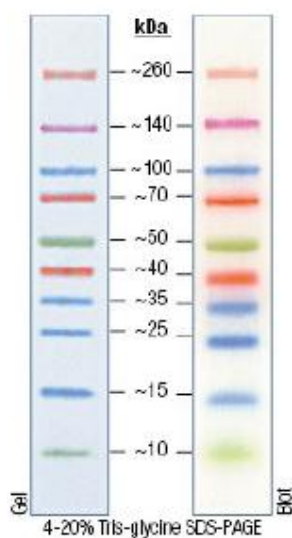
1x elektroforetický pufř (25 mM Tris; 192 mM glycin; 0,1% SDS; pH=8,3)

Marker molekulových hmotností Prestained Molecular Weight Marker – před použitím nutno 2 minuty povařit (Sigma-Aldrich)

Marker molekulových hmotností Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas)



Obr. 4.2.: Marker molekulových hmotností Prestained Molecular Weight Marker (Sigma-Aldrich).
Převzato z www.sigmaaldrich.com



Obr. 4.3.: Marker molekulových hmotností pro SDS-PAGE Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas). Převzato z www.fermentas.com

4.2.5.3.: Fixace a barvení gelu po SDS-PAAGE

Gel byl vyjmut z aparatury, opláchnut dH₂O a inkubován 1 hodinu ve fixačním roztoku na kývačce. Poté byl gel vložen do barvicího roztoku, ve kterém byl ponechán přes noc při pokojové teplotě. Protože barvicí roztok může být použit opakovaně, byl

následující den slit zpět do zásobní nádobky a gel byl následně promýván v dH₂O až do odstranění nežádoucího barevného pozadí.

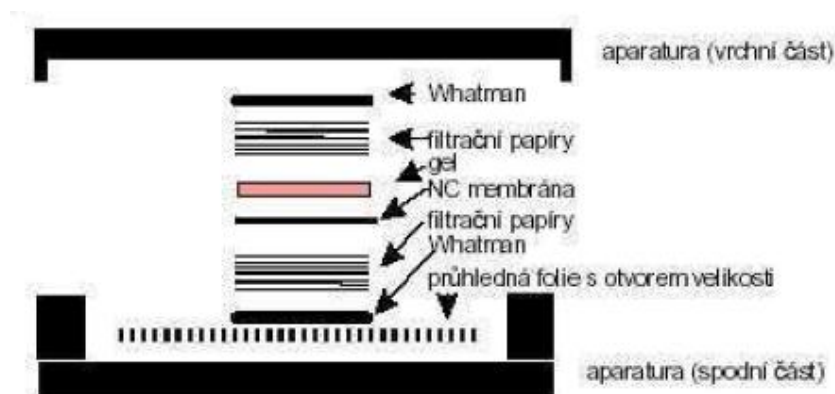
Materiál:

Fixační roztok (5% HClO₄; 50% methanol)

Barvicí roztok (0,5% CBB-G250; 3,5% HClO₄)

4.2.5.4. Western blot

Pokud nebyl gel po skončení SDS-PAAGE fixován a barven, byl vyjmut z aparatury a vložen do blotovacího pufru. Filtrační papíry, papíry Whatman a nitrocelulózová membrána NC 45 (Serva) byly nastříhány na velikost 8 x 8,5 cm a namočený do blotovacího pufru. Následně byla složena aparatura podle obrázku 4.4.. Přenos proteinů z gelu na nitrocelulózovou membránu probíhal v případě „polosuchého“ uspořádání (semidry blot) 1 hodinu při aplikaci proudu o velikosti 0,8 mA/cm².



Obr. 4.4.: Složení blotovací aparatury při polosuchém blotování. Převzato z Návody k virologickému praktiku (ŠPANIELOVÁ a LIEBL, 2003)

Materiál:

1x koncentrovaný blotovací pufr (25 mM Tris; 195 mM glycin, 20% methanol;

pH = 8,3)

4.2.5.5. Dot-blot

Vzorky (1 – 1,5 μ l) byly nakapány na nitrocelulózovou membránu NC 45 (Serva) a ta byla po jejich zaschnutí zablokována inkubací v 5% odtučněném mléku v PBS a použita k imunologické detekci (viz kapitola 4.2.4.6.).

Materiál:

1x PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM Na₂HPO₄; 6,5 mM KH₂PO₄; pH 7,4)

5% odtučněné mléko v PBS

4.2.5.6 Imunodetekce proteinů imobilizovaných na nitrocelulózové membráně

Nitrocelulózová membrána byla po western blotu či Dot-blotu byla minimálně 1 hodinu inkubována v 5% odtučněném mléku v PBS, kvůli vysycení míst, na kterých nedošlo k navázání proteinu. Poté byla vložena do fólie, která byla ze 3 stran uzavřena pomocí svářečky (Bio-Vacufresh 2, MIA). Do takto připravené fólie byl napipetován 1 ml primární protilátky (viz kapitola 4.1.9.1.) naředěné v 5% odtučněném mléku v PBS a byla uzavřena i poslední strany fólie. Membrána byla v primární protilátce inkubována při pokojové teplotě po dobu 1 hodiny a poté 3x 10 minut promývána v PBS. Následovala 30-minutová inkubace ve fólii se sekundární protilátkou konjugované s peroxidázou nebo fluorescenční značkou (viz kapitola 4.1.9.2.). I sekundární protilátky byly naředěny v 5% odtučněném mléku v PBS. Membrána byla po vyjmutí ze sekundární protilátky opět 3x 10 min promývána roztokem PBS. Detekce signálu na membráně byla provedena v temné komoře 30 sekundovou inkubací membrány ve vyvolávacím roztoku Luminolu (ECL Western Blotting Detection Reagents, Amersham) připraveným smícháním roztoků A a B bezprostředně před aplikací. Signál byl zaznamenán na RTG film (Forma), který byl vyvolán ve vývojce a ustálen ustalovačem. Doba expozice se pohybovala v rozmezí 10 vteřin – 5 min podle síly signálu.

Materiál:

5% odtučněné mléko v PBS

Primární protilátky (viz. kapitola 4.1.9.1.)

Sekundární protilátky (viz. kapitola 4.1.9.2.)

Vyvolávací roztok A (18 ml ddH₂O; 2 ml 1M Tris-HCl, pH=8,5; 200 μ l luminolu,

88 μ l kyseliny p-kumarové)

Vyvolávací roztok B (18 ml ddH₂O; 2 ml 1M Tris-HCl; pH=8,5; 20 μ l 30% H₂O₂)

Vývojka (Foma Bohemia)

Ustalovací roztok (Foma Bohemia)

1x PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM Na₂HPO₄; 6,5 mM KH₂PO₄; pH 7,4)

4.2.5.7. Nepřímé imunofluorescenční značení proteinových struktur

Sklička se zafixovanými, permeabilizovanými a vysycenými buňkami (viz kapitola 4.2.3.2.5.) byla vyjmuta z jamek a položena na 20 μ l kapku primární protilátky naředěné v PBS s 0,25% želatínou a 0,25% BSA (viz kapitola 4.1.9.1.). Buňky byly v primární protilátce ponechány 1 hodinu při laboratorní teplotě. Poté byla sklička vrácena do destičky a promyta 3x10 minut v PBS. Sekundární protilátka s konjugovanou fluorescenční značkou (viz kapitola 4.1.9.2.) byla opět naředěna do PBS s 0,25% želatínou a 0,25% BSA. Sklička byla inkubována na kapce sekundární protilátky po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Protože fluorescenční značky konjugované k protilátce jsou velmi citlivé na světlo, byly vzorky od této chvíle přikryty alobalem. Sklička byly opět vyjmuty z kapky, vráceny do jamky a promyty 3x 10 minut PBS. Sklička byla opláchnuta v dH₂O a montována do kapky 50% glycerolu s DAPI. Takto obarvené vzorky byly pozorovány fluorescenčním mikroskopem BX-60 (Olympus).

Snímky prezentované v této práci byly pořízeny na konfokálním mikroskopu Leica TCS SP2 (Leica) Mgr. Vojtěchem Žílou.

Materiál:

1x PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM Na₂HPO₄; 6,5 mM KH₂PO₄; pH 7,4)

Blokovací roztok (0,25% želatína, 0,25% BSA v PBS)

Primární protilátky (viz kapitola 4.1.9.1.)

Sekundární protilátky konjugované s fluorescenční značkou (viz kapitola 4.1.9.2.)

Montovací roztok (50% glycerol, DAPI 0,1 μ g/ml)

4.2.5.8. Stanovení koncentrace proteinů podle Bradfordové

Metoda Bradfordové je rychlá kolorimetrická metoda sloužící k určení koncentrace proteinů ve vzorku. Podstatou této metody je reakce modrého barviva Coomassie Brilliant Blue (CBB-G250) s bazickými a aromatickými aminokyselinami za

přítomnosti kyseliny fosforečné, která vede ke změně zbarvení roztoku obsahujícího proteiny. Měření absorbance (spektrofotometr Heλios β, Thermo Electron Corporation) bylo prováděno při 595 nm proti srovnávacímu vzorku představovaném čistým rozpouštědlem (v našem případě pufr B). Pokud se absorbance pohybuje mezi 0,2 – 0,8 je zbarvení roztoku přímo úměrné koncentraci proteinů a proto je možné na základě hodnot absorbance standardních vzorků sestavit kalibrační křivku a z rovnice regrese stanovit koncentraci vzorků neznámých. Jako standard byly použity roztoky BSA v B pufru o koncentracích 0,1 – 1 mg/ml.

Bylo smícháno 20 μ l vzorku a 1 ml činidla Bradfordové a takto připravená směs byla přenesena do kyvety. Následně byla na spektrofotometru změřena absorbance a za pomoci regresní rovnice kalibrační křivky spočítána koncentrace proteinů v analyzovaném vzorku.

Materiál:

Pufr B (10 mM Tris-HCl, pH= 7,4; 150 mM NaCl; 0,01 mM CaCl₂)

Standardní vzorky BSA v B pufru (0,1 – 1 mg/ml)

Činidlo Bradfordové (0,1 mg/ml CBB-G250, 10% H₂PO₂, 5% ethanol)

4.2.5.9. Negativní barvení a příprava preparátů pro elektronovou mikroskopii

Měděné síťky pokryté parlodionovým podložním filmem s napařenou uhlíkovou vrstvou byly položeny na 5 μ l kapku vzorku. Po absorpci vzorku (5 – 15 minut) byla síťka promyta 2x 1 minutu na 100 μ l kapkách dH₂O a obarvena 2x 1 minutu na 50 μ l kapkách 2% PTA (kyselina fosfowolframová; pH = 7,4; Fluka). Přebytek barviva byl velmi opatrně odsát okrajem filtračního papíru. Preparát byl usušen na vzduchu při laboratorní teplotě. Snímky byly pořízeny elektronového mikroskopu JEOL JEM 1200 EX, který pracuje při urychlovacím napětí 60 kV.

Elektronmikroskopické snímky prezentované v této diplomové práci byly zhotoveny Mgr. Martinem Fraiberkem za asistence dr. Jitky Štokrové, CSc.

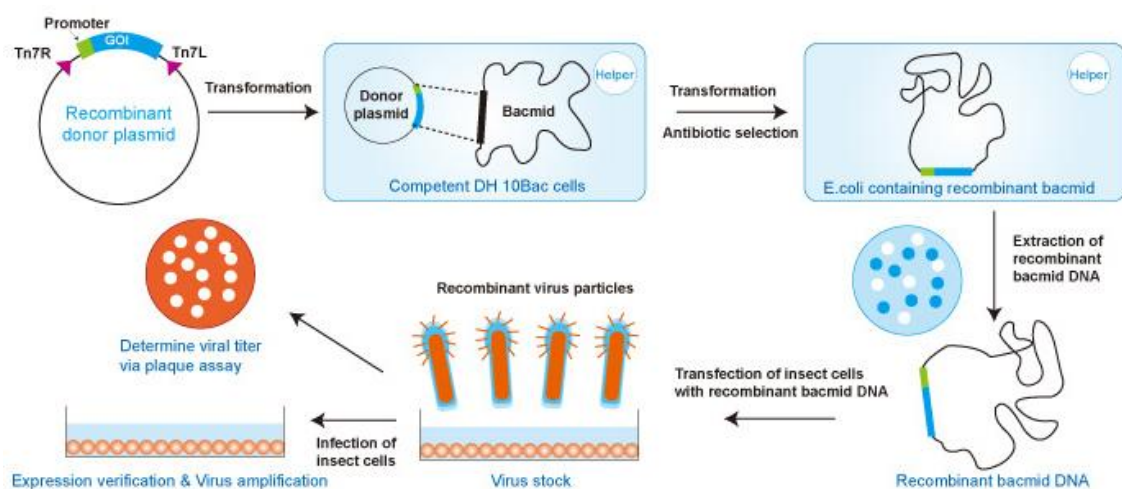
Materiál:

2% kyselina fosfowolframová

4.2.5.10. Expresse rekombinantních proteinů – systém Bac-to-Bac (Invitrogen)

K produkci rekombinantních proteinů byl použit bakulovirový expresní systém Bac-to-bac (Invitrogen). Jedná se o eukaryotický expresní systém, založený na hmyzím viru AcMNPV (*Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus) z čeledi *Baculoviridae*. V pozdní fázi infekce tento virus produkuje díky velmi silnému promotoru velké množství proteinu polyhedrinu, který tak následně tvoří až 50% celkového množství proteinů v infikované buňce. Pro infekci a replikaci viru je ovšem postradatelný a proto může být jeho sekvence v genomu metodami molekulární biologie nahrazena genem jiným. Stejný princip lze uplatnit i v případě dalšího pozdního proteinu p10. Gen našeho zájmu je poté díky působení silného promotoru (polyhedrinového či p10 promotoru) exprimován a produkován hmyzími buňkami infikovanými takto upraveným bakulovirem. Morfologie plaků tvořených rekombinantním virem v tkáňové kultuře je odlišná od těch tvořených divokým typem viru, takže je možné selektivně vybrat pouze rekombinantní provedení jednoduché plakové zkoušky. Nejmodernější systému již ale purifikaci rekombinantního viru od viru divokého typu pomocí plakových zkoušek nevyžadují. Nepostradatelnou součástí expresního systému je sada donorových plazmidů (FastBac 1 obsahující pouze polyhedrinový promotor nebo FastBac Dual obsahující polyhedrinový i p10 promotor, viz kapitola 4.1.3.) a speciální kmen recipientní bakterie *E. coli* DH10Bac. Nejdříve je vždy nutné připravit donorový plazmid vložením genu našeho zájmu do polylinkeru pod kontrolou silného bakulovirového promotoru (polyhedrinového nebo p10 promotoru). Za vloženým genem se nachází eukaryotický poly-A signál, v případě polyhedrinového promotoru je to poly-A viru SV40 a v případě p10 promotoru se jedná o poly-A signál thymidin-kinázy viru HSV. Na plazmidu jsou rovněž přítomny selekční geny (rezistence proti gentamicinu a ampicilinu). Expresní kazeta skládající se z promotorů, vložených genů, poly-A signálů a selekčního markeru (rezistence proti gentamicinu) je z obou stran obklopena sekvencemi pro místně specifickou transpozici (Tn7L a Tn7R). Připraveným donorovým plazmidem jsou následně elektroporací transformovány bakterie kmene *E. coli* kmene DH10Bac, které nesou recipientní bakulovirový kyvadlový vektor (bakmid) s mini-attTn7 transpozičním místem. Bakterie obsahují také pomocný plazmid kódující enzym transpozázu, která je nezbytná pro uskutečnění místně specifické transpozice mezi Tn7 elementy donorového plazmidu a mini-attTn7 elementem bakmidu. Transpozicí vzniká rekombinantní bakmid obsahující sekvenci našeho zájmu. Bakterie jsou po transformaci vysety na pevné médium obsahující

antibiotika, chromogenní substrát X-gal a induktor IPTG. Netransfekované bakterie umírají, protože nejsou rezistentní vůči přítomným antibiotikům. Odlišení pozitivních kolonií, tedy těch, u kterých úspěšně proběhla transpozice, od negativních je možné díky jejich barevnému rozdílu. Segment mini-attTn7 je totiž umístěn v genu *LacZa*, jehož čtecí rámec je po transpozici přerušen, a v buňkách poté nedochází k expresi funkční β -galaktozidázy. Zatímco pozitivní kolonie tvoří na povrchu pevného média bílé kolonie, negativní kolonie začnou působením induktoru IPTG (izopropyl- β -thiogalaktopyranosidáza, analog laktózy) začnou produkovat β -galaktozidázu, která katalyzuje přeměnu chromogenního substrátu X-gal, což vede ke vzniku modrého zabarvení. Dalším krokem je zaočkování rekombinantních monoklonií do tekutého média s obsahem příslušných antibiotik (viz kapitola 4.1.8.), následované izolací bakmidové DNA (viz kapitola 4.2.4.13) a ověřením přítomnosti rekombinantní sekvence pomocí PCR (viz kapitola 4.2.4.10.). Ověřená bakmidová DNA je nakonec použita k transfekci hmyzích buněk Sf9 (viz kapitola 4.2.3.1.2.), z nichž je získán vznikající rekombinantní bakulovirus.



Obr. 4.5.: Expresní systém Bac-to-Bac.

Donorový plasmid s genem našeho zájmu je použit k transformaci kompetentních bakterií *E. coli* DH10Bac, ve kterých dojde k místně specifické transpozici mezi vektorem a bakmidem. Následuje výběr pozitivních kolonií s rekombinantním bakmidem (antibiotiková selekce a barevná selekce pomocí LacZ), izolace bakmidu a po jeho ověření transfekce do hmyzích buněk Sf9. Získaný rekombinantní bakulovirový kmen může být použit k infekci hmyzích buněk a produkci rekombinantního proteinu.

Převzato z genscript.com

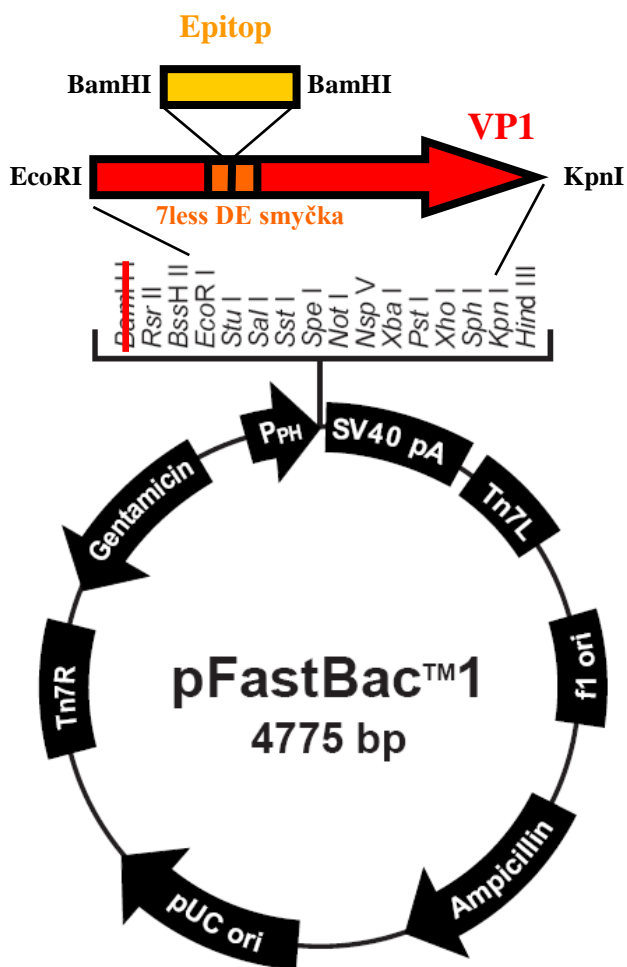
5. VÝSLEDKY

5.1. KONSTRUKCE CHIMERICKÝCH VIROVÝCH KAPSID MYŠÍHO POLYOMAVIRU NESOUCÍCH NA SVÉM POVRCHU CIZORODÉ EPITOPY

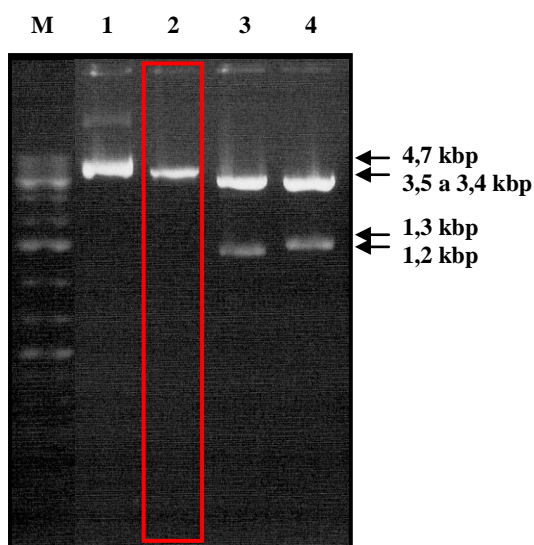
Hlavním cílem mé diplomové práce byla příprava tří různých typů chimerických kapsid myšího polyomaviru, které na svém povrchu nesou cizorodé epitopy. Jednalo se o epitop kuřecího ovalbuminu a dva epitopy odvozené od jednoho z antigenů asociovaných s melanomem, proteinu MART-1/Melan-A. Epitopy lidské a myší varianty tohoto antigenu se od sebe vzájemně odlišují pouze jedinou aminokyselinou. K produkci rekombinantních proteinů VP1 byl ve všech případech použit bakulovirový expresní systém Bac-to-Bac (Invitrogen, viz kapitola 4.2.5.10.).

5.1.1. Příprava donorového plazmidu

Nejdříve bylo třeba pro účely budoucí exprese mírně modifikovat donorový plazmid pFastBac1 (viz obr. 5.1., viz kapitola 4.1.3.), který byl pro tyto potřeby vyizolován metodou maxipreparace plazmidové DNA (kapitola 4.2.4.2.) z kompetentních bakterií *E. coli* XL1-Blue (viz kapitola 4.2.2.). Úprava spočívala v odstranění cílového štěpného místa rozpoznávaného restriční endonukleázou BamHI z polylinkeru (MCS = multiple cloning site), aby bylo umožněno pozdější použití flexibilní glycin-serinové spojky. Toho bylo dosaženo naštěpením plazmidu danou restriktázou, následným doplněním přesahů pomocí DNA polymerázy I a zaligováním vzniklých tupých konců pomocí T4 DNA ligázy v přítomnosti PEG, který zvyšuje účinnost ligace. Úspěšné zrušení štěpného místa bylo ověřeno přípravou restriční směsi obsahující dvě restriční endonukleázy, které by v případě nezdaru rozštěpily plazmid na dva přesně definované fragmenty (1,2 a 3,5 kbp). Nicméně k takovéto situaci v našem případě nedošlo a žádné takové fragmenty detekovány nebyly, čímž bylo potvrzeno vymazání BamHI štěpného místa z polylinkeru (obr. 5.2.).



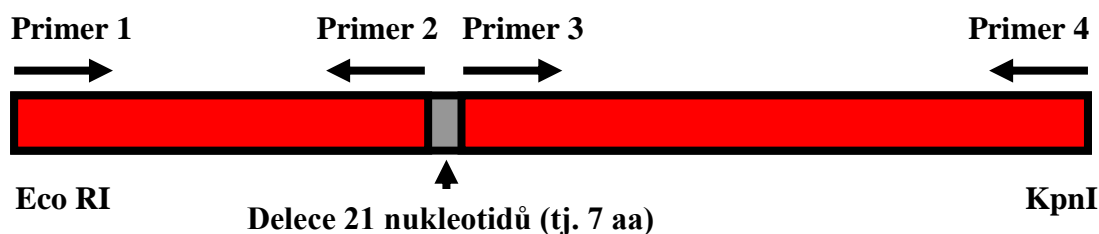
Obr. 5.1.: Schématické znázornění několikakrokové přípravy expresní kazety v donorovém plazmidu pFastBac 1 (Invitrogen). Nejdříve bylo v polylinkeru deletováno restrikční místo pro BamHI (červená čára). Poté byly přes restrikční místa EcoRI, BamHI a KpnI vloženy obě části proteinu VP1 (VP1/1 a VP1/2), čímž vznikl 7less_VP1 (červeně) s linkerem a BamHI štěpným místem v DE smyčce (oranžově). Do linkeru byl přes restrikční místo BamHI vložen zvolený epitop (žlutě). Celý konstrukt byl zaklonován pod silný polyhedrinový promotor (P_{PH}). Převzato a upraveno z http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pfastbac1_map.pdf



Obr. 5.2.: Ověření zrušení restrikčního místa BamHI v MCS. 1% agarózový gel, M označuje marker molekulových vah DNA GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Fermentas, 3 μ l), 1 neštěpený plazmid pFastBac 1 (2 μ l), 2 plazmid štěpený BamHI a EcoRV (5 μ l), 3 plazmid štěpený EcoRI a EcoRV (5 μ l), 4 plazmid štěpený KpnI a EcoRV (5 μ l). V dráze 2 je patrné, že nedochází k vyštěpení fragmentu štěpné místo pro restriktazu BamHI bylo úspěšně zrušeno. Dráhy 3 a 4 představují kontrolní štěpení.

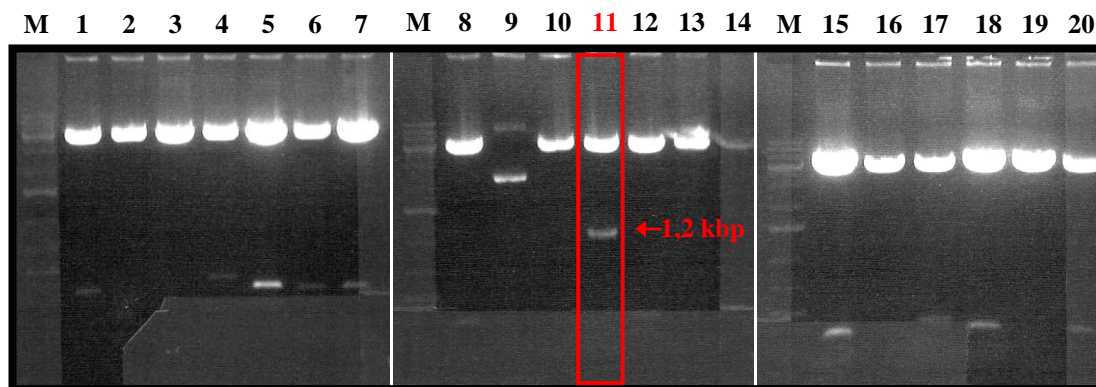
Protože pravděpodobnost narušení struktury a stability proteinu se s délkou vloženého cizorodého úseku zvyšuje, byl v dalším kroku gen pro protein VP1 ještě před vnesením nukleotidových sekvencí cizorodých epitopů zkrácen o oblast kódující 7 aminokyselin. Tyto aminokyseliny, nacházející se v DE smyčce proteinu, byly již dříve úspěšně odstraněny a bylo ověřeno, že stabilita takto mutovaného proteinu a z něj vzniklých částic zůstává zachována (GARCIA *et al.*, 2000). Pro přípravu tohoto konstruktu (viz obr. 5.3.), námi označeného jako VP1_7less, bylo třeba nezávisle na sobě pomocí PCR (viz kapitola 4.2.4.10.) naamplifikovat 2 části genu pro VP1 myšího polyomaviru tak, aby byly vydeletovány kodóny pro 7 aminokyselin v DE smyčce a zároveň byl do místa delece pomocí navržených primerů (viz kapitola 4.1.6.) vložen 24 nukleotidů dlouhý glycin-serinový linker s cílovým místem pro restriktázu BamHI pro budoucí vložení příslušného epitopu. První část genu VP1, o velikosti přibližně 500 bp, byla označena jako VP1/1 a druhá část, čítající přibližně 700 bp, pak jako VP1/2. Pro amplifikace byla použita termostabilní polymeráza Vent (Fermentas). Jako templát sloužil plazmid pMJG se zaklonovaným genomem MPyV (viz kapitola 4.1.3.). Reakční směs na PCR byla namíchána dle doporučení výrobce. Stejně tak jsme se drželi pokynů výrobce při nastavení vhodných podmínek pro reakci, přičemž pro nasedání primerů jsme prověřovali několik různých teplot (55 °C – 65 °C). Bylo vyzkoušeno i několik různých elongačních časů (3 – 5 min). Všechny varianty nastavení dávaly vzniknout stejným produktům. Pro produkci proteinů byl zvolen cyklus s teplotou nasedání primerů 65 °C, kdy by nasedání primerů mělo být nejspecifičtější, a 3 minutovou délkou elongace, která je na syntézu námi zvolených úseků naprosto dostačující. Kvalita PCR produktu byla opět ověřena elektroforeticky.

VP1_7less:



5.3.: Schematické znázornění cílené delece 21 nukleotidů v sekvenci genu pro MPyV VP1 pomocí PCR.

Aby mohly být namnožené úseky vloženy do upraveného plazmidu FastBac 1, bylo nejprve nutné naštěpit nejen plazmid, ale i oba fragmenty genu pro VP1 vhodnými restrikčními enzymy. S tím bylo samozřejmě počítáno už při návrhu primerů pro PCR, a tak byla sekvence VP1/1 obklopena štěpnými místy pro EcoRI a BamHI a úsek VP1/2 pro změnu cíli restrikčních endonukleáz BamHI a KpnI. Enzymy EcoRI a KpnI byly záměrně vybrány proto, že rozpoznávají sekvence v MCS plazmidu a jsou je schopny účinně štěpit. Důvody volby BamHI byly zmíněny již dříve. Takto zvolená kombinace umožnila orientované vložení obou úseků VP1 do plazmidu a zároveň jejich spojení v místě vnesené delece. Plazmid FastBac 1 byl tedy opracován restrikcemi EcoRI a KpnI, čímž došlo k vyštěpení krátkého úseku DNA z MCS a ke vzniku specifických vzájemně nekomplementárních kohezivních konců. Ty byly po preventivní defosforylaci pomocí alkalické fosfatázy hybridizovány s odpovídajícími přesahy na molekulách VP1/1 a VP1/2, vzniklými působením výše zmíněných enzymů. V místě vnesené delece došlo ke spojení obou částí genové sekvence VP1 a tak ke cirkularizaci celé molekuly. Defosforylace (viz kapitola 4.2.4.9.) v tomto případě slouží spíše k zabránění znovuspojení nedokonale naštěpených plazmidů a tím k jejich vyloučení z dalších procesů, kde by zbytečně snižovaly výtěžek reakcí. Konce kompletně naštěpeného vektoru si totiž neodpovídají a neměly by se tudíž spojovat ani bez defosforylace. Zlomky přítomné v takto vzniklé cirkulární molekule byly zaceleny T4 DNA ligázou (viz kapitola 4.2.4.12.). Z ligační směsi inkubované přes noc při pokojové teplotě byl 1 μ l použit k transformaci kompetentních bakterií *E. coli* XL1-Blue (viz kapitola 4.1.5.) pomocí elektroporace (viz kapitola 4.2.2.3.). Bakterie byly v různých množstvích vysety na Petriho misky s pevným médiem s přídatkem ampicilinu a přes noc pěstovány v termostatu při 37 °C. Z narostlých monoklonií bylo vybráno 20 pro izolaci rekombinantního plazmidu metodou minipreparace plazmidové DNA (viz kapitola 4.2.4.3.). Vložení mutovaného genu pro VP1 myšího polyomaviru bylo ověřeno restrikční analýzou a následnou agarózovou elektroforézou (viz obr. 5.4.). Z 20 zvolených kolonií pouze jediná nesla plazmid se správně vloženým genem. Tato kolonie byla pomnožena a čistý plazmid získaný pomocí kitu QIAprep Spin Miniprep Kit (viz kapitola 4.2.4.4.) byl zaslán k analýze do sekvenační laboratoře.

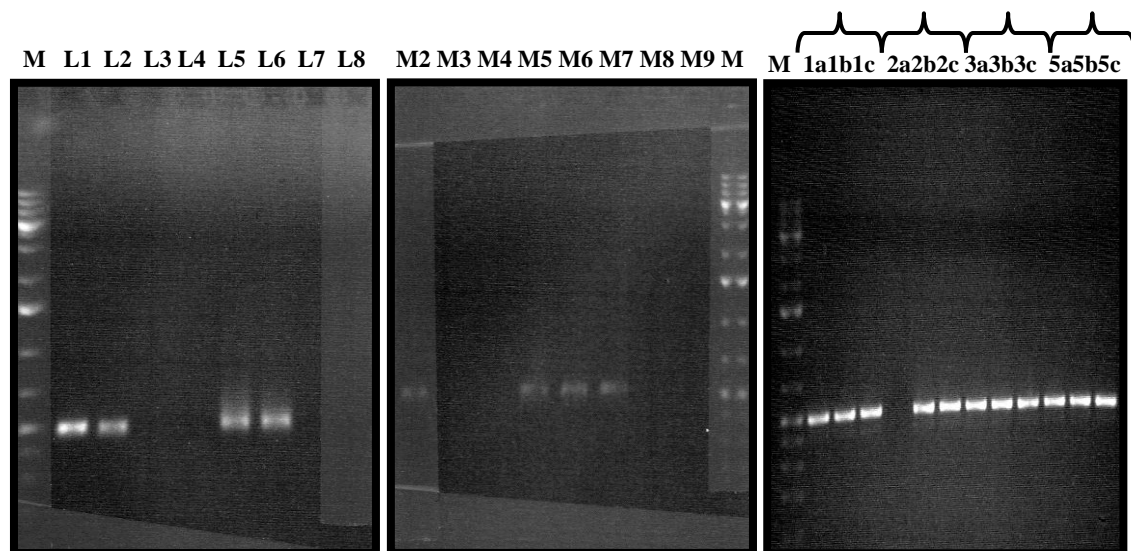


Obr. 5.4.: Ověření úspěšného vložení obou částí mutovaného genu pro protein VP1 myšího polyomaviru do plazmidu FastBac 1. 1% agarózový gel, M označuje marker molekulových vah (4 μ l), 1 – 20 jsou plazmidy po štěpení restriktázami EcoRI a KpnI (20 μ l). Pouze v dráze 11 je patrné vyštěpení fragmentu o velikosti odpovídající genu VP1, tedy přibližně 1,2 kbp.

Shoda nukleotidové posloupnosti sestavené na základě výsledků zaslanych sekvenační laboratoří s genem MPyV VP1 byla potvrzena programem BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

V této fázi přípravy rekombinantních plazmidů již nastal okamžik, kdy mohlo být přikročeno k tvorbě tří různých konstruktů. Ověřený plazmid byl linearizován restriktázou BamHI a konce molekuly byly defosforylovány alkalickou fosfatázou. Příslušné epitopy (ovalbuminový, myší melanomový, lidský melanomový – viz kapitola 4.1.7.) byly připraveny hybridizací syntetických oligonukleotidů (viz kapitola 4.2.4.11.), které byly vytvořeny na zakázku firmou KRD. Byly připraveny tři ligační směsi obsahující defosforylovaný linearizovaný plazmid a vždy jeden z epitopů. Tyto směsi byly následně použity k elektroporaci do kompetentních bakterií *E. coli* XL1-Blue. Z monoklonií vyrostlých po kultivaci na pevném médiu s ampicilinem bylo vybráno vždy 24, které byly namnoženy a metodou minipreparace z nich byl získán plazmid. Vložení epitopu nemohlo být ověřeno standardní restriktční analýzou, protože vyštěpený úsek by byl příliš krátký a špatně detekovatelný. Úspěšnost konstrukce jsme proto ověřovali pomocí PCR a následně provedené agarózové elektroforézy (viz obr. 5.5.). K tomuto účelu byl použit jako přímý primer VP1_1F a jako reverzní primer jeden ze tří syntetických oligonukleotidů MELAN-A (M)2, MELAN-A (L)2 nebo OVA 2. K amplifikaci byla použita polymeráza Vent. Vybrané pozitivní kolonie posloužily k izolaci plazmidů ve vysoké čistotě, které bylo dosaženo použitím kitu QIAprep Spin

Miniprep Kit. Purifikované plazmidy byly před dalším použitím odeslány k dalšímu prověření do sekvenační laboratoře. Obdržené výsledky byly opět zpracovány pomocí programu BLAST, kterým byla potvrzena správnost sekvence.

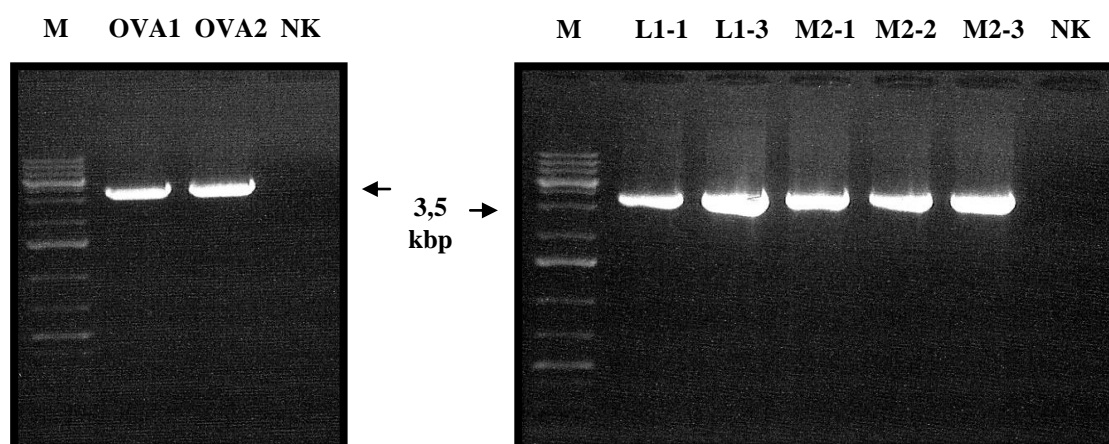


Obr. 5.5.: Ověření úspěšného vložení cizorodých epitopů do sekvence proteinu VP1. 1% agarózový gel, M označuje marker molekulových vah (3 μ l), 1a – 5c (ovalbuminový epitop), L1 – L8 (lidský melanomový epitop), M2 – M9 (myší melanomový epitop) jsou PCR produkty (2 μ l) o velikost přibližně 500 bp, dokazující zdárné vložení daných úseků.

5.1.2. Příprava rekombinantního bakmidu

Po ověření správnosti všech tří zkonstruovaných donorových plazmidů (schéma viz obr. 5.1.) jimi byly, samozřejmě nezávisle, elektroporací transformovány kompetentní bakterie *E. coli* DH10Bac (viz kapitola 4.1.5.), které v sobě nesou nejen recipientní bakmid, ale i pomocný plazmid kódující transpozázu, enzym nezbytně nutný k rekombinaci mezi bakmidem a rekombinantním plazmidem. Transpozáza katalyzuje místně specifickou rekombinaci mezi mini-*att*Tn7 elementem bakmidu a Tn7 úseky obklopující MCS s vloženým rekombinantním genem na plazmidu. Po transformaci byly buňky pěstovány po dobu 48 hodin a 37°C na plotnách s pevným médiem, ve kterém byla přidána antibiotika kanamycin, tetracyklin a gentamicin, induktor IPTG a chromogenní substrát X-gal. Při úspěšném vložení mutovaného genu do bakmidu dojde k přerušení sekvence pro α podjednotku β -galaktozidázy a nemůže tedy její činností dojít ke vzniku modrého zbarvení, pozitivní kolonie jsou tudíž bílé, na rozdíl od

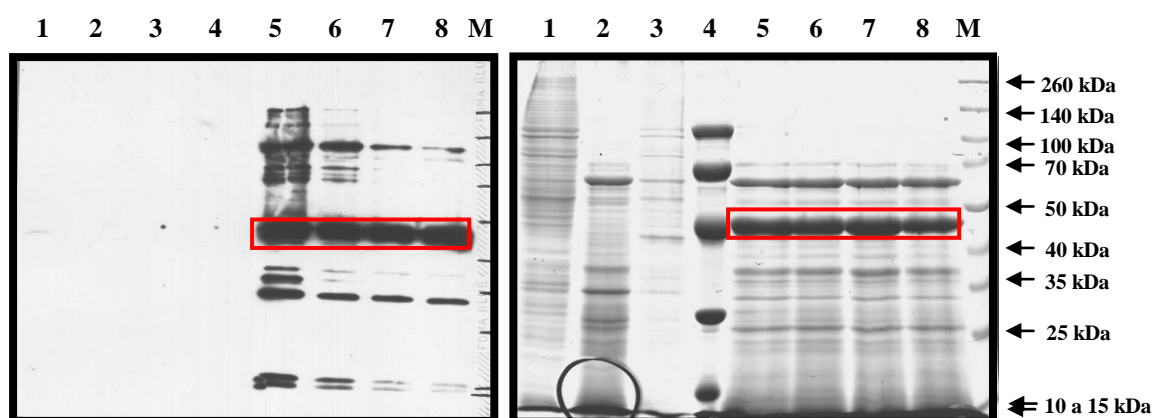
modrých netransformovaných kolonií. Vyselektované monokolonie úspěšně transformovaných bakterií byly namnoženy a použity k izolaci rekombinantních bakmidů (viz kapitola 4.2.4.13.), jejichž intaktnost byla ověřena agarózovou elektroforézou. Bakmidy následně posloužily jako templát při PCR amplifikaci. K reakci byly použity sekvenační primery pUC/M13 (přímý a reverzní, viz kapitola 4.1.6.) a polymerázový mix High Fidelity PCR enzyme mix (Fermentas). PCR cyklus byl nastaven podle kapitoly Analyzing Recombinant Bacmid DNA by PCR v manuálu k systému Bac-to-Bac (Invitrogen). Iniciační denaturace při 93°C trvala 3 minuty, zatímco ostatní denaturační kroky probíhaly 45 sekund při 94°C. K nasedání primerů byla doporučena teplota 55°C a doba 45 sekund. Syntetická fáze probíhající při 72°C byla, vzhledem k poměrně vysoké délce amplifikované sekvence (~3,5 kbp), prodloužena na 5 a poslední syntetický krok až na 7 minut. Celý cyklus byl opakován 25x. Správná velikost produktů PCR byla potvrzena elektroforézou v 1% agarózovém gelu (viz obr. 5.6.) a následně i sekvenací pomocí sekvenačních primerů pUC/M13.



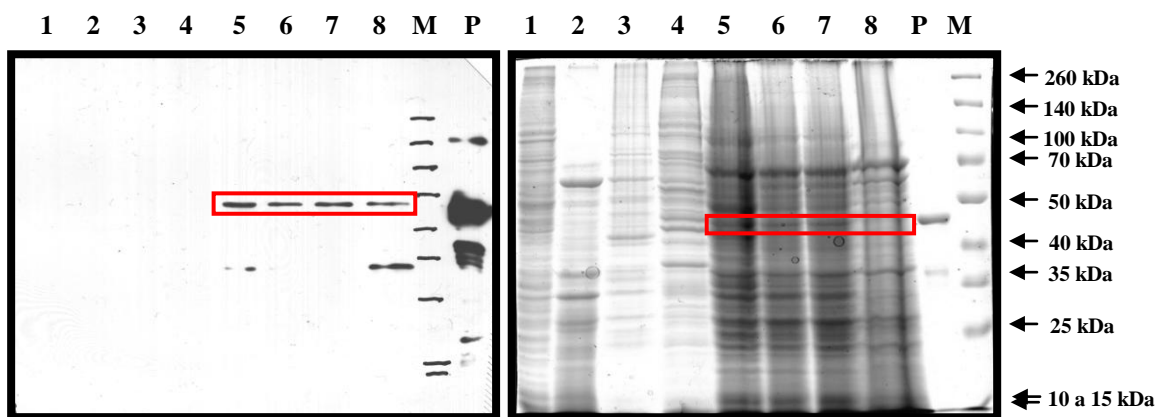
Obr. 5.6.: Ověření velikosti produktů PCR. Po vložení upraveného genu pro VP1 myšího polyomaviru by měl produkt PCR dosahovat velikosti přibližně 3,5 kbp, což bylo potvrzeno pomocí elektroforézy v 1% agarózovém gelu. M označuje marker molekulových vah (3 μ l), NK negativní kontroly, OVA1 – M2-3 produkty PCR s templátem v podobě rekombinantních bakmidů nesoucích mutovaný gen pro VP1 s vloženým cizorodým epitopem (OVA – ovalbuminový epitop, L – lidský melanomový epitop, M – myší melanomový epitop; 5 μ l)

5.1.3. Příprava rekombinantního bakuloviru

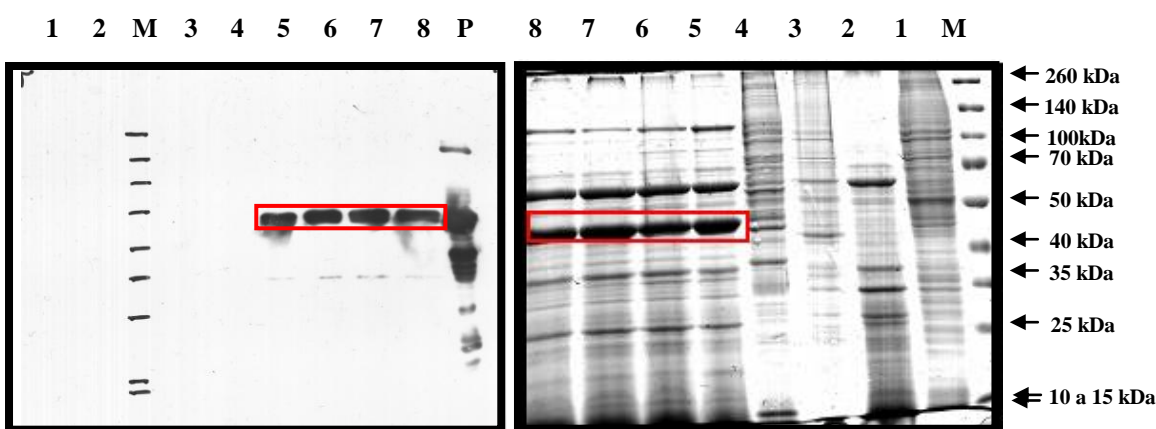
Když byla kompletní sekvence rekombinantních bakmidů sestavená z dat získaných ze sekvenační laboratoře zanalyzovány programem BLAST a tak bylo zjištěno, že je neporušená, byly bakmidy použity k transfekci kultury hmyzích buněk Sf9 (viz kapitoly 4.1.4. a 4.2.3.1.2.). Se získanými transfekčními inokuly byla 6 dní po transfekci provedena plaková zkouška (viz kapitola 4.3.3.1.4.). Za 7 dní bylo možné pomocí lupy s bočním světlem pozorovat vyvinuté plaky, které byly označeny, vypíchnuty a virus obsažený v plaku byl pomnožen na dalších buňkách Sf9. Produkce heterologních proteinů byla po 6 dnech infekce ověřena na buněčných lyzátech pomocí SDS-polyakrylamidové gelové elektroforézy (viz kapitola 4.2.5.2.). Vždy byly paralelně zhotoveny 2 gely, z nichž jeden byl zafixován a obarven pomocí roztoku Coomassie Brilliant Blue G250 (viz kapitola 4.2.5.3., obr. 5.7. vpravo) a z druhého byly rozdělené vzorky metodou western blot (viz kapitola 4.2.5.4.) přeneseny na nitrocelulóзовou membránu a protein VP1 byl detekován imunologicky pomocí specifických protilátek (viz kapitola 4.2.5.6., obr. 5.7. vlevo). K tomuto účelu byla použita jako primární myší monoklonální protilátka proti proteinu VP1 myšího polyomaviru a jako sekundární kozi protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou. Po ověření přítomnosti rekombinantního proteinu VP1 v lyzátu buněk bylo bakulovirové inokulum použito na infekci většího množství buněk, aby bylo získáno dostatečné kvantum viru na izolaci chimerických částic tvořených rekombinantním proteinem VP1.



VP1 s ovalbuminovým epitopem



VP1 s epitopem lidského melanomu



VP1 s epitopem myšního melanomu

Obr. 5.7.: Ověření přítomnosti rekombinantních proteinů VP1 v lyzátu hmyzích buněk. M označuje marker molekulových hmotností pro SDS-PAGE Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas, viz kapitola 4.2.5.2.), 1) lyzát neinfikovaných buněk Sf9, 2) lyzát buněk Sf9 infikovaných divokým bakulovirem, 3) lyzát buněk Sf9 infikovaných rekombinantním bakulovirem produkujícím VP1 divokého typu, 4) pozitivní kontrolu (ovalbumin nebo lyzát melanomových buněk B16-F10), P částice VP1 divokého typu, 5)-8) lyzáty buněk Sf9 infikovaných příslušnými rekombinantními bakuloviry produkujícími VP1 s vloženými cizorodými epitopy. Červený rámeček označuje 45 kDa rekombinantní protein VP1. Vlevo membrány vyvolané pomocí primární myši protilátky proti MPyV VP1 a sekundární kozí protilátky proti myším imunoglobulinům konjugované s křenovou peroxidázou. Vpravo polyakrylamidové gely obarvené CBB-G250.

5.1.4. Izolace a analýza chimerických kapsid myšního polyomaviru

Jednotlivými namnoženými virovými inokuly (nazvanými VP1_OVA, VP1_MelanM, VP1_MelanL) bylo infikováno po šesti miskách (o průměru 10 cm)

buněk Sf9 (viz kapitola 4.2.3.1.3.), které byly po 5 dnech od nainfikování použity na izolaci chimerických částic (viz kapitola 4.2.3.1.5.). Přítomnost rekombinantního proteinu byla před samotnou izolací znovu potvrzena elektroforeticky a následným western blotem a imunologickou detekcí. Poté už bylo přistoupeno k vlastní izolaci. Po odstranění zbytků buněk nízkoobrátkovou centrifugací byly uvolněné umělé virové částice přečištěny od nízkomolekulárních látek centrifugací přes 10% sacharózový polštář (viz kapitola 4.2.3.1.6.). Následovalo rozdělení částic na základě vznášivé hustoty pomocí izopyknické centrifugace v CsCl gradientu (viz kapitola 4.2.3.1.7.). Gradient byl rozdělen na frakce pomocí rozkládače gradientu. U jednotlivých frakcí byl změřen refraktometrický index a přítomnost rekombinantního proteinu VP1 prověřena metodou Dot-blot (viz kapitola 4.2.5.5.) a imunologickou detekcí (viz kapitola 4.2.5.6.) za použití myší primární protilátky proti VP1 myšího polyomaviru (viz kapitola 4.1.9.1.) a kozí sekundární protilátky proti myším imunoglobulinům (viz kapitola 4.1.9.2.). Vznášivá hustota prázdných částic by měla být 1,29 g/ml, což odpovídá rozmezí refraktometrických indexů 1,3635 – 1,362. Oproti tomu plné částice obsahující enkapsidovanou DNA mají hustotu 1,33 g/ml a rozsah refraktometrických indexů je přibližně 1,3645 – 1,3655. Na základě změřených refraktometrických indexů a výsledků Dot-blotu byly vytvořeny tři výsledné frakce – frakce „plných“ částic, obsahující pseudokapsidy naplněné nespecifickými fragmenty DNA, frakce „prázdných“ částic a zbytková frakce, obsahující kromě intaktních částic především rozpadlý materiál (viz tabulka 5.1., 5.2. a 5.3.). Zatímco u částic nesoucích ovalbuminový a lidský melanomový epitop proběhla izolace naprosto hladce, pseudokapsidy s myším melanomovým epitopem se nedařilo vyizolovat ani v jednom případě ze tří opakovaných pokusů. Signál detekovaný při vyvolávání membrány s nakapanými vzorky frakcí po rozebrání CsCl gradientu byl slabý a naše obavy, že byly částice zřejmě někde v průběhu izolace ztraceny, byly následně potvrzeny elektronovou mikroskopií. Problém nastával už při přípravě vzorku na izopyknickou centrifugaci. CsCl se nerozpouštěl snadno jako v předchozích případech, ale v roztoku se vytvořily bílé nerozpustné sraženiny. Při čtvrtém opakování jsme se proto rozhodli zanalyzovat i sraženinu, složenou ze zbytků buněčných membrán a odpadního materiálu, která se běžně vyskytuje po centrifugaci v CsCl gradientu na rozhraní mezi gradientem a převrstvovacím minerálním olejem. Ta byla ovšem v případě částic s myším melanomovým epitopem daleko větší a navíc se vznášela ne na rozhraní, ale uvnitř gradientu. Zde se ukázalo, že částice jsou zachyceny ve sraženině.

Frakce	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	NK1	NK2
Ref. index	1,3740	1,3735	1,3710	1,3680	1,3670	1,3660	1,3650	1,3640	1,3635	1,3630	1,3630	1,1620	1,3610	1,3600	1,3590	1,3575	1,3550		



Frakce	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	PK
Ref. index	1,3590	1,3760	1,3730	1,3700	1,3680	1,3665	1,3650	1,3645	1,3640	1,3635	1,3620	1,1615	1,3610	1,3600	1,3595	1,3580	1,3560		



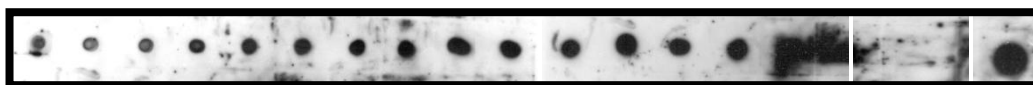
Tabulka 5.3.: Naměřené refraktometrické indexy u jednotlivých frakcí dvou rovnovážných gradientů připravených ze vzorku částic s ovalbuminovým epitopem (vždy nahoře) a imunologická detekce proteinu VP1 v jednotlivých frakcích (vždy dole). Dílčí frakce byly podle získaných výsledků sjednoceny do frakcí výsledných – frakce plných částic (oranžová), frakce prázdných částic (červená) a frakce zbytková (žlutá). NK jsou negativní kontroly (lyzát neinfikovaných Sf9 a Sf9 infikovaných wt bakulovirem), u kterých nebyl detekován protein VP1 a PK je pozitivní kontrola (purifikované částice odvozené od wt VP1 myšího polyomaviru; poskytnuty Bc. Jiřinou Suchanovou), kde byl protein VP1 přítomen.

Frakce	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	NK1	NK2	PK
Ref. index	1,3730	1,3725	1,3690	1,3670	1,3655	1,3645	1,3640	1,3630	1,3625	1,3620	1,3615	1,1600	1,3590	1,3570					

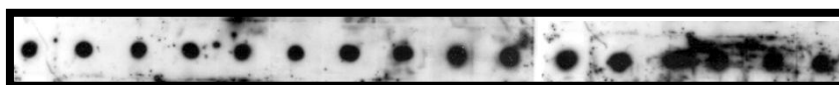


Tabulka 5.2.: Naměřené refraktometrické indexy u jednotlivých frakcí rovnovážného gradientu připraveného ze vzorku částic s lidským melanomovým epitopem (nahore) a imunologická detekce proteinu VP1 v jednotlivých frakcích (dole). Dílčí frakce byly podle získaných výsledků sjednoceny do frakcí výsledných – frakce plných částic (středně modrá), frakce prázdných částic (tmavě) a frakce zbytková (světle modrá). NK jsou negativní kontroly (lyzát neinfikovaných Sf9 a Sf9 infikovaných wt bakulovirem), u kterých nebyl detekován protein VP1 a PK je pozitivní kontrola (purifikované částice odvozené od wt VP1 myšího polyomaviru; poskytnuty Bc. Jiřinou Suchanovou), kde byl protein VP1 samozřejmě přítomen.

Frakce	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	NK1	NK2	PK
Ref. index	1,3745	1,3720	1,3700	1,3675	1,3660	1,3650	1,3640	1,3635	1,3630	1,3625	1,3615	1,1605	1,3595	1,3580	-	1,3550			



Frakce	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Ref. index	1,3735	1,3720	1,3685	1,3670	1,3660	1,3650	1,3640	1,3630	1,3620	1,3615	1,3605	1,1590	-	-	1,3560	1,3550



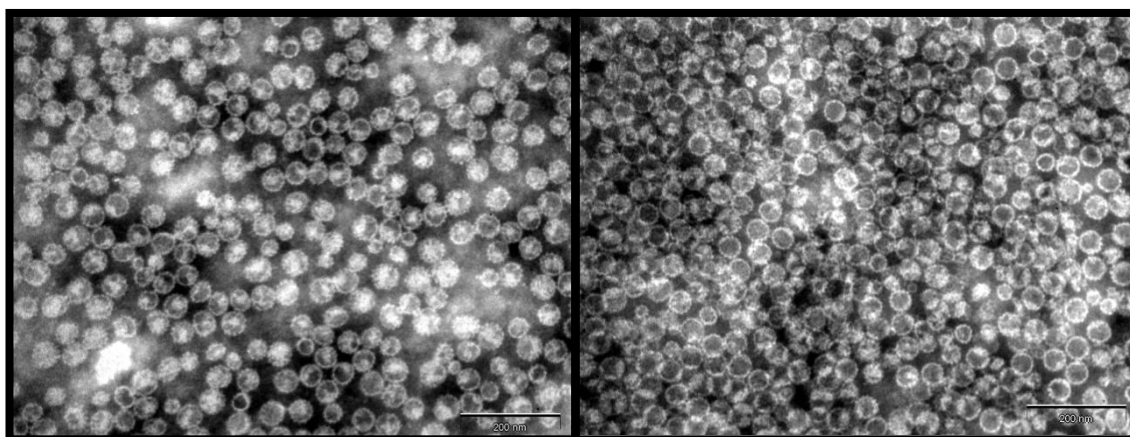
Tabulka 5.3.: Naměřené refraktometrické indexy u jednotlivých frakcí dvou rovnovážných gradientů připravených ze vzorku částic s myším melanomovým epitopem (vždy nahoře) a imunologická detekce proteinu VP1 v jednotlivých frakcích (vždy dole). Dílčí frakce byly podle získaných výsledků sjednoceny do frakcí výsledných – frakce plných částic (středně fialová), frakce prázdných částic (tmavě fialová), frakce zbytková (světle fialová) a frakce „sraženina“ (šedá). NK jsou negativní kontroly (lyzát neinfikovaných Sf9 a Sf9 infikovaných wt bakulovirem), u kterých nebyl detekován protein VP1 a PK je pozitivní kontrola (purifikované částice odvozené od wt VP1 myšího polyomaviru; poskytnuty Bc. Jiřinou Suchanovou), kde byl protein VP1 podle předpokladů přítomen.

Výsledné spojené frakce byly dialyzovány přes noc proti pufru B (viz kapitola 4.2.3.1.8.). Zatímco v případě vzorků částic s ovalbuminovým a lidským melanomovým epitopem byly jednotlivé frakce po dialýze zahuštěny centrifugací přes 10% sacharózový polštář (viz kapitola 4.2.3.1.6.) a sedimenty důkladně resuspendovány v malém množství pufru B (~100 – 200 μ l), u vzorků částic s myším melanomovým epitopem nebyla ve čtvrtém pokuse o vyizolování pseudokapsid po dialýze použita centrifugace, ale zahuštění pomocí PEG 20000 (viz kapitola 4.2.3.1.9.). Ze všech zahuštěných frakcí byly po změření koncentrace proteinu metodou Bradfordové (viz tabulka 5.4., viz kapitola 4.2.5.8.) zhotoveny preparáty pro elektronovou mikroskopii (viz kapitola 4.2.5.9.). Z obrázků 5.8., 5.9. a 5.10. je patrné, že izolace proběhly úspěšně a podařilo se získat částice v poměrně vysokém množství. Výsledné frakce obsahovaly intaktní částice pravidelného tvaru a odpovídající velikosti. Ve frakcích „prázdných“ částic se skutečně vyskytovaly především prázdné pseudokapsidy, ve

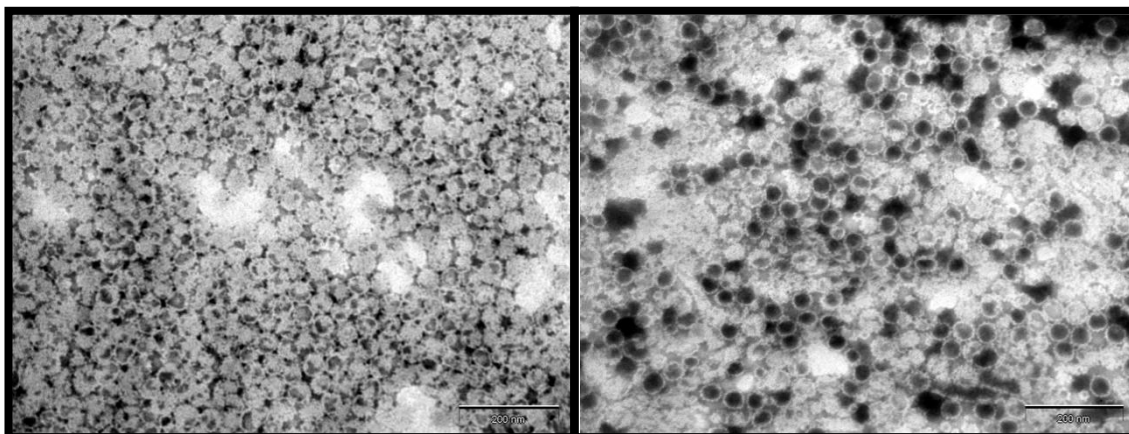
frakci „plných“ převažovaly částice obsahující enkapsidovanou DNA. Částice s myším melanomovým epitopem se nacházely ve frakci „sraženina“, v ostatních frakcích se stejně jako při předešlých 3 pokusech o izolaci nacházel pouze rozpadlý materiál a ojediněle intaktní kapsidové struktury.

	Koncentrace proteinů v mg/ml ve frakci 1 („plné“ částice)	Koncentrace proteinů v mg/ml ve frakci 2 („prázdné“ částice)	Koncentrace proteinů v mg/ml ve frakci 3 („zbytková“)	Koncentrace proteinů v mg/ml ve frakci 4 („sraženina“)
VP1-OVA	4,3	19,1	3,25	-
VP1-MelanL	5,07	17,99	3,77	-
VP1-MelanM (4. izolace)	0,069	0,16	0,28	0,7

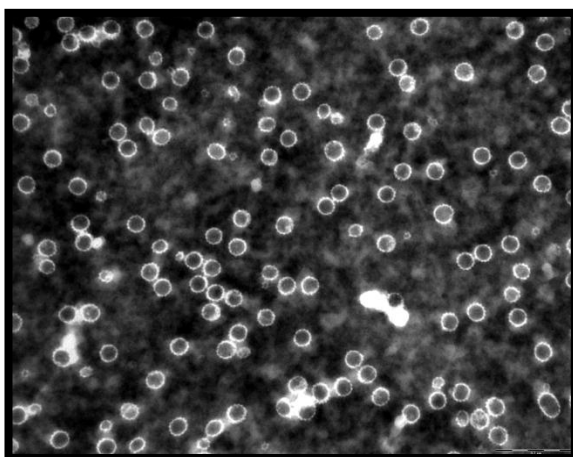
Tabulka 5.4.: Koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích vypočítané na základě regresních rovnic kalibračních křivek standardní ředící řady BSA v pufru B (viz kapitola 4.2.5.8.). VP1-OVA označují pseudokapsidy s ovalbuminovým epitopem, VP1-MelanL částice s lidským melanomovým epitopem a VP1-MelanM částice s epitopem odvozeným od myšního melanomového proteinu Melan-A/MART-1.



Obr. 5.8. Elektronmikroskopické snímky frakce „plných“ (vlevo) a „prázdných“ (vpravo) umělých virových částic s ovalbuminovým epitopem. Měřítko 200 nm.



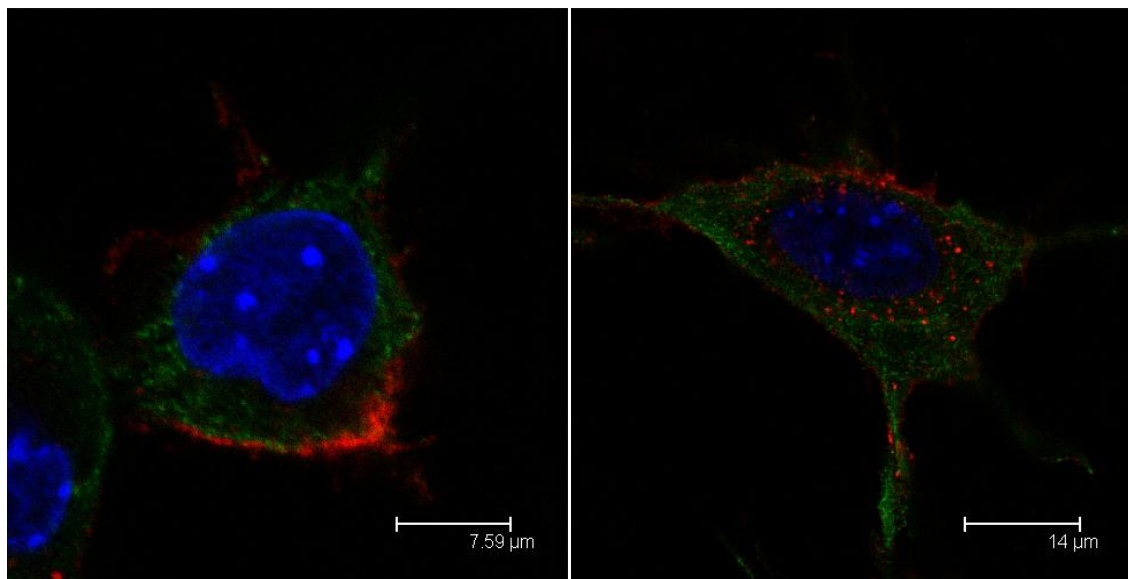
Obr. 5.8. Elektronmikroskopické snímky frakce „plných“ (vlevo) a „prázdných“ (vpravo) umělých virových částic s lidským melanomovým epitopem. Měřítko 200 nm.



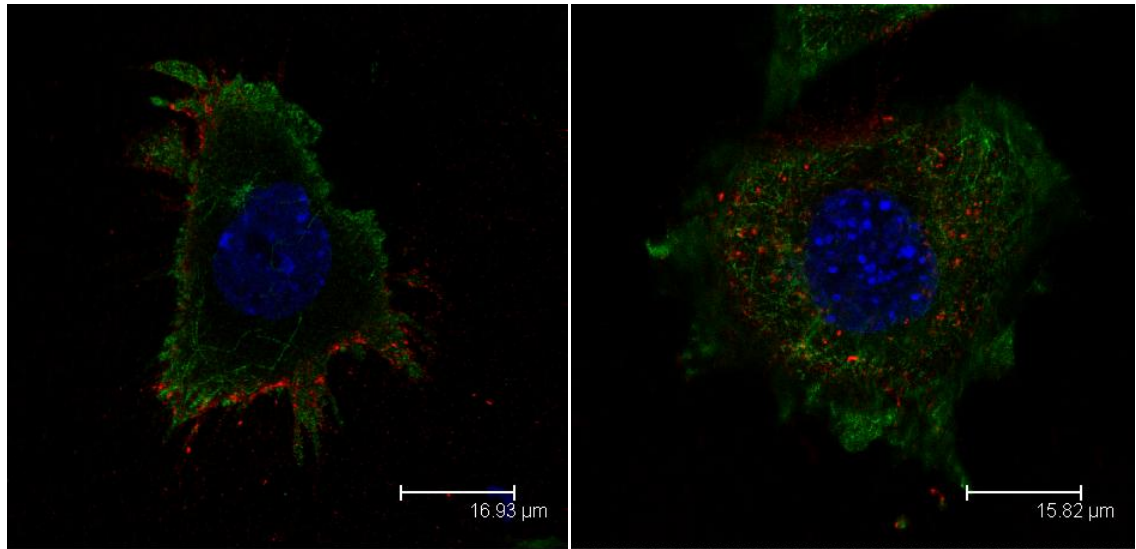
Obr. 5.10. Elektronmikroskopický snímek frakce „sraženina“ obsahující pseudokapsidy s myším melanomovým epitopem. Měřítko 200 nm.

Pro ověření, zda vložením epitopu do povrchové smyčky proteinu VP1 nedošlo k narušení schopnosti kapsid vázat se na buněčný receptor a účinně vstupovat do buňky, byla zvolena metoda nepřímé imunofluorescence (viz kapitola 4.2.5.7.). K infekci myších fibroblastů 3T6 kultivovaných na mikroskopických sklíčkách byla u částic s ovalbuminovým i lidským melanomovým epitopem použita frakce prázdných částic, u pseudokapsid s myším melanomovým epitopem pak frakce označená jako „sraženina“. Buňky byly pseudoinfikovány 200 μ l inokula s částicemi o koncentraci 0,6 μ g/ μ l (viz kapitola 4.2.3.2.2.). Po hodinové adsorpci částic při 0°C následovala infekce po dobu 1 hodiny v termostatu při 37°C a 5% CO₂. K detekci částic byla použita králičí primární

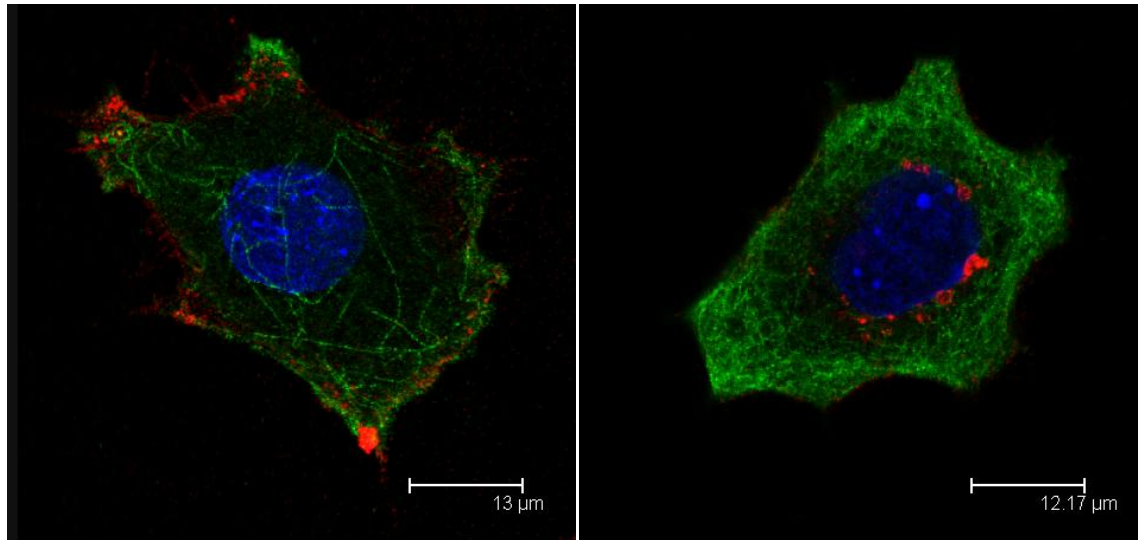
protilátka proti VP1 myšího polyomaviru, pro vizualizaci buněk myši primární protilátka proti tubulinu (viz kapitola 4.1.9.1.) a pro označení jádra posloužilo DAPI. Sekundární protilátky (kozy proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s Alexa Fluor 546 a oslí proti myším imunoglobulinům konjugovaná s Alexa Fluor 488; viz kapitola 4.1.9.2.) konjugované s fluoroforem umožnily konečnou vizualizaci pomocí konfokálního mikroskopu (viz obr. 5.11., 5.12., 5.13. a 5.14.)



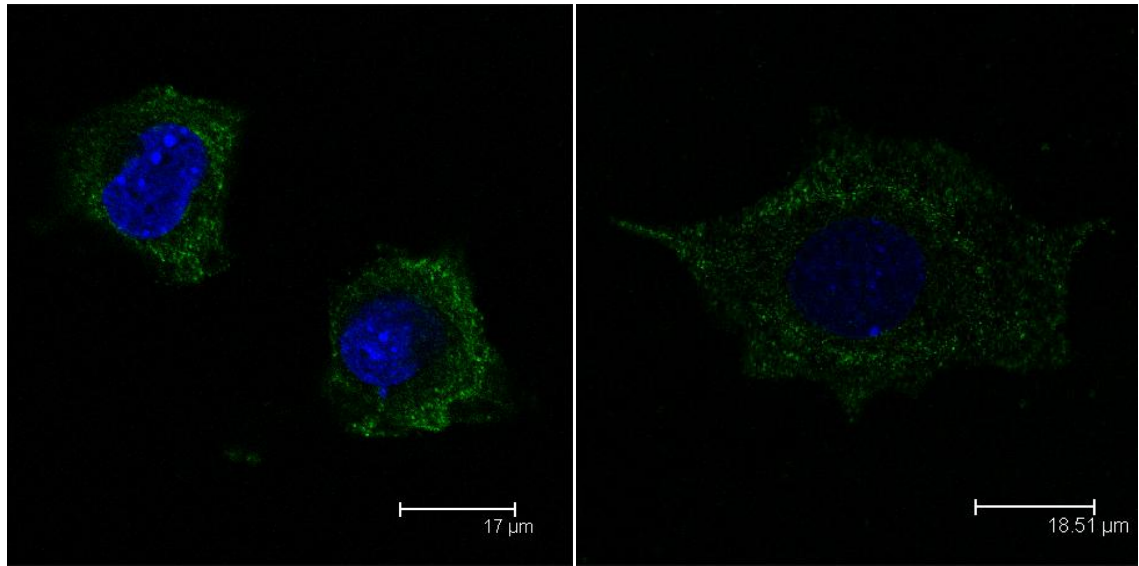
Obr. 5.11.: Mikroskopické snímky dokazující úspěšný vstup částic VP1-OVA do buněk zhotovené s použitím konfokálního mikroskopu. Nalevo řez buňkou zafixované a obarvené po hodinové inkubaci na ledu, kde jsou vidět částice naadsorbované na povrchu buňky. Vpravo buňka zafixovaná a obarvená po hodinové infekci v termostatu při 37°C a 5% CO₂ atmosféře s VLPs lokalizovanými uvnitř buňky. Zeleně zobrazen tubulin, červeně částice a modře jádro. Použité protilátky: králičí primární protilátka proti VP1 myšího polyomaviru a kozí sekundární protilátka proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s Alexa Fluor 546, myší primární protilátka proti tubulinu a oslí sekundární protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s Alexa Fluor 488. Pro vizualizaci jádra použito DAPI. Měřítka zobrazena v pravém dolním rohu obrázků.



Obr. 5.12.: Snímky z konfokálního mikroskopu zobrazující částice VPI-MelanL účinně vstupující do buněk. Nalevo částice adsorbované na povrchu buňky, která byla zafixována a obarvena po hodinové inkubaci na ledu. Vpravo pseudokapsidy uvnitř buňky zafixované a obarvené po hodinové infekci v termostatu při 37°C a 5% CO₂ atmosféře. Zeleně zobrazen tubulin, červeně VLPs a modře jádro. Použité protilátky: králičí primární protilátka proti VP1 myšího polyomaviru a kozí sekundární protilátka proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s Alexa Fluor 546, myší primární protilátka proti tubulinu a oslí sekundární protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s Alexa Fluor 488. Pro vizualizaci jádra použito DAPI. Měřítka zobrazena v pravém dolním rohu obrázků.



Obr. 5.13.: Řezy buňkami zhotovené konfokálním mikroskopem dokazující vstup částic VP1-MelanM do buněk. Buňka vlevo s pseudočásticemi adsorbovanými na povrchu byla zafixována a obarvena po hodinové inkubaci na ledu. Buňka s částicemi uvnitř na obrázku vpravo byla zafixovaná a obarvená po hodinové infekci v termostatu při 37°C a 5% CO₂ atmosféře. Zeleně zobrazen tubulin, červeně VLPs a modře jádro. Použité protilátky: králičí primární protilátka proti VP1 myšího polyomaviru a kozí sekundární protilátka proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s Alexa Fluor 546, myší primární protilátka proti tubulinu a oslí sekundární protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s Alexa Fluor 488. Pro vizualizaci jádra použito DAPI. Měřítka zobrazena v pravém dolním rohu obrázků.



Obr. 5.14.: Negativní kontroly vylučující nespecifickou vazbu protilátek a falešnou pozitivitu vzorků. Buňky byly místo inokula infikovány PBS, další postup už se v ničem nelišil od ostatních vzorků. Nalevo buňka zafixovaná a obarvená po hodinové inkubaci na ledu. Vpravo buňka zafixovaná a obarvená po hodinové infekci v termostatu při 37°C a 5% CO₂ atmosféře. Zeleně zobrazen tubulin, červeně částice a modře jádro. Použité protilátky: králičí primární protilátka proti VP1 myšího polyomaviru a kozí sekundární protilátka proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s Alexa Fluor 546, myší primární protilátka proti tubulinu a oslí sekundární protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s Alexa Fluor 488. Pro vizualizaci jádra použito DAPI. Měřítka zobrazena v pravém dolním rohu obrázků.

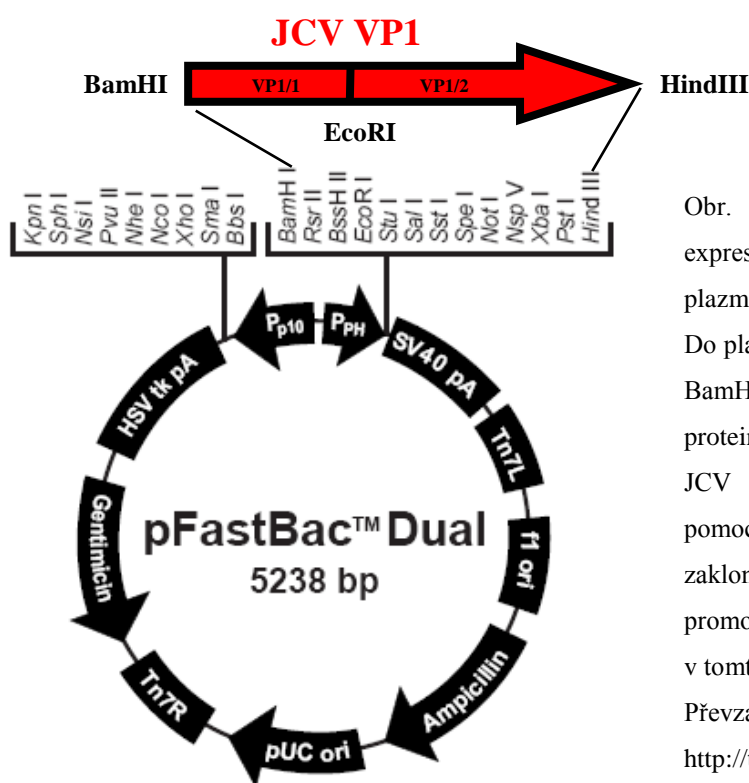
5.2. KONSTRUKCE UMĚLÝCH VIROVÝCH KAPSID LIDSKÉHO POLYOMAVIRU JC

Vedlejším cílem této práce byla konstrukce umělých virových částic odvozených od hlavního strukturního proteinu jednoho z lidských polyomavirů viru JC. Tyto pseudokapsidy by mohly sloužit nejen k hledání odpovědí na řadu ne zcela zodpovězených otázek týkajících se životního cyklu viru a jeho osudu v buňce, ale například i k účelům imunizačním a screeningovým (ve spolupráci s ÚHK). Zkušenosti získané při přípravě předcházejících konstruktů byly využity i při konstrukci těchto částic, protože k produkci proteinu VP1 viru JC byl opět využit osvědčený bakulovirový expresní systém Bac-to-Bac (Invitrogen, viz kapitola 4.2.5.10.).

5.2.1. Příprava donorového plazmidu

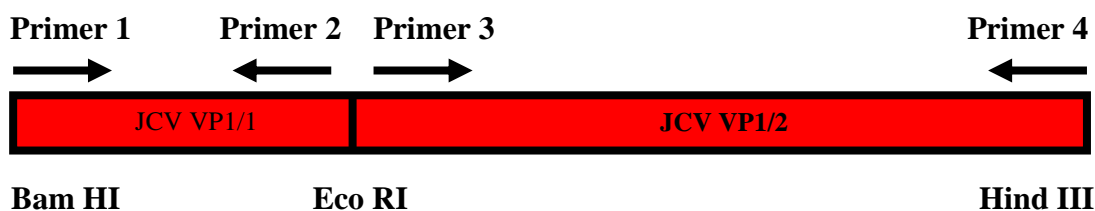
V tomto případě nebylo nutné transferový plazmid nijak upravovat a zasahovat do jeho sekvence. Ke konstrukci byl tentokrát využit donorový plazmid pFastBac Dual (viz obr. 5.15.; viz kapitola 4.1.3.), který obsahuje dokonce dva silné bakulovirové promotory (polyhedrinový a p10), takže umožňuje koexpresi dvou proteinů. Za promotory umístěnými na plazmidu v opačné orientaci leží polylinkery s různými restrikčními místy pro vložení genové sekvence našeho zájmu. I izolaci dostatečného množství plazmidu z kompetentních bakterií *E. coli* XL1-Blue (viz kapitola 4.2.2.) byla využita metoda maxipreparace plazmidové DNA (kapitola 4.2.4.2.). Dále bylo třeba pomocí PCR amplifikace (viz kapitola 4.2.4.10.) připravit inzert v podobě genu VP1 viru JC. Jako templát nám posloužil genom viru JC nesený plazmidem pBRJCV-MAD-1 (viz kapitola 4.1.3.). Bohužel genom byl před vložení do plazmidu linearizován enzymem EcoRI, jehož cílové místo se nachází právě v genu pro VP1, a proto bylo nevyhnutelné namnožit obě části genu zvlášť a poté je vzájemně spojit pomocí zmíněné restriktazy. Primery pro PCR reakci byly zvoleny tak, aby mohl být gen spojen přes kohezní konce vytvořené EcoRI a vložen za polyhedrinový promotor pomocí enzymů BamHI a HindIII (viz obr. 5.16, viz kapitola 4.1.6.). První část genu VP1, jejíž velikost dosahuje přibližně 250 bp, byla označena jako JCV VP1/1. Velikost část druhé, JCV VP1/2, byla asi 800 bp. Pro amplifikace byl použit polymerázový mix High Fidelity

(Fermentas). Reakční směs byla namíchána podle pokynů výrobce. Díky možnosti nastavení teplotního gradientu bylo pro nasedání primerů vyzkoušeno rozmezí teplot 46 – 62°C. Při nastavování ostatních podmínek pro reakci byly opět dodrženy doporučení výrobce. Byla zvolena 3 minutová doba syntetické fáze, což by stačilo i na syntézu mnohem delších úseků (až v řádu několika kbp). Pomocí agarózové elektroforézy provedené po polymerázové reakci bylo ověřeno, že v žádném z případů nedošlo ke vzniku nespecifických produktů.



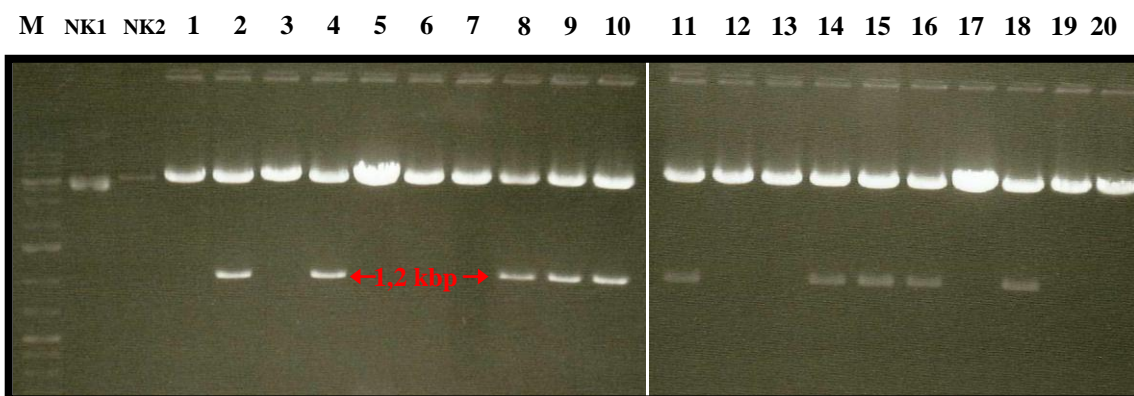
Obr. 5.15.: Schématické znázornění expresní kazety v donorovém plazmidu pFastBac Dual (Invitrogen). Do plazmidu byly přes restrikční místa BamHI a HindIII vloženy obě části proteinu VP1 viru JC (JCV VP1/1 a JCV VP1/2), vzájemně spojené pomocí EcoRI. Celý konstrukt byl zaklonován pod jeden ze silných promotorů nesených plazmidem, v tomto případě polyhedrinový (P_{PH}). Převzato a upraveno z http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pfastbacdual_map.pdf

JCV VP1:



5.16.: Schématické znázornění amplifikace genu pro hlavní strukturní protein VP1 viru JC.

Před vložením obou částí inzertu byl plazmid pFastBac Dual nejdříve naštěpen dvěma zvolenými restriktázami (BamHI a HindIII) a defosforylován (viz kapitoly 4.2.4.8. a 4.2.4.9.). K restrikci fragmentu VP1/1 byly použity endonukleázy BamHI a EcoRI, sekvence VP1/2 byla opracována enzymy EcoRI a HindIII. Všechny tři lineární úseky DNA byly následně použity k přípravě ligační směsi (viz kapitola 4.2.4.12.). Molární poměr vektoru k inzertům byl 1:3. Ligační směs byla po 16-hodinové inkubaci při laboratorní teplotě elektroporována (viz kapitola 4.2.2.3.) do kompetentních buněk *E. coli* XL1-Blue (viz kapitola 4.1.5.). Bakterie byly po elektroporaci vysety na pevné médium s ampicilinem a pěstovány v termostatu při 37°C přes noc. Dvacet monoklonií bylo namnoženo a použito minipreparaci rekombinantní plazmidové DNA (viz kapitola 4.2.4.3.). Úspěch vložení kompletního genu pro VP1 lidského polyomaviru JC byl ověřen restriktčně a agarózovou elektroforézou (viz obr. 5.17.). V deseti případech z dvaceti došlo k vyštěpení úseku odpovídající velikosti (~1,2 kbp). Z těchto deseti byly vybrány tři, které byly znovu namnoženy a pomocí kitu QIAprep Spin Miniprep Kit (viz kapitola 4.2.4.4.) z nich byl vyizolován plazmid, který byl poslán k další analýze do sekvenační laboratoře.



Obr. 5.17.: Restriktční ověření úspěchu vložení obou částí genu pro protein VP1 viru JC do plazmidu FastBac Dual. 1% agarózový gel, M označuje marker molekulových vah (4 μ l), 1 – 20 jsou plazmidy po štěpení restriktázami BamHI a Hind III (20 μ l). V drahách 2, 4, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 16 a 18 došlo k vyštěpení úseku odpovídající velikosti (~ 1,2 kbp). NK1 označuje neštěpený pFastBac Dual, NK2 pak pFastBac Dual štěpený restriktázami BamHI a Hind III (obě kontroly po 1 μ l). K další analýze byly použity kolonie 8, 9 a 10.

5.2.2. Příprava rekombinantního bakmidu

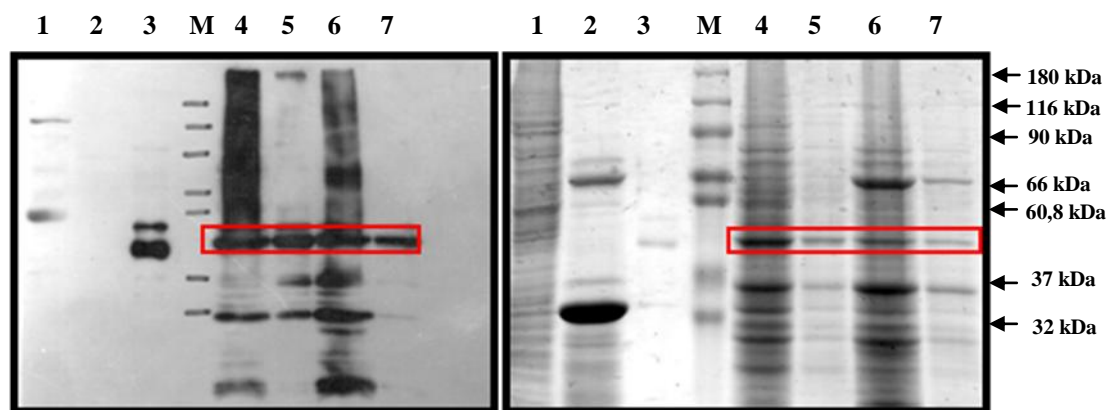
Na základě výsledků sekvenační analýzy byl pro transformaci kompetentních bakterií *E. coli* DH10Bac vybrán plazmid vyizolovaný z kolonie č. 9 (viz kapitola 4.1.5.). Transformované buňky byly následně pěstovány 48 hodin při 37°C na plotnách s pevným médiem s přidavkem antibiotik kanamycinu, tetracyklinu a gentamicinu, induktoru IPTG a chromogenního substrátu X-gal. Kolonie, v nichž proběhla místně specifická homologní rekombinace s úspěchem, byly zbarveny bíle. Z namnožených pozitivní monoklonií byl vyizolován rekombinantní bakmid (viz kapitola 4.2.4.13.). Po ověření intaktnosti bakmidu pomocí agarózové elektroforézy, přišla na řadu PCR reakce, ve které bakmid sloužil coby templát. Složení reakční směsi i nastavení podmínek byly shodné jako v kapitole 5.1.2. Správná velikost produktů PCR byla před odesláním sekvenační laboratoři prověřena agarózovou elektroforézou.

5.2.3. Příprava rekombinantního bakuloviru

S přihlédnutím k časové neúnosnosti současné izolace tří typů částic odvozených od myšího polyomaviru a přípravy konstruktů JCV, byl ověřený rekombinantní bakmid předán Mgr. Veronice Hruškové, Ph.D., která z něj před svým odchodem na mateřskou dovolenou standardním způsobem připravila rekombinantní bakulovirus (viz kapitoly 4.2.3.1.2., 4.2.3.1.3. a 4.3.3.1.4.). V této fázi byl projekt vrácen zpět do mých rukou. Pomocí denaturační elektroforézy v polyakrylamidovém gelu byla ověřena přítomnost rekombinantních proteinů v buněčných lyzátech (viz obr., viz kapitola 4.2.5.2.). Jeden ze dvou paralelně připravených gelů byl fixován a obarven pomocí roztoku Coomassie Brilliant Blue G250 (viz kapitola 4.2.5.3., obr. vpravo), druhý byl použit na western blot a imunologickou detekci protilátkami (viz kapitoly 4.2.5.4. a 4.2.5.6.). Vzhledem k tomu, že protilátka proti VP1 JCV nebyla dostupná, byla jako primární použita králičí polyklonální protilátka proti VP1 primátího polyomaviru SV40, která s křížově reaguje s hlavními kapsidovými strukturami i dalších polyomavirů (JCV, BKV). Jako sekundární posloužila kozí protilátka proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou. Nejlepší produkce proteinu VP1 JCV byla zjištěna u vzorků č. 3 a 5. a tato bakulovirová inokula byla použita v dalších pokusech.

5.2.4 Izolace a analýza umělých virových částic odvozených od lidského polyomaviru JC

K izolaci částic (viz kapitola 4.2.3.1.5.) bylo použito šest misek hmyzích buněk Sf9 (průměr 10 cm). K nainfikování poloviny misek bylo použito inokulum JCV VP1 č. 3 a druhá polovina byla infikována inokulem č. 5. Infekce probíhala po dobu 5 dnů (viz kapitola 4.2.3.1.3.). V lyzátu buněk byla pro jistotu pomocí SDS-PAAGE, western blotu a imunodetekce ještě jednou ověřena přítomnost VP1 (viz obr. 5.18.). Samotná izolace už probíhala stejně jako v případě částic odvozených od myšího polyomaviru. Nejdříve byly odstraněny pozůstatky buněk nízkobrátkovou centrifugací, částice byly přečištěny centrifugací přes 10% sacharózový polštář (viz kapitola 4.2.3.1.6.) a nakonec rozděleny pomocí izopyknické centrifugace v CsCl gradientu (viz kapitola 4.2.3.1.7.).



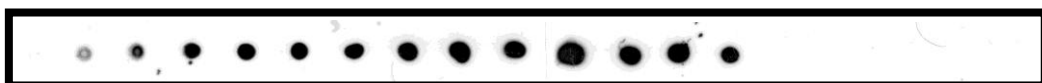
VP1 lidského polyomaviru JC

Obr. 5.18.: Dodatečné ověření přítomnosti rekombinantního proteinu VP1 viru JC v lyzátu hmyzích buněk před izolací umělých virových částic. M označuje marker molekulových hmotností Prestained Molecular Weight Marker (Sigma-Aldrich, viz kapitola 4.2.5.2., viz obr. 4.2.), lyzát neinfikovaných buněk Sf9, lyzát buněk Sf9 infikovaných divokým bakulovirem, pozitivní kontrola (protein VP1 lidského bakuloviru BK), 5)-8) lyzáty buněk Sf9 infikovaných rekombinantními bakuloviry produkujícími VP1 JCV. Červený rámeček označuje 45 kDa protein VP1. Vlevo membrány vyvolané pomocí primární králičí protilátky proti VP1 SV40 a sekundární kozí protilátky proti králičím imunoglobulinům konjugované s křenovou peroxidázou. Vpravo polyakrylamidové gely obarvené CBB-G250.

Refraktometrický index jednotlivých frakcí získaných rozkládačem gradientu byl změřen pomocí refraktometru. Frakce byly rovněž nakapány na nitrocelulózovou membránu (viz kapitola 4.2.5.5.) a podrobeny imunodetekci protilátkami (viz kapitola

4.2.5.6.). K ověření přítomnosti hlavního strukturního proteinu JC viru VP1 byly opět použity křížově reagující protilátka proti VP1 viru SV40 (viz kapitola 4.1.9.1.). a koží sekundární protilátka proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou (viz kapitola 4.1.9.1.). Výsledky jsou shrnuty v tabulce 5.5. Vznášivá hustota prázdných částic by se měla pohybovat okolo 1,29 g/ml, což odpovídá rozmezí refraktometrických indexů 1,3635 – 1,362. Plné částice obsahující enkapsidovanou nespecifickou DNA mají vyšší vznášivou hustotu (1,33 g/ml) a refraktometrický index se tak pohybuje mezi 1,3645 a 1,3655. Opět byly vytvořeny 3 výsledné frakce – frakce „plných“ částic, frakce „prázdných“ částic a zbytková frakce (viz tabulka 5.5.).

Frakce	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	NK1	NK2
Ref. index	1,3750	1,3740	1,3700	1,3680	1,3665	1,3655	1,3650	1,3645	1,3640	1,3635	1,1630	1,3620	1,3610	1,3585					



Frakce	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17		PK
Ref. index	1,3575	1,3740	1,3710	1,3690	1,3670	1,3660	1,3650	1,3645	1,3640	1,3635	1,3620	1,1615	1,3600	1,3580					



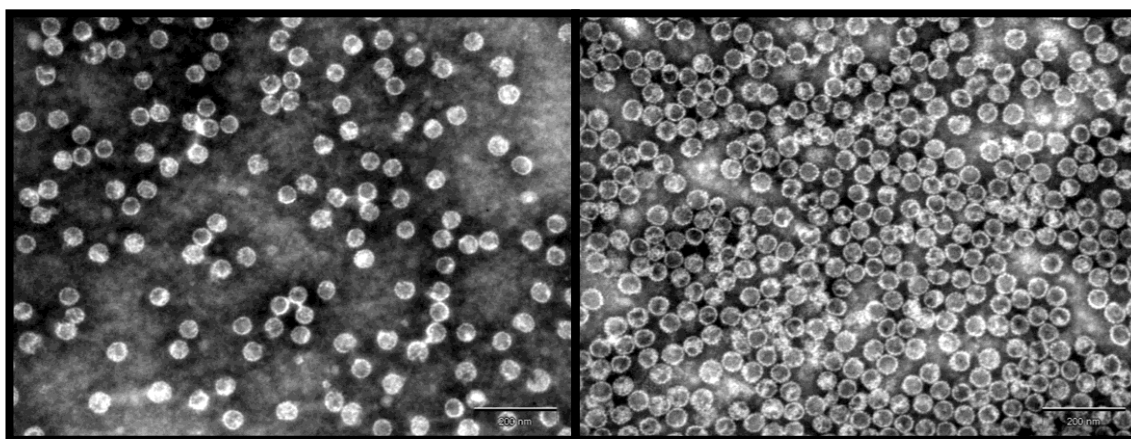
Tabulka 5.5.: Naměřené refraktometrické indexy u jednotlivých frakcí dvou rovnovážných gradientů připravených ze vzorku částic odvozených od JCV (vždy nahoře) a imunologická detekce proteinu JCV VP1 v jednotlivých frakcích (vždy dole). Frakce byly sloučeny do 3 výsledných frakcí – frakce plných částic (oranžová), frakce prázdných částic (červená) a frakce zbytková (žlutá). NK jsou negativní kontroly (lyzát neinfikovaných Sf9 a Sf9 infikovaných wt bakulovirem) a PK je pozitivní kontrola (purifikované částice odvozených wt VP1 viru BK; poskytnuty Bc. Alexandrou Kozmanovou). K detekci použita primární polyklonální protilátka proti VP1 viru SV40, která křížově reaguje i s VP1 virů JC a BK, a sekundární koží protilátka proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou.

Všechny tři výsledné frakce byly přes noc dialyzovány proti pufru B (viz kapitola 4.2.3.1.8.). a poté zakoncentrovány centrifugací přes 10% sacharózový polštář

(viz kapitola 4.2.3.1.6.). Sediment byl rozpuštěn v malém množství pufru B (~100 – 200 μ l), Následně byla u jednotlivých frakcí metodou Bradfordové (viz tabulka 5.6., viz kapitola 4.2.5.8.) změřena koncentrace proteinů. Všechny frakce byly také použity k přípravě elektronmikroskopických preparátů (viz kapitola 4.2.5.9.). Snímky na obr 5. svědčí o úspěchu izolace stabilních částic pravidelného tvaru a velikosti.

	Koncentrace proteinů v mg/ml ve frakci 1 („plné“ částice)	Koncentrace proteinů v mg/ml ve frakci 2 („prázdné“ částice)	Koncentrace proteinů v mg/ml ve frakci 3 („zbytková“)
JCV VP1	0,65	6,76	0,59

Tabulka 5.6.: Koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích vypočítané na základě regresních rovnic kalibračních křivek standardní ředící řady BSA v pufru B (viz kapitola 4.2.5.8.). JCV VP1 označují VLP odvozené od hlavního kapsidového proteinu VP1 viru JC.



Obr. 5.8. Elektronmikroskopické snímky frakce „plných“ (vlevo) a „prázdných“ (vpravo) umělých virových částic viru JC. Měřítka 200 nm.

6. DISKUZE

6.1. PŘÍPRAVA CHIMERICKÝCH VIROVÝCH ČÁSTIC ODVOZENÝCH OD MYŠÍHO POLYOMAVIRU NESOUCÍCH NA POVRCHU CIZORODÝ EPITOP

Schopnost hlavního strukturního proteinu myšího polyomaviru samovolně tvořit pentamery a z nich následně i kapsidové struktury (SALUNKE *et al.*, 1986) bez pomoci jiných virových proteinů či struktur lze s výhodou využít v různých oblastech genové terapie či imunoterapie. Polyomavirové částice prokázaly velký potenciál při vakcinaci proti virům, od nichž jsou odvozeny, a to nejen u jedinců s nepoškozeným imunitním obranným systémem, ale za určitých vhodných podmínek i u jedinců T-buněčně deficientních (HEIDARI *et al.*, 2002; VLASTOS *et al.*, 2003). Nadto je možné připravit chimerické VLPs, nesoucí fúzní protein, vznikající sloučením jednoho z virových kapsidových proteinů (VP1, VP2, VP3) s vybraným antigenem či antigenním epitopem. S pomocí těchto umělých virových částic lze následně provést imunizaci a dosáhnout navození odpovědi specifických T- nebo B-buněk, což rozšiřuje potenciální užití VLPs mnoha směry, například i do oblastí protinádorové terapie. Oba přístupy konstrukce chimerických částic mají jistě svá pro a proti. Jednou z výhod fúze antigenu s některým minoritních kapsidových proteinů či s jejich společnou N-koncovou částí je možnost vnést do částice dlouhý peptid či dokonce celý protein. Problémem ovšem může být nízký počet takovýchto fúzních proteinů na jednu částici, který většinou ani zdaleka nedosahuje teoretických 72. Naopak při vložení cizorodého epitopu do některé z povrchových smyček hlavního kapsidového proteinu VP1 je, v případě, že není narušena schopnost VP1 uspořádat se do stabilní částice, docíleno 360 opakování daného motivu na povrchu VLP. V naší laboratoři byly již dříve připraveny chimerické částice nesoucí část fúzního proteinu Bcr-Abl asociovanou se zkráceným minoritním kapsidovým proteinem VP3 uvnitř polyomavirových VLP. Na každou částici připadalo průměrně 11,4 Bcr-Abl proteinů (HRUŠKOVÁ *et al.*, 2009). Aktivace imunity těmito částicemi nebyla ale na myším modelu úspěšná. Hlavním důvodem selhání těchto vakcín byla zřejmě nízká imunogenita zvoleného epitopu (HRUŠKOVÁ *et al.*, 2009), i když nelze vyloučit ani příspěvek imunitní dominance proteinu VP1 nad mnohem méně zastoupenými epitopy Bcr-Abl. Abychom se vyhnuli oběma těmito problémům, zvolili jsme pro konstrukci dalších vakcín epitopy jiného nádoru, melanomu, které byly již dříve v literatuře popsány jako silně imunogenní. Zároveň jsme se rozhodli tyto epitopy vložit nikoli dovnitř VLPs, ale na jejich povrch. Tím je zaručeno mnohonásobné

opakování daného epitopu a jeho jednoznačné vystavení všem složkám imunitního systému.

Pro imunoterapie je výhodou použití částic odvozených od jiných než lidských polyomavirů (např. stejně jako v našem případě od myšího polyomaviru) coby terapeutických prostředků předchází možnému riziku snížení jejich účinnosti působením preexistujících protilátek proti kapsidovým proteinům.

K produkci rekombinantních proteinů, včetně polyomavirových, mohou být použity různé expresní systémy (bakteriální, kvasinkové, bakulovirové). Jednotlivé systémy se liší v mnoha ohledech, ať už se jedná o kvalitu či kvantitu výsledného produktu, možnost koexprese více proteinů najednou, časovou a manuální náročnost přípravy, náklady a další (viz kapitola 2.3.1.). Volba vhodného produkčního systému tedy hraje velmi důležitou roli už na samém začátku projektu, ve fázi návrhu. Jak již bylo řečeno, je třeba zvážit mnoho hledisek ovlivňujících vývoj a výsledek celé práce, která může trvat i několik měsíců a každá chybná úvaha může mít fatální následky. Jednotlivé kroky musí být proto velmi kriticky zváženy a promyšleny. Přesto však asi není možné předejít všem případným komplikacím a i přes důkladnou přípravu může dojít k různým nepředvídaným situacím, jak se potvrdilo i v průběhu práce na tomto diplomovém projektu.

K dosažení hlavního cíle této diplomové práce, tedy k přípravě chimerických částic složených z modifikovaného strukturního proteinu VP1 myšího polyomaviru, byl použit, v naší laboratoři velmi osvědčený, bakulovirový expresní systém Bac-to-Bac firmy Invitrogen (viz kapitola 4.2.5.10.). Ten představuje relativně snadnou cestu k získání rekombinantního bakuloviru produkujícího značné množství proteinu našeho zájmu. Vzhledem k tomu, že k produkci dochází v hmyzích buňkách, posttranslační modifikace získaných proteinů jsou eukaryotického typu a jejich přítomnost může být u některých proteinů zcela esenciální pro zaujetí nativní konformace či správné plnění funkce. Protein VP1 prochází celou řadou posttranslačních úprav ovlivňujících jeho vlastnosti (viz kapitola 2.2.2.). Tyto modifikace ovšem nejsou nezbytné pro spontánní tvorbu pentamer a z nich následně vznikajících kapsidových struktur, ale mohou mít vliv na imunogennost. Navíc je příprava proteinu systémem Bac-to-Bac časově mnohem úspornější v porovnání se staršími typy bakulovirových expresních systémů, protože odpadá nutnost purifikovat rekombinantní bakulovirus sérií plakových zkoušek. Jednou z dalších nesporných výhod použití tohoto systému při expresi hlavního strukturního proteinu různých polyomavirů je možnost izolovat z jader hmyzích buněk

infikovaných rekombinantním bakulovirem již uspořádané umělé virové částice, které zde vznikají samovolně. K této situaci ale samozřejmě dochází pouze v případě, že modifikací VP1 nebyla narušena jeho unikátní schopnost tvorby kapsidových struktur či stabilita vzniklých částic. Purifikované částice lze následně bez nutnosti dalších úprav použít k zamýšleným aplikacím.

Při použití systému Bac-to-Bac je prvním krokem na cestě k získání rekombinantního proteinu VP1 vložení jeho nukleotidové sekvence do donorového plazmidu. V tomto případě byl zvolen plazmid FastBac 1, který nese MCS pod kontrolou silného polyhedrinového promotoru. Před vložением genu za tento promotor byla provedena řada úprav. Nejprve bylo z polyklonovacího místa za promotorem odstraněno cílové místo rozpoznávané restriktázou BamHI. Sekvence tohoto místa kódující aminokyseliny glycin a serin byla poté použita pro vložení inzertu jako součást flexibilní spojky. Aby byl imunogenní epitop po inzerci do sekvence VP1 vystaven na povrch částice, je nutné využít k vložení jednu z povrchových smyček. V naší laboratoři byly už dříve připraveny částice, které obsahovaly 25 aminokyselin dlouhý úsek unikátního fúzního proteinu exprimovaného u pacientů s myeloidní leukémií Bcr-Abl vložený do HI smyčky VP1. Vznikající částice byly bohužel velmi nestabilní a navíc byla narušena jejich schopnost účinně vstupovat do buněk (ŠPANILOVÁ, LUDVÍKOVÁ, nepublikované výsledky). Vzhledem k tomu, že jsme chtěli předejít přílišnému prodloužení sekvence proteinu VP1 bylo nejdříve pomocí PCR deletováno 21 nukleotidů z oblasti DE smyčky. Ta byla zvolena právě z toho důvodu, že mutantní myší polyomavirus nesoucí tuto delecii sedmi aminokyselin v DE smyčce VP1 byl již dříve úspěšně připraven v Itálii (GARCIA *et al.*, 2000). Mutantní virus sice po transfekci myších fibroblastů nebyl schopen replikace ani iniciace časné transkripce, odstranění příslušné oblasti ovšem neměla zásadní vliv na tvorbu částic ani jejich stabilitu. Toho jsme tedy využili i my při konstrukci našich částic. Zároveň byl při zkrácení sekvence VP1 pomocí polymerázové řetězové reakce do místa delece vložen často používaný flexibilní glycin-serinový linker (např. LAWATSCHECK *et al.*, 2007) s BamHI štěpným místem mezi rameny (GSGS po obou stranách budoucího inzertu), umožňující molekule po vložení epitopu snadněji zaujmout nejvýhodnější konformaci. Gen pro VP1 s vloženou spojkou byl poté zaklonován pod polyhedrinový promotor do donorového vektoru FastBac 1. V této chvíli bylo možno přikročit k vložení 3 různých inzertů právě mezi obě ramena glycin-serinového linkeru. Z řady s melanomem asociovaných antigenů byl vybrán imunogenní protein Melan-A/MART-1, konkrétně

přirozený imunodominantní dekapeptid EAAGIGILTV od něj odvozený. Ten je rozpoznáván v kontextu HLA-A2 molekul specifickými cytotoxickými lymfocyty (ROMERO *et al.*, 1997). Myší varianta dekapeptidu se od lidské liší v aminokyselinovém zbytku na pozici 9, kde je polární threonin nahrazen hydrofobním izoleucinem (sekvence EAAGIGILIV). Rozhodli jsme se proto připravit částice dvou typů a zjistit zda se budou jejich vlastnosti na základě tohoto jediného rozdílu nějak lišit. Jako kontrola byly připraveny částice nesoucí proteolytickým zpracováním kuřecího ovalbuminu vznikající epitop – SIINFEKL. Ten je prezentován v kontextu molekul MHC I. třídy a aktivuje CTL (CRAIU *et al.*, 1997). Transpozice mezi donorovým plazmidem a bakmidem proběhla v případě všech 3 konstruktů bez jakéhokoli problému, stejně jako izolace rekombinantních bakmidů (viz kapitola 5.1.2.), transformace hmyzích buněk Sf9 a tvorba rekombinantních bakulovirů (viz kapitola 5.1.3.). Díky tomu, že je v naší laboratoři k dispozici ověřená polyklonální protilátka proti hlavnímu kapsidovému proteinu VP1 myšího polyomaviru, byla produkce rekombinantních proteinů v průběhu práce testována imunologickými metodami (viz kapitola 5.1.3. a 5.1.4.). Problém nastal až při samotné izolaci umělých virových částic. Zatímco u VLPs s lidským melanomovým a ovalbuminovým epitopem probíhala opět zcela hladce, u kapsid nesoucích myší melanomový epitop došlo k neočekávaným komplikacím. Při dodržování standardního postupu nebyly ani po několika opakováních vyzolovány téměř žádné částice (viz kapitola 5.1.4.). Už při rozpouštění CsCl při přípravě na izopyknickou centrifugaci vznikaly v roztoku netypické bílé vločky a sraženiny. Po ukončení ultracentrifugace se pak „sraženina“ nečistot, který se běžně usazuje na rozhraní gradientu a převrstvovacího minerálního oleje, vznášel v horní třetině gradientu. Podle našich úvah vedla záměna hydrofilního threoninu za nepolární izoleucin k tomu, že částice začaly interagovat s hydrofobními zbytky buněčných membrán a vytvořily tak nerozpustnou sraženinu. Vznik podobných proteinových konglomerátů asociovaných s buněčnými membránami pozorovali při přípravě jednoho ze svých konstruktů např. i GEDVILAITE *et al.* (2000). Množství získaného proteinu bylo v jejich případě 10x nižší než u VP1 divokého typu. Naše podezření se potvrdilo později, když se po zhotovení elektronmikroskopických snímků ukázalo, že frakce „plných“ částic, frakce „prázdných“ částic ani zbytková frakce opět, stejně jako v předchozích pokusech s těmito VLPs, neobsahují žádné částice. Většina částic byla totiž přítomna frakci 4., která obsahovala opatrně odebranou již zmíněnou „sraženinu“ nečistot, kde byla vázána pravděpodobně právě na základě hydrofobních sil.

Z jednotlivých frakcí byly i u zbylých dvou konstruktů zhotoveny preparáty pro elektronovou mikroskopii. Vznikající částice se svou morfologií, velikostí ani stabilitou nijak nelišily od částic divokého typu (viz kapitola 5.1.4.). Schopnost částic účinně vstupovat do savčích buněk nebyla vložním cizorodého epitopu do povrchové DE smyčky VP1 nikterak narušena, což bylo ověřeno pomocí metodou nepřímé fluorescence (viz kapitola 5.1.4.).

6.2. KONSTRUKCE UMĚLÝCH VIROVÝCH KAPSID LIDSKÉHO POLYOMAVIRU JC

Naše laboratoř se ve spolupráci s ÚHKT podílí na projektu, jehož záměrem je konstrukce částic odvozených od všech polyomavirů, které jsou schopny infikovat člověka. Tyto VLPs by se mohly stát nejen základem nejrůznějších imunizačních a screeningových postupů, ale stejně tak by mohly posloužit k různým srovnávacím studiím a zodpovědět mnohé stále otevřené otázky týkající se životních cyklů jednotlivých polyomavirů i rozdílů mezi nimi.

Právě příprava částic odvozených od jednoho z lidských patogenů čeledi *Polyomaviridae*, viru JC, byla dalším cílem této diplomové práce. Přestože se jedná o primárně lidský patogen, o jeho životním cyklu a interakcích s hostitelskými buňkami není k dispozici zdaleka tolik informací jako o modelových organismech MPyV a SV40.

K expresi hlavního kapsidového proteinu VP1 viru JC byl opět použit bakulovirový expresní systém Bac-to-Bac (Invitrogen, viz kapitola 4.2.5.10.). Jako donorový plazmid v tomto případě posloužil pFastBac Dual, který kromě polyhedrinového nese ještě druhý silný bakulovirový promotor p10. Genom JCV, který sloužil jako templát pro namnožení genu pro hlavní kapsidový protein, byl ale linearizován restriktázou EcoRI právě v oblasti VP1. Bylo tedy nutné obě části genu namnožit polymerázovou řetězovou reakcí zvlášť, poté je spojit a umístit pod kontrolu polyhedrinového promotoru. Konstrukce donorového plazmidu byla v podstatě jediným komplikovanějším krokem v přípravě těchto částic. Vzhledem k časové náročnosti současné přípravy tří typů částic odvozených od MPyV a jednoho od JC, bylo zhotovení bakuloviru z rekombinantního bakmidu svěřeno do rukou Mgr. Veroniky Hruškové, Ph.D., která úspěšně získala dva klony produkující hlavní kapsidový protein v dostatečném množství. Protože nemáme k dispozici primární protilátku proti VP1 JCV, byla k imunologické detekci používána protilátka proti VP1 primátího viru SV40, která díky poměrně vysoké aminokyselinové homologii (86% mezi BKV a JCV, 85% mezi BKV a SV40, 82% mezi JCV a SV40; BARBANTI-BRODANO *et al.*, 2006) křížově reaguje s hlavním kapsidovým proteinem lidských polyomavirů JC a BK (viz kapitoly 5.2.3 a 5.2.4.). Morfologie a vlastnosti částic byly obdobné jako např. ve studii CHANG *et al.* (1997), ve které byly k produkci VP1 použit starší typ bakulovirového expresního systému a jiné hmyzí buňky, konkrétně Sf21.

7. SOUHRN

SOUHRN DOSAŽENÝCH VÝSLEDKŮ:

1. a) Konstrukce tří typů chimerických částic odvozených od myšího polyomaviru nesoucích na svém povrchu cizorodé epitopy.

- Z polylinkeru bakulovirového transferového vektoru pFastBac 1 bylo odstraněno místo rozpoznávané a štěpené restriční endonukleázou BamHI.
- Z genu pro hlavní kapsidový protein VP1 myšího polyomaviru bylo odstraněno 21 nukleotidů a na jejich místo byla vložena sekvence glycin-serinového linkeru.
- Do tohoto místa byly vloženy sekvence kódující cizorodé epitopy, a tak byly připraveny 3 různé transferové vektory.
- Takto připravenými transferovými vektory byly transformovány bakterie *E. coli* DH10Bac, ve kterých došlo k místně specifické transpozici mezi donorovým vektorem a recipientním bakmidem.
- Z bakterií byly vyizolovány rekombinantní bakmidy.
- Rekombinantní bakmidy byly použity k transfekci hmyzích buněk Sf9.
- Z hmyzích buněk byly získány rekombinantní bakuloviry.
- Produkce rekombinantního proteinu VP1 byla ověřena pomocí SDS gelové elektroforózy, western blotu a imunofluorescenčního značení.
- Produkující bakuloviry byly použity k infekci dalších hmyzích buněk.
- Z infikovaných buněk byly izolovány chimerické částice pomocí izopyknické centrifugace v CsCl gradientu.

b) Stabilita částic byla ověřena elektronovou mikroskopií.

c) Částicemi byly infikovány buňky myších embryonálních fibroblastů 3T6 a hodinu po infekci byly zafixovány a pomocí nepřímé imunofluorescenční metody bylo ověřeno, že vstupují do buněk.

2. Konstrukce pseudovirionů odvozených od hlavního kapsidového proteinu lidského polyomaviru JC.

- Byl připraven bakulovirový transferový vektor pFastBac Dual nesoucí gen pro hlavní strukturní protein VP1 viru JC.
- Tento vektor byl použit k transformaci kompetentních bakterií DH10Bac.
- Po transpozici, ke které došlo v bakteriích, byl vyizolován rekombinantní bakmid.

- Získaným bakmidem byla transformována kultura hmyzích buněk Sf9.
- Rekombinantní bakulovirus vznikající v hmyzích buňkách byl otestován na produkci rekombinantního proteinu pomocí SDS-PAAGE, western blotu a imunofluorescence a následně dále množen na hmyzích buňkách.
- Pseudoviriony lidského polyomaviru JC byly izolovány a purifikovány z hmyzích buněk centrifugací v CsCl gradientu.
- Stabilita vznikajících částic byla ověřena elektronovou mikroskopií.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Abbasi N. R., Shaw H. M., Rigel D. S., Friedman R. J., McCarthy W. H., Osman I., Kopf A. W., Polsky D. (2004): Early diagnosis of cutaneous melanoma: revisiting the ABCD criteria. *JAMA*. 292(22):2771-6.

Abbing A., Blaschke U. K., Grein S., Kretschmar M., Stark C. M., Thies M. J., Walter J., Weigand M., Woith D. C., Hess J., Reiser C. O. (2004): Efficient intracellular delivery of a protein and a low molecular weight substance via recombinant polyomavirus-like particles. *J Biol Chem*. 279(26):27410-21.

Ahsan N., Shah K. V. (2006): Polyomaviruses and human diseases. *Adv Exp Med Biol*. 577:1-18.

Allander T., Andreasson K., Gupta S., Bjerkner A., Bogdanovic G., Persson M. A., Dalianis T., Ramqvist T., Andersson B. (2007): Identification of a third human polyomavirus. *J Virol*. 81(8):4130-6.

An K., Gillock E. T., Sweat J. A., Reeves W. M., Consigli R. A. (1999): Use of the baculovirus system to assemble polyomavirus capsid-like particles with different polyomavirus structural proteins: analysis of the recombinant assembled capsid-like particles. *J Gen Virol*. 80 (Pt 4):1009-16.

Andreasson K., Eriksson M., Tegerstedt K., Ramqvist T., Dalianis T. (2010): CD4+ and CD8+ T cells can act separately in tumour rejection after immunization with murine pneumotropic virus chimeric Her2/neu virus-like particles. *PLoS One*. 5(7):e11580.

Andreasson K., Tegerstedt K., Eriksson M., Curcio C., Cavallo F., Forni G., Dalianis T., Ramqvist T. (2009): Murine pneumotropic virus chimeric Her2/neu virus-like particles as prophylactic and therapeutic vaccines against Her2/neu expressing tumors. *Int J Cancer*. 124(1):150-6.

Anders D. G., Consigli R. A. (1983): Comparison of nonphosphorylated and phosphorylated species of polyomavirus major capsid protein VP1 and identification of the major phosphorylation region. *J Virol*. 48(1):206-17.

Andreola G., Rivoltini L., Castelli C., Huber V., Perego P., Deho P., Squarcina P., Accornero P., Lozupone F., Lugini L., Stringaro A., Molinari A., Arancia G., Gentile M., Parmiani G., Fais S. (2002): Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *J Exp Med.* 195(10):1303-16.

Arad U., Ben-Nun-Shaul O., El-Latif M. A., Nissim O., Oppenheim A. (2002): A new packaging cell line for SV40 vectors that eliminates the generation of T-antigen-positive, replication-competent recombinants. *Virology.* 304(2):155-9.

Atkin S. J., Griffin B. E., Dilworth S. M. (2009): Polyoma virus and simian virus 40 as cancer models: history and perspectives. *Semin Cancer Biol.* 19(4):211-7.

Atkins M. B., Lotze M. T., Dutcher J. P., Fisher R. I., Weiss G., Margolin K., Abrams J., Sznol M., Parkinson D., Hawkins M., Paradise C., Kunkel L., Rosenberg S. A. (1999): High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *J Clin Oncol.* 17(7):2105-16.

Balch C. M., Soong S. J., Gershenwald J. E., Thompson J. F., Reintgen D. S., Cascinelli N., Urist M., McMasters K. M., Ross M. I., Kirkwood J. M., Atkins M. B., Thompson J. A., Coit D. G., Byrd D., Desmond R., Zhang Y., Liu P. Y., Lyman G. H., Morabito A. (2001): Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol.* 19(16):3622-34.

Barbanti-Brodano G., Sabbioni S., Martini F., Negrini M., Corallini A., Tognon M. (2006): BK Virus, JC Virus and Simian Virus 40 Infection in Humans, and Association with Human Tumors. *Adv Exp Med Biol.* 577:319-41

Barnhill R. L., Fine J. A., Roush G. C., Berwick M. (1996): Predicting five-year outcome for patients with cutaneous melanoma in a population-based study. *Cancer.* 78(3):427-32.

Barnhill R. L., Katzen J., Spatz A., Fine J., Berwick M. (2005): The importance of mitotic rate as a prognostic factor for localized cutaneous melanoma. *J Cutan Pathol.* 32(4):268-73.

Barouch D. H., Harrison S. C. (1994): Interactions among the major and minor coat proteins of polyomavirus. *J Virol.* 68(6):3982-9.

Becker J. C., Bröcker E. B. (1995): Lymphocyte-melanoma interaction: role of surface molecules. *Recent Results Cancer Res.* 139:205-14.

Bevona C., Goggins W., Quinn T., Fullerton J., Tsao H. (2003): Cutaneous melanomas associated with nevi. *Arch Dermatol.* 139(12):1620-4

Bickert T., Wohlleben G., Brinkman M., Trujillo-Vargas C. M., Ruehland C., Reiser C. O., Hess J., Erb K. J. (2007): Murine polyomavirus-like particles induce maturation of bone marrow-derived dendritic cells and proliferation of T cells. *Med Microbiol Immunol.* 196(1):31-9.

Boasberg P. D., Hoon D. S., Piro L. D., Martin M. A., Fujimoto A., Kristedja T. S., Bhachu S., Ye X., Deck R. R., O'Day S. J. (2006): Enhanced survival associated with vitiligo expression during maintenance biotherapy for metastatic melanoma. *J Invest Dermatol.* 126(12):2658-63.

Bolen J. B., Anders D. G., Trempey J., Consigli R. A. (1981): Differences in the subpopulations of the structural proteins of polyoma virions and capsids: biological functions of the multiple VP1 species. *J Virol.* 37(1):80-91.

Boothpur R., Brennan D. C. (2010): Human polyoma viruses and disease with emphasis on clinical BK and JC. *J Clin Virol.* 47(4):306-12.

Boura E., Liebl D., Spísek R., Fric J., Marek M., Stokrová J., Holán V., Forstová J. (2005): Polyomavirus EGFP-pseudocapsids: analysis of model particles for introduction of proteins and peptides into mammalian cells. *FEBS Lett.* 579(29):6549-58.

Breslow A. (1970): Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg.* 172(5): 902–908.

Brinkman M., Walter J., Grein S., Thies M. J., Schulz T. W., Herrmann M., Reiser C. O., Hess J. (2005): Beneficial therapeutic effects with different particulate structures of murine polyomavirus VP1-coat protein carrying self or non-self CD8 T cell epitopes against murine melanoma. *Cancer Immunol Immunother.* 54(6):611-22.

Burton K. S., Consigli R. A. (1996): Methylation of the polyomavirus major capsid protein VP1. *Virus Res.* 40(2):141-7.

Busam K. J. (2004): The use and application of special techniques in assessing melanocytic tumours. *Pathology.* 36(5):462-9.

Busam K. J., Antonescu C. R., Marghoob A. A., Nehal K. S., Sachs D. L., Shia J., Berwick M. (2001): Histologic classification of tumor-infiltrating lymphocytes in primary cutaneous malignant melanoma. A study of interobserver agreement. *Am J Clin Pathol.* 115(6):856-60.

Chackerian B., Lowy D. R., Schiller J. T. (2001): Conjugation of a self-antigen to papillomavirus-like particles allows for efficient induction of protective autoantibodies. *J Clin Invest.* 108(3):415-23.

Chamberlain A., Ng J. (2009): Cutaneous melanoma – atypical variants and presentations. *Aust Fam Physician.* 38(7):476-82.

Chang C. C., Campoli M., Restifo N. P., Wang X., Ferrone S. (2005): Immune selection of hot-spot beta 2-microglobulin gene mutations, HLA-A2 allospecificity loss, and antigen-processing machinery component down-regulation in melanoma cells derived from recurrent metastases following immunotherapy. *J Immunol.* 174(3):1462-71.

Chang D., Cai X., Consigli R. A. (1993): Characterization of the DNA binding properties of polyomavirus capsid protein. *J Virol.* 67(10):6327-31.

Chang D., Fung C. Y., Ou W. C., Chao P. C., Li S. Y., Wang M., Huang Y. L., Tzeng T. Y., Tsai R. T. (1997): Self-assembly of the JC virus major capsid protein, VP1, expressed in insect cells. *J Gen Virol.* 78 (Pt 6):1435-9.

Chang D., Haynes J. I. 2nd, Brady J. N., Consigli R. A. (1992): The use of additive and subtractive approaches to examine the nuclear localization sequence of the polyomavirus major capsid protein VP1. *Virology.* 189(2):821-7.

Caparrós-Wanderley W., Clark B., Griffin B. E. (2004): Effect of dose and long-term storage on the immunogenicity of murine polyomavirus VP1 virus-like particles. *Vaccine.* 22(3-4):352-61.

Chen X. S., Casini G., Harrison S. C., Garcea R. L. (2001): Papillomavirus capsid protein expression in Escherichia coli: purification and assembly of HPV11 and HPV16 L1. *J Mol Biol.* 307(1):173-82.

Chen X. S., Stehle T., Harrison S. C. (1998): Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry. *EMBO J.* 17(12):3233-40.

Chen Y. T., Stockert E., Jungbluth A., Tsang S., Coplan K. A., Scanlan M. J., Old L. J. (1996): Serological analysis of Melan-A(MART-1), a melanocyte-specific protein homogeneously expressed in human melanomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(12):5915-9.

Clark B., Caparrós-Wanderley W., Musselwhite G., Kotecha M., Griffin B. E. (2001): Immunity against both polyomavirus VP1 and a transgene product induced following intranasal delivery of VP1 pseudocapsid-DNA complexes. *J Gen Virol.* 82(Pt 11):2791-7.

Clark W. H. Jr., Elder K. D., Guerry IV. D., Braitman L. E., Trock B. J., Schultz D., Synnestvedt M., Halpern A. C. (1989): Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 81:1893-1904

Clark W. H. Jr., From L., Bernardino E. A., Mihm M. C. (1969): The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res.* 29(3):705-27.

Clemente C. G., Mihm M. C. Jr., Bufalino R., Zurrida S., Collini P., Cascinelli N. (1996): Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer.* 77(7):1303-10.

Cole N. C. (1996): Polyomavirinae: The viruses and their replication.V: Knipe D. M., Howley P. M. (eds.): *Fields Virology 2.* Third edition, Lippincott – Raven Publishers. Philadelphia.

Coulie P. G., Brichard V., Van Pel A., Wölfel T., Schneider J., Traversari C., Mattei S., De Plaen E., Lurquin C., Szikora J. P., Renauld J. C., Boon T. (1994): A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med.* 180(1):35-42.

Craiu A., Akopian T., Goldberg A., Rock K. L. (1997): Two distinct proteolytic processes in the generation of a major histocompatibility complex class I-presented peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(20):10850-5.

Crowson A. N., Magro C., Miller A., Mihm M. C. Jr. (2007): The molecular basis of melanomagenesis and the metastatic phenotype. *Semin Oncol.* 34(6):476-90.

Curtin J. A., Fridlyand J., Kageshita T., Patel H. N., Busam K. J., Kutzner H., Cho K. H., Aiba S., Bröcker E. B., LeBoit P. E., Pinkel D., Bastian B. C. (2005): Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med.* 353(20):2135-47.

Dalianis T., Garcea R.L. (2009): Welcome to the Polyomaviridae. *Semin Cancer Biol.* 19(4):209-10

Dal Pozzo V., Benelli C., Roscetti E. (1999): The seven features for melanoma: a new dermoscopic algorithm for the diagnosis of malignant melanoma. *Eur J Dermatol.* 9(4):303-308

Dorn D. C., Lawatscheck R., Zvirbliene A., Aleksaite E., Pecher G., Sasnauskas K., Ozel M., Raftery M., Schönrich G., Ulrich R. G., Gedvilaite A. (2008): Cellular and humoral immunogenicity of hamster polyomavirus-derived virus-like particles harboring a mucin 1 cytotoxic T-cell epitope. *Viral Immunol.* 21(1):12-27.

Dranoff G. (2009): Targets of protective tumor immunity. *Ann N Y Acad Sci.* 1174:74-80.

Dubreuilh M. W. (1894). Citováno podle **Markovic S. N., Erickson L. A., Rao R. D., Weenig R. H., Pockaj B. A., Bardia A., Vachon C. M., Schild S. E., McWilliams R. R., Hand J. L., Laman S. D., Kottschade L. A., Maples W. J., Pittelkow M. R., Pulido J. S., Cameron J. D., Creagan E. T., Melanoma Study Group of the Mayo Clinic Cancer Center (2007a):** Malignant melanoma in the 21st century, part 1: epidemiology, risk factors, screening, prevention, and diagnosis. *Mayo Clin Proc.* 82(3):364-380.

Eggermont AM, Gore M. (2007): Randomized adjuvant therapy trials in melanoma: surgical and systemic. *Semin Oncol.* 34(6):509-15.

Fang L., Lonsdorf A. S., Hwang S. T. (2008): Immunotherapy for advanced melanoma. *J Invest Dermatol.* 128(11):2596-605.

Feng H., Shuda M., Chang Y., Moore P. S. (2008): Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science.* 319(5866):1096-100.

Forstová J., Krauzewicz N., Sandig V., Elliott J., Palková Z., Strauss M., Griffin B. E. (1995): Polyoma virus pseudocapsids as efficient carriers of heterologous DNA into mammalian cells. *Hum Gene Ther.* 6(3):297-306.

Forstová J., Krauzewicz N., Wallace S., Street A. J., Dilworth S. M., Beard S., Griffin B. E. (1993): Cooperation of structural proteins during late events in the life cycle of polyomavirus. *J Virol.* 67(3):1405-13.

Franzén A. V., Tegerstedt K., Holländerova D., Forstová J., Ramqvist T., Dalianis T. (2005): Murine polyomavirus-VP1 virus-like particles immunize against some polyomavirus-induced tumours. *In Vivo*. 19(2):323-6.

Freeman G. J., Long A. J., Iwai Y., Bourque K., Chernova T., Nishimura H., Fitz L. J., Malenkovich N., Okazaki T., Byrne M. C., Horton H. F., Fouser L., Carter L., Ling V., Bowman M. R., Carreno B. M., Collins M., Wood C. R., Honjo T. (2000): Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med*. 192(7):1027-34.

Friedman R. J., Rigel D. S., Kopf A. W. (1985): Early detection of malignant melanoma: the role of physician examination and self-examination of the skin. *CA Cancer J Clin*. 35(3):130-151.

Fujimura T., Mahnke K., Enk A. H. (2010): Myeloid derived suppressor cells and their role in tolerance induction in cancer. *J Dermatol Sci*. 59(1):1-6.

Gaggioli C., Sahai E. (2007): Melanoma invasion - current knowledge and future directions. *Pigment Cell Res*. 20(3):161-72.

Garcia M. I., Perez M., Caruso M., Sthandier O., Ferreira R., Cermola M., Macchia C., Amati P. (2000): A mutation in the DE loop of the VP1 protein that prevents polyomavirus transcription and replication. *Virology*. 272(2):293-301.

Gardner S. D., Field A. M., Coleman D. V., Hulme B. (1971): New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet*. 1(7712):1253-7.

Gaynor A. M., Nissen M. D., Whiley D. M., Mackay I. M., Lambert S. B., Wu G., Brennan D. C., Storch G. A., Sloots T. P., Wang D. (2007): Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathog*. 3(5):e64.

Gedvilaite A., Dorn D. C., Sasnauskas K., Pecher G., Bulavaite A., Lawatscheck R., Staniulis J., Dalianis T., Ramqvist T., Schönrich G., Raftery M. J., Ulrich R. (2006): Virus-like particles derived from major capsid protein VP1 of different polyomaviruses differ in their ability to induce maturation in human dendritic cells. *Virology*. 354(2):252-60.

Gedvilaite A., Frömmel C., Sasnauskas K., Micheel B., Ozel M., Behrsing O., Staniulis J., Jandrig B., Scherneck S., Ulrich R. (2000): Formation of immunogenic virus-like particles by inserting epitopes into surface-exposed regions of hamster polyomavirus major capsid protein. *Virology*. 273(1):21-35.

Gedvilaite A., Zvirbliene A., Staniulis J., Sasnauskas K., Krüger D. H., Ulrich R. (2004): Segments of puumala hantavirus nucleocapsid protein inserted into chimeric polyomavirus-derived virus-like particles induce a strong immune response in mice. *Viral Immunol*. 17(1):51-68.

Ghosh P., Chin L. (2009): Genetics and genomics of melanoma. *Expert Rev Dermatol*. 4(2):131.

Gillock E. T., Rottinghaus S., Chang D., Cai X., Smiley S. A., An K., Consigli R. A. (1997): Polyomavirus major capsid protein VP1 is capable of packaging cellular DNA when expressed in the baculovirus system. *J Virol*. 71(4):2857-65.

Gimotty P. A., Van Belle P., Elder D. E., Murry T., Montone K. T., Xu X., Hotz S., Raines S., Ming M. E., Wahl P., Guerry D. (2005): Biologic and prognostic significance of dermal Ki67 expression, mitoses, and tumorigenicity in thin invasive cutaneous melanoma. *J Clin Oncol*. 23(31):8048-56.

Gleiter S., Lilie H. (2001): Coupling of antibodies via protein Z on modified polyoma virus-like particles. *Protein Sci*. 10(2):434-44.

Gleiter S., Lilie H. (2003): Cell-type specific targeting and gene expression using a variant of polyoma VP1 virus-like particles. *Biol Chem*. 384(2):247-55.

Gleiter S., Stubenrauch K., Lilie H. (1999): Changing the surface of a virus shell fusion of an enzyme to polyoma VP1. *Protein Sci.* 8(12):2562-9.

Goldmann C., Petry H., Frye S., Ast O., Ebitsch S., Jentsch K. D., Kaup F. J., Weber F., Trebst C., Nisslein T., Hunsmann G., Weber T., Lüke W. (1999): Molecular cloning and expression of major structural protein VP1 of the human polyomavirus JC virus: formation of virus-like particles useful for immunological and therapeutic studies. *J Virol.* 73(5):4465-9.

Gown A. M., Vogel A. M., Hoak D., Gough F., McNutt M. A. (1986): Monoclonal antibodies specific for melanocytic tumors distinguish subpopulations of melanocytes. *Am J Pathol.* 123(2):195-203.

Greene M. H. (1999): The genetics of hereditary melanoma and nevi. 1998 update. *Cancer.* 86(11 Suppl):2464-77.

Greenlee J. E. (1981): Effect of host age on experimental K virus infection in mice. *Infect Immun.* 33(1):297-303.

Gross L. (1953): A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. *Proc Soc Exp Biol Med.* 83(2):414-21.

Haass N. K., Smalley K. S., Li L., Herlyn M. (2005): Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Res.* 18(3):150-9.

Haass N. K., Herlyn M. (2005): Normal human melanocyte homeostasis as a paradigm for understanding melanoma. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 10(2):153-63.

Halpern A. C., DuPont IV G., Elder D. E., Trock B., Synnestvedt M. (1993): A Cohort Study of Melanoma in Patients with Dysplastic Nevi. *J Invest Dermatol.* 100:346S-349S

Heidari S., Krauzewicz N., Kalantari M., Vlastos A., Griffin B. E., Dalianis T. (2000): Persistence and tissue distribution of DNA in normal and immunodeficient mice inoculated with polyomavirus VP1 pseudocapsid complexes or polyomavirus. *J Virol.* 74(24):11963-5.

Heidari S., Vlastos A., Ramqvist T., Clark B., Griffin B. E., Garcia M. I., Perez M., Amati P., Dalianis T. (2002): Immunization of T-cell deficient mice against polyomavirus infection using viral pseudocapsids or temperature sensitive mutants. *Vaccine.* 20(11-12):1571-8.

Howell P. M. Jr., Liu S., Ren S., Behlen C., Fodstad O., Riker A. I. (2009): Epigenetics in human melanoma. *Cancer Control.* 16(3):200-18.

Hrusková V., Morávková A., Babiarová K., Ludvíková V., Fric J., Vonka V., Forstová J. (2009): Bcr-Abl fusion sequences do not induce immune responses in mice when administered in mouse polyomavirus based virus-like particles. *Int J Oncol.* 35(6):1247-56.

Hutchinson J. (1890). Citováno podle **Markovic S. N., Erickson L. A., Rao R. D., Weenig R. H., Pockaj B. A., Bardia A., Vachon C. M., Schild S. E., McWilliams R. R., Hand J. L., Laman S. D., Kottschade L. A., Maples W. J., Pittelkow M. R., Pulido J. S., Cameron J. D., Creagan E. T., Melanoma Study Group of the Mayo Clinic Cancer Center (2007a):** Malignant melanoma in the 21st century, part 1: epidemiology, risk factors, screening, prevention, and diagnosis. *Mayo Clin Proc.* 82(3):364-380.

Imperiale M. J., Major E. O. (2007): Polyomaviruses. V: Knipe D. M., Howley P. M. (eds.): *Fields Virology*. Fifth Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2263-98.

Jandus C., Speiser D., Romero P. (2009): Recent advances and hurdles in melanoma immunotherapy. *Pigment Cell Melanoma Res.* 22(6):711-23.

Kawakami Y., Eliyahu S., Delgado C. H., Robbins P. F., Rivoltini L., Topalian S. L., Miki T., Rosenberg S. A. (1994): Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(9):3515-9.

Kennedy C., ter Huurne J., Berkhout M., Gruis N., Bastiaens M., Bergman W., Willemze R., Bavinck J. N. (2001): Melanocortin 1 Receptor (*MC1R*) Gene Variants are Associated with an Increased Risk for Cutaneous Melanoma Which is Largely Independent of Skin Type and Hair Color. *J Invest Dermatol.* 117: 294-300

Kilham L., Murphy H. W. (1953): A pneumotropic virus isolated from C3H mice carrying the Bittner Milk Agent. *Proc Soc Exp Biol Med.* 82(1):133-7.

Kim C. J., Dessureault S., Gabrilovich D., Reintgen D. S., Slingluff C. L. Jr. (2002): Immunotherapy for melanoma. *Cancer Control.* 9(1):22-30.

Kimchi-Sarfaty C., Arora M., Sandalon Z., Oppenheim A., Gottesman M. M. (2003): High cloning capacity of in vitro packaged SV40 vectors with no SV40 virus sequences. *Hum Gene Ther.* 14(2):167-77.

Kimchi-Sarfaty C., Ben-Nun-Shaul O., Rund D., Oppenheim A., Gottesman M. M. (2002): In vitro-packaged SV40 pseudovirions as highly efficient vectors for gene transfer. *Hum Gene Ther.* 13(2):299-310.

Kimchi-Sarfaty C., Gottesman M. M. (2004): SV40 pseudovirions as highly efficient vectors for gene transfer and their potential application in cancer therapy. *Curr Pharm Biotechnol.* 5(5):451-8.

Kirnbauer R., Booy F., Cheng N., Lowy D. R., Schiller J. T. (1992): Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(24):12180-4.

Klener P. (2002): Maligní melanom. V: Klinická onkologie. Galén, Karolinum, Praha.

Kraisová I. (2006): Melanom. Maxdorf, Praha.

Krauzewicz N., Cox C., Soeda E., Clark B., Rayner S., Griffin B. E. (2000a): Sustained ex vivo and in vivo transfer of a reporter gene using polyoma virus pseudocapsids. *Gene Ther.* 7(13):1094-102.

Krauzewicz N., Stokrová J., Jenkins C., Elliott M., Higgins C. F., Griffin B. E. (2000b): Virus-like gene transfer into cells mediated by polyoma virus pseudocapsids. *Gene Ther.* 7(24):2122-31.

Lawatscheck R., Aleksaite E., Schenk J. A., Micheel B., Jandrig B., Holland G., Sasnauskas K., Gedvilaite A., Ulrich R. G. (2007): Chimeric polyomavirus-derived virus-like particles: the immunogenicity of an inserted peptide applied without adjuvant to mice depends on its insertion site and its flanking linker sequence. *Viral Immunol.* 20(3):453-60.

Lens M. B., Dawes M. (2002): Interferon alfa therapy for malignant melanoma: a systematic review of randomized controlled trials. *J Clin Oncol.* 20(7):1818-25.

Lens M. B., Newton-Bishop J. A., Boon A. P. (2005): Desmoplastic malignant melanoma: a systematic review. *Br J Dermatol.* 152(4):673-8.

Li M., Garcea R. L. (1994): Identification of the threonine phosphorylation sites on the polyomavirus major capsid protein VP1: relationship to the activity of middle T antigen. *J Virol.* 68(1):320-7.

Liddington R. C., Yan Y., Moulai J., Sahli R., Benjamin T. L., Harrison S. C. (1991): Structure of simian virus 40 at 3.8-Å resolution. *Nature.* 354(6351):278-84.

Lin J., Hocker T. L., Singh M., Tsao H. (2008): Genetics of melanoma predisposition. *Br J Dermatol.* 159(2):286-91.

Lopez-Bergami P., Fitchman B., Ronai Z. (2008): Understanding signaling cascades in melanoma. *Photochem Photobiol.* 84(2):289-306.

Ludlow J. W., Consigli R. A. (1987): Polyomavirus major capsid protein VP1 is modified by tyrosine sulfuration. *J Virol.* 61(5):1708-11.

Ludlow J. W., Consigli R. A. (1989): Hydroxyproline in the major capsid protein VP1 of polyomavirus. *J Virol.* 63(6):2881-4.

MacKie R. M. (2000): Malignant melanoma: clinical variants and prognostic indicators. *Clin Exp Dermatol.* 25(6):471-5.

Mannová P., Liebl D., Krauzewicz N., Fejtová A., Stokrová J., Palková Z., Griffin B. E., Forstová J. (2002): Analysis of mouse polyomavirus mutants with lesions in the minor capsid proteins. *J Gen Virol.* 83(Pt 9):2309-19.

Mansfield A. S., Markovic S. N. (2009): Novel therapeutics for the treatment of metastatic melanoma. *Future Oncol.* 5(4):543-57.

Marigo I., Dolcetti L., Serafini P., Zanovello P., Bronte V. (2008): Tumor-induced tolerance and immune suppression by myeloid derived suppressor cells. *Immunol Rev.* 222:162-79.

Marincola F. M., Hijazi Y. M., Fetsch P., Salgaller M. L., Rivoltini L., Cormier J., Simonis T. B., Duray P. H., Herlyn M., Kawakami Y., Rosenberg S. A. (1996): Analysis of expression of the melanoma-associated antigens MART-1 and gp100 in metastatic melanoma cell lines and in in situ lesions. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol.* 19(3):192-205.

Markovic S. N., Erickson L. A., Rao R. D., Weenig R. H., Pockaj B. A., Bardia A., Vachon C. M., Schild S. E., McWilliams R. R., Hand J. L., Laman S. D., Kottschade L. A., Maples W. J., Pittelkow M. R., Pulido J. S., Cameron J. D., Creagan E. T., Melanoma Study Group of the Mayo Clinic Cancer Center (2007a): Malignant melanoma in the 21st century, part 1: epidemiology, risk factors, screening, prevention, and diagnosis. *Mayo Clin Proc.* 82(3):364-380.

Markovic S. N., Erickson L. A., Rao R. D., Weenig R. H., Pockaj B. A., Bardia A., Vachon C. M., Schild S. E., McWilliams R. R., Hand J. L., Laman S. D., Kottschade L. A., Maples W. J., Pittelkow M. R., Pulido J. S., Cameron J.D., Creagan E.T.; Melanoma Study Group of Mayo Clinic Cancer Center (2007b): Malignant melanoma in the 21st century, part 2: staging, prognosis, and treatment. *Mayo Clin Proc.* 82(4):490-513.

Maurer P., Jennings G. T., Willers J., Rohner F., Lindman Y., Roubicek K., Renner W. A., Müller P., Bachmann M. F. (2005): A therapeutic vaccine for nicotine dependence: preclinical efficacy, and Phase I safety and immunogenicity. *Eur J Immunol.* 35(7):2031-40.

May T., Gleiter S., Lilie H. (2002): Assessment of cell type specific gene transfer of polyoma virus like particles presenting a tumor specific antibody Fv fragment. *J Virol Methods.* 105(1):147-57.

McGary E. C., Lev D. C., Bar-Eli M. (2002): Cellular adhesion pathways and metastatic potential of human melanoma. *Cancer Biol Ther.* 1(5):459-65.

McNutt N. S. (1998): The S100 family of multipurpose calcium-binding proteins. *J Cutan Pathol.* 25(10):521-9.

Montross L., Watkins S., Moreland R. B., Mamon H., Caspar D. L., Garcea R. L. (1991): Nuclear assembly of polyomavirus capsids in insect cells expressing the major capsid protein VP1. *J Virol.* 65(9):4991-8.

Moreland R. B., Garcea R. L. (1991): Characterization of a nuclear localization sequence in the polyomavirus capsid protein VP1. *Virology.* 185(1):513-8.

Moreland R. B., Montross L., Garcea R. L. (1991): Characterization of the DNA-binding properties of the polyomavirus capsid protein VP1. *J Virol.* 65(3):1168-76.

Newell G. R., Sider J. G., Bergfelt L., Kripke M. L. (1988): Incidence of cutaneous melanoma in the United States by histology with special reference to the face. *Cancer Res.* 48(17):5036-41.

Oble D. A., Loewe R., Yu P., Mihm M. C. Jr. (2009): Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human melanoma. *Cancer Immun.* 9:3.

Ohsie S. J., Sarantopoulos G. P., Cochran A. J., Binder S. W. (2008): Immunohistochemical characteristics of melanoma. *J Cutan Pathol.* 35(5):433-44.

Ou W. C., Wang M., Fung C. Y., Tsai R. T., Chao P. C., Hseu T. H., Chang D. (1999): The major capsid protein, VP1, of human JC virus expressed in *Escherichia coli* is able to self-assemble into a capsid-like particle and deliver exogenous DNA into human kidney cells. *J Gen Virol.* 80 (Pt 1):39-46.

Padgett B. L., Walker D. L., ZuRhein G. M., Eckroade R. J., Dessel B. H. (1971): Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet.* 1(7712):1257-60.

Palková Z., Adamec T., Liebl D., Stokrová J., Forstová J. (2005): Production of polyomavirus structural protein VP1 in yeast cells and its interaction with cell structures. *FEBS Lett.* 478(3):281-9.

Palmer J. S., Duffy D. L., Box N. F., Aitken J. F., O’Gorman L. E., Green A. C., Hayward N. K., Martin N. G., Sturm R. A. (2000): Melanocortin-1 Receptor Polymorphisms and Risk of Melanoma: Is the Association Explained Solely by Pigmentation Phenotype? *Am J Hum Genet.* 66:176–186

Palmieri G., Capone M., Ascierto M. L., Gentilcore G., Stroncek D. F., Casula M., Sini M. C., Palla M., Mozzillo N., Ascierto P. A. (2009): Main roads to melanoma. *J Transl Med.* 14;7:86.

Paul P., Rouas-Freiss N., Khalil-Daher I., Moreau P., Riteau B., Le Gal F. A., Avril M. F., Dausset J., Guillet J. G., Carosella E. D. (1998): HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(8):4510-5.

Prasad M. L., Jungbluth A. A., Iversen K., Huvos A. G., Busam K. J. (2001): Expression of melanocytic differentiation markers in malignant melanomas of the oral and sinonasal mucosa. *Am J Surg Pathol.* 25(6):782-7.

Quaglino P., Marengo F., Osella-Abate S., Cappello N., Ortoncelli M., Salomone B., Fierro M. T., Savoia P., Bernengo M.G. (2010): Vitiligo is an independent favourable prognostic factor in stage III and IV metastatic melanoma patients: results from a single-institution hospital-based observational cohort study. *Ann Oncol.* 21(2):409-14.

Rao U. N., Lee S. J., Luo W., Mihm M. C. Jr., Kirkwood J. M. (2010): Presence of tumor-infiltrating lymphocytes and a dominant nodule within primary melanoma are prognostic factors for relapse-free survival of patients with thick (t4) primary melanoma: pathologic analysis of the e1690 and e1694 intergroup trials. *Am J Clin Pathol.* 133(4):646-53.

Redmond M. J., Ijaz M. K., Parker M. D., Sabara M. I., Dent D., Gibbons E., Babiuk L. A. (1993): Assembly of recombinant rotavirus proteins into virus-like particles and assessment of vaccine potential. *Vaccine.* 11(2):273-81.

Requena C., Botella-Estrada R., Traves V., Nagore E., Almenar S., Guillén C. (2009): Problems in defining melanoma regression and prognostic implication. *Actas Dermosifiliogr.* 100(9):759-66.

Richterová Z., Liebl D., Horák M., Palková Z., Stokrová J., Hozák P., Korb J., Forstová J. (2001): Caveolae are involved in the trafficking of mouse polyomavirus virions and artificial VP1 pseudocapsids toward cell nuclei. *J Virol.* 75(22):10880-91.

Rollman E., Ramqvist T., Zuber B., Tegerstedt K., Kjerrström Zuber A., Klingström J., Eriksson L., Ljungberg K., Hinkula J., Wahren B., Dalianis T. (2003): Genetic immunization is augmented by murine polyomavirus VP1 pseudocapsids. *Vaccine*. 21(19-20):2263-7.

Romero P., Gervois N., Schneider J., Escobar P., Valmori D., Pannetier C., Steinle A., Wolfel T., Lienard D., Brichard V., van Pel A., Jotereau F., Cerottini J. C. (1997): Cytolytic T lymphocyte recognition of the immunodominant HLA-A*0201-restricted Melan-A/MART-1 antigenic peptide in melanoma. *J Immunol*. 159(5):2366-74.

Rosenberg S. A., Yang J. C., Topalian S. L., Schwartzentruber D. J., Weber J. S., Parkinson D. R., Seipp C. A., Einhorn J. H., White D. E. (1994): Treatment of 283 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cell cancer using high-dose bolus interleukin 2. *JAMA*. 271(12):907-13.

Sadelain M. (2009): T-cell engineering for cancer immunotherapy. *Cancer J*. 15(6):451-5.

Salunke D. M., Caspar D. L., Garcea R. L. (1986): Self-assembly of purified polyomavirus capsid protein VP1. *Cell*. 46(6):895-904.

Salunke D. M., Caspar D. L., Garcea R. L. (1989): Polymorphism in the assembly of polyomavirus capsid protein VP1. *Biophys J*. 56(5):887-900.

Sandalon Z., Dalyot-Herman N., Oppenheim A. B., Oppenheim A. (1997): In vitro assembly of SV40 virions and pseudovirions: vector development for gene therapy. *Hum Gene Ther*. 8(7):843-9.

Sapp M., Day P. M. (2009): Structure, attachment and entry of polyoma- and papillomaviruses. *Virology*. 384(2):400-9.

Sariyer I. K., Akan I., Del Valle L., Khalili K., Safak M. (2004): Tumor induction by simian and human polyomaviruses. *Cancer Ther*. 2: 85-98.

Sasnauskas K., Bulavaite A., Hale A., Jin L., Knowles W. A., Gedvilaite A., Dargeviciute A., Bartkeviciute D., Zvirbliene A., Staniulis J., Brown D. W., Ulrich R. (2002): Generation of recombinant virus-like particles of human and non-human polyomaviruses in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Intervirology*. 45(4-6):308-17.

Sasnauskas K., Buzaite O., Vogel F., Jandrig B., Razanskas R., Staniulis J., Scherneck S., Krüger D. H., Ulrich R. (1999): Yeast cells allow high-level expression and formation of polyomavirus-like particles. *Biol Chem*. 380(3):381-6.

Satyamoorthy K., Herlyn M. (2002): Cellular and molecular biology of human melanoma. *Cancer Biol Ther*. 1(1):14-7.

Schmiedeskamp M. R., Kockler D. R. (2006): Human papillomavirus vaccines. *Ann Pharmacother*. 40(7-8):1344-52.

Sekulic A., Haluska P. Jr., Miller A. J., Genebriera De Lamo J., Ejadi S., Pulido J. S., Salomao D. R., Thorland E. C., Vile R. G., Swanson D. L., Pockaj B. A., Laman S. D., Pittelkow M. R., Markovic S. N.; Melanoma Study Group of Mayo Clinic Cancer Center (2008): Malignant melanoma in the 21st century: the emerging molecular landscape. *Mayo Clin Proc*. 83(7):825-846.

Situm M., Bolanca Z., Buljan M. (2010): Lentigo maligna melanoma – the review. *Coll Antropol*. 34 Suppl 2:299-301.

Sivendran S., Glodny B., Pan M., Merad M., Saenger Y. (2010): Melanoma immunotherapy. *Mt Sinai J Med*. 77(6):620-42.

Skrastina D., Bulavaite A., Sominskaya I., Kovalevska L., Ose V., Priede D., Pumpens P., Sasnauskas K. (2008): High immunogenicity of a hydrophilic component of the hepatitis B virus preS1 sequence exposed on the surface of three virus-like particle carriers. *Vaccine*. 26(16):1972-81.

Soeda E., Krauzewicz N., Cox C., Stokrová J., Forstová J., Griffin B. E. (1998): Enhancement by polylysine of transient, but not stable, expression of genes carried into cells by polyoma VP1 pseudocapsids. *Gene Ther.* 5(10):1410-9.

Speeckaert R., van Geel N., Vermaelen K. V., Lambert J., Van Gele M., Speeckaert M. M., Brochez L. (2011): Immune reactions in benign and malignant melanocytic lesions: lessons for immunotherapy. *Pigment Cell Melanoma Res.* 24(2):334-44.

Speck L. M., Tyring S. K. (2006): Vaccines for the prevention of human papillomavirus infections. *Skin Therapy Lett.* 11(6):1-3.

Stehle T., Gamblin S. J., Yan Y., Harrison S. C. (1996): The structure of simian virus 40 refined at 3.1 Å resolution. *Structure.* 4(2):165-82.

Stehle T., Harrison S. C. (1996): Crystal structures of murine polyomavirus in complex with straight-chain and branched-chain sialyloligosaccharide receptor fragments. *Structure.* 4(2):183-94.

Stehle T., Harrison S. C. (1997): High-resolution structure of a polyomavirus VP1-oligosaccharide complex: implications for assembly and receptor binding. *EMBO J.* 16(16):5139-48.

Stehle T., Yan Y., Benjamin T. L., Harrison S. C. (1994): Structure of murine polyomavirus complexed with an oligosaccharide receptor fragment. *Nature.* 369(6476):160-3.

Stubenrauch K., Gleiter S., Brinkmann U., Rudolph R., Lilie H. (2001): Conjugation of an antibody Fv fragment to a virus coat protein: cell-specific targeting of recombinant polyoma-virus-like particles. *Biochem J.* 356(Pt 3):867-73.

Sweet B. H., Hilleman M. R. (1960): The vacuolating virus, S.V. 40. *Proc Soc Exp Biol Med.* 105:420-7.

Španielová H., Liebl D. (2003): Návody k virologickému praktiku.

Štokrová J., Palková Z., Fischer L., Richterová Z., Korb J., Griffin B. E., Forstová J. (1999): Interactions of heterologous DNA with polyomavirus major structural protein, VP1. *FEBS Lett.* 445(1):119-25.

Taylor R. C., Patel A., Panageas K. S., Busam K. J., Brady M. S. (2007): Tumor-infiltrating lymphocytes predict sentinel lymph node positivity in patients with cutaneous melanoma. *J Clin Oncol.* 25(7):869-75.

Tefany F. J., Barnetson R. S., Halliday G. M., McCarthy S. W., McCarthy W. H. (1991): Immunocytochemical analysis of the cellular infiltrate in primary regressing and non-regressing malignant melanoma. *J Invest Dermatol.* 97(2):197-202.

Tegerstedt K., Andreasson K., Vlastos A., Hedlund K. O., Dalianis T., Ramqvist T. (2003): Murine pneumotropic virus VP1 virus-like particles (VLPs) bind to several cell types independent of sialic acid residues and do not serologically cross react with murine polyomavirus VP1 VLPs. *J Gen Virol.* 84(Pt 12):3443-52.

Tegerstedt K., Franzén A., Ramqvist T., Dalianis T. (2007): Dendritic cells loaded with polyomavirus VP1/VP2Her2 virus-like particles efficiently prevent outgrowth of a Her2/neu expressing tumor. *Cancer Immunol Immunother.* 56(9):1335-44.

Tegerstedt K., Lindencrona J. A., Curcio C., Andreasson K., Tullus C., Forni G., Dalianis T., Kiessling R., Ramqvist T. (2005): A single vaccination with polyomavirus VP1/VP2Her2 virus-like particles prevents outgrowth of HER-2/neu-expressing tumors. *Cancer Res.* 65(13):5953-7.

Titus-Ernstoff L., Perry A. E., Spencer S. K., Gibson J. J., Cole B. F., Ernstoff M. S. (2005): Pigmentary characteristics and moles in relation to melanoma risk. *Int J Cancer.* 116(1):144-9.

Titus-Ernstoff L., Duray P. H., Ernstoff M. S., Barnhill R. L., Horn P. L., Kirkwood J. M. (1988): Dysplastic Nevi in Association with Multiple Primary Melanoma. *Cancer Res.* 48:1016-1018.

Touzé A., Bousarghin L., Ster C., Combita A. L., Roingeard P., Coursaget P. (2001): Gene transfer using human polyomavirus BK virus-like particles expressed in insect cells. *J Gen Virol.* 82(Pt 12):3005-9.

Tsai B., Gilbert J. M., Stehle T., Lencer W., Benjamin T. L., Rapoport T. A. (2003): Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40. *EMBO J.* 22(17):4346-55.

Tsai B., Qian M. (2010): Cellular entry of polyomaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 343:177-94.

Ugurel S., Utikal J., Becker J. C. (2009): Tumor biomarkers in melanoma. *Cancer Control.* 16(3):219-24.

Utikal J., Schadendorf D., Ugurel S. (2007): Serologic and immunohistochemical prognostic biomarkers of cutaneous malignancies. *Arch Dermatol Res.* 298(10):469-77.

van der Meijden E., Janssens R. W., Lauber C., Bouwes Bavinck J. N., Gorbalenya A. E., Feltkamp M. C. (2010): Discovery of a new human polyomavirus associated with trichodysplasia spinulosa in an immunocompromized patient. *PLoS Pathog.* 6(7):e1001024.

Veronesi U., Cascinelli N., Adamus J., Balch C., Bandiera D., Barchuk A., Bufalino R., Craig P., De Marsillac J., Durand J. C., et al. (1988): Thin stage I primary cutaneous malignant melanoma. Comparison of excision with margins of 1 or 3 cm. *N Engl J Med.* 318(18):1159-62.

Viguiet M., Lemaître F., Verola O., Cho M. S., Gorochov G., Dubertret L., Bachelez H., Kourilsky P., Ferradini L. (2004): Foxp3 expressing CD4+CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J Immunol.* 173(2):1444-53.

Vlastos A, Andreasson K, Tegerstedt K, Holländerová D, Heidari S, Forstová J, Ramqvist T, Dalianis T. (2003): VP1 pseudocapsids, but not a glutathione-S-transferase VP1 fusion protein, prevent polyomavirus infection in a T-cell immune deficient experimental mouse model. *J Med Virol.* 70(2):293-300.

Voronkova T., Kazaks A., Ose V., Ozel M., Scherneck S., Pumpens P., Ulrich R. (2007): Hamster polyomavirus-derived virus-like particles are able to transfer in vitro encapsidated plasmid DNA to mammalian cells. *Virus Genes.* 34(3):303-14.

Weide B., Derhovanessian E., Pflugfelder A., Eigentler T. K., Radny P., Zelba H., Pföhler C., Pawelec G., Garbe C. (2010): High response rate after intratumoral treatment with interleukin-2: results from a phase 2 study in 51 patients with metastasized melanoma. *Cancer.* 116(17):4139-46.