

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Jana Váňová**

Směrování virových částic pro cílenou dopravu látek do buněk  
Retargeting of viral particles for directed cargo delivery into cells

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Hana Španielová, Ph.D.

Praha, 2014

**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, 15. 05. 2014

Podpis:

**Podkování:**

Ráda bych na tomto místě podkovoala své školitelce RNDr. Hanu Španielové, Ph.D. především za trpělivost, cenné připomínky a rady, bez nichž by práce v této podobě nemohla vzniknout. Děkuji také své rodině za podporu a povzbuzení.

## **Abstrakt**

Virové částice představují díky své struktuře a schopnosti vstupovat do buněk, kde uvolní svůj obsah, atraktivní nástroj pro dopravu látek do buněk. Pro terapeutické využití virů je třeba zajistit specifický a vysoce účinný vstup do cílových buněk. K tomuto účelu byly vyvinuty různé techniky směřování virů na požadované receptory. Tato práce nabízí přehled metod používaných při přesměrování virů se záměrem zhodnotit dosavadní úspěšnost přesměrování z hlediska specifity a účinnosti vstupu vytvořených virových částic do buněk. Na základě publikovaných dat a s ohledem na mechanismy virové infekce ukazuje, že je obtížné zamezit nespecifickému vstupu virových částic do buňky a dosažení absolutní specifity je zřejmě nemožné. I přes tato drobná omezení jsou virové nanočástice opětovným terapeutickým nástrojem pro dopravu látek do buněk a je třeba jejich potenciálu využít.

**Klíová slova:** virové dopravní systémy, VLPs, směřování, vazba na receptor, tropismus, internalizace viru, selektivita, pseudotypování, usměrněná evoluce

## **Abstract**

Due to their structure and ability to enter cells where they release their content, viral particles represent an attractive tool to deliver cargo to a cell. For therapeutic usage of viruses it is necessary to ensure the specific and highly efficient entry to target cells. This thesis offers an overview of methods used for virus retargeting with the intention to evaluate the success of retargeting in terms of specificity and efficiency of designed viral particles when entering a cell. On the basis of published data and considering the mechanisms of viral infection, the thesis demonstrates the difficulty to prevent the nonspecific viral particles from entering the cell and concludes that reaching total specificity is apparently impossible. Despite these small limitations, viral nanoparticles are a revolutionary therapeutic tool for delivering cargo to the cell and it is necessary to exploit their potential.

**Keywords:** viral delivery systems, VLPs, targeting, receptor binding, tropism, viral internalisation, selectivity, pseudotyping, directed evolution

## Obsah

1	Úvod .....	1
2	Internalizace viru .....	2
2.1	Interakce viru s receptorem .....	3
2.2	Vstup viru do buňky .....	6
2.3	Nespecifický vstup viru do buňky .....	8
2.3.1	Cesty nespecifického vstupu .....	8
2.3.2	Proteinová korona.....	8
2.4	Exocytóza internalizovaného viru .....	8
3	Přesměrování virových částic .....	10
3.1	Přesměrování virových částic pseudotypováním .....	10
3.2	Přesměrování virových částic spojením prvků prokaryotických a eukaryotických vektorů ..	12
3.3	Přesměrování virových částic směřujícím ligandem .....	13
3.3.1	Adaptorová strategie.....	13
3.3.2	Chemická konjugace ligandu .....	18
3.3.3	Chemická konjugace v kombinaci s polyethylenglykolem .....	21
3.3.4	Chemicko-genetická modifikace kapsidy.....	23
3.4	Přesměrování virových částic genetickými modifikacemi .....	23
3.4.1	Místně specifická mutageneze kapsidy .....	23
3.4.2	Usměrňovaná evoluce .....	24
3.4.3	Kombinace přístupů .....	27
4	Závěr.....	28
5	Seznam použité literatury .....	30
6	Seznam použitých zkratk .....	37

# 1 Úvod

Viry odedávna svádly se svými hostiteli boj o přežití. V poslední době se však tato role mění a zbraně, které si viry po mnoho let společně evoluce vyvinuly proti nám, teď využíváme v našich prospěch. Viry se totiž dokáží pro imunitní systém leckdy nepostehnutelně pohybovat po našem těle, vázat se na ně, které buňky, do těchto buněk vstupovat a vnášet sem svou genetickou informaci. Tato schopnost se přitom nabízí pro využití v metodách genové terapie. Pomocí virových vektorů je možné zacílit genovou léčbu na konkrétní buňky těla (například nádorové buňky s genetickými poruchami). Současné technologie dokonce umožní použití uměle vytvořených virových schránek (kapsid) jako nanokontejnerů pro dopravu terapeutických nebo diagnostických látek do buněk. Pro toto použití je však třeba mít jistotu, že virové vektory proniknou právě do námi vybraných buněk a ne do jiných, kde by mohly způsobit poškození. V takovýchto případech je proto nutné pečlivě analyzovat nikoliv účinnost exprese vnášených genů (která může být ovlivněna dalšími faktory), ale výlučnost interakcí mezi virovou částicí a cílovou buňkou.

Cílem této práce je pomocí publikovaných dat zhodnotit, zda vůbec mohou virové systémy nabídnout dostatečnou selektivitu, specifitu, a účinnost pro směrovanou dopravu látek do buněk a zda mohou být takové virové systémy přesměrovány dle potřeb (například na nádorové buňky). Pro zodpovězení těchto otázek je důležité pochopit úlohu interakce virů s receptory při určení tropismu viru a analyzovat současně znalosti o vazbě viru na receptor, internalizaci viru a exocytózu právě s ohledem na možné aplikace virových částic pro směrovanou dopravu látek do buněk.

## 2 Internalizace viru

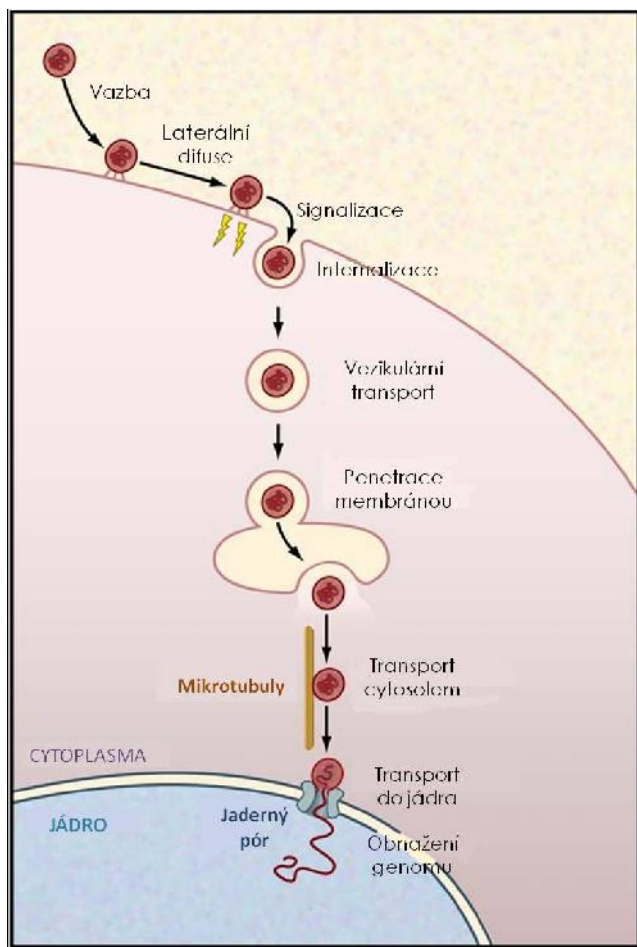
Významnou roli při vývoji virových vektorů hraje tkáňový nebo buněčný **tropismus** [schopnost viru infikovat nebo poškozovat specifické tkáně nebo buňky (Knipe a Howley, 2007)]. Tropismus je velkou měrou určen interakcí s buněčným receptorem, ale ne všechny buňky, do kterých virus dokáže vstoupit, jsou pro něj zároveň permissivní - nemusí dovolit propuknutí virové infekce. Pro dopravu látek virovými vektory (modifikované virové částice, které nejsou infekční a slouží k přepravě DNA a jiných molekul) však postačí internalizace virové částice k tomu, aby byla látka do buňky doručena, což znamená, že pro cílení nemusíme využívat pouze buňky permissivní pro virus. Na druhou stranu skutečnost, že mnoho virů dokáže vstoupit i do jiných než permissivních buněk, může snižovat specifitu doručení. Další úskalí spočívá v dosud téměř nezkoumaném nesespecifickém vstupu viru do buňky, například přejímáním tekuté fáze. Důležitým je být i další osud viru, který je nespecificky do buňky zavzat – zda má šanci uvolnit náklad na vhodném místě.

Proto je při pokusech o přesměrování virových částic třeba dobře rozumět mechanismu interakce viru s buněčným povrchem a jeho následné internalizaci. Pro kvalitní přesměrování je třeba uvážit zejména dva faktory - účinnost dopravy a její specifitu.

**Účinnost** dopravy pomocí virových částic je většinou hodnocena jako míra transdukce buněk na počet vložených virových částic i genom. Alternativně se při srovnávacích experimentech při konstantním počtu užívaných variant virových částic/genom hodnotí účinnost jako procento buněk, do nichž virová částice vstoupí. Účinnost je ovlivněna prakticky na všech úrovních internalizace viru, tedy od zachycení viru na povrchu buňky, interakce s receptorem, signalizace pro zahájení endocytosy, v nichž případech přestavby cytoskeletu, samotné endocytosy, úniku z endosomu, až po případný pronik do buněčného jádra (Obr. 1). V *in vivo* experimentech je účinnost také významně ovlivněna účinností imunitního systému.

**Specifitu** dopravy pomocí virových částic lze definovat jako schopnost částic doručovat virový obsah pouze do určitých (jasně definovaných) cílových buněk a ne do jiných. Ovlivňuje ji zejména interakce s povrchovým receptorem, a proto je specifita často zaměřována za **selektivitu**.

Částice, která má pro něj který receptor vyšší afinitu (selektivitu) než pro jiný, bude sice ochotná jít (v závislosti na rozdílu afinit a počtu receptorů) vstupovat do buněk obsahujících vysokoafinitní receptor, ale s jistou pravděpodobností i do buněk jiných. Selektivita může být tedy do velké míry ovlivněna například změnou koncentrace nebo konformace receptorů, zatímco specifitu nelze tímto faktory změnit. U virových částic nesoucích genetický materiál pro genovou expresi může být specifita ovlivněna jinými faktory, například přítomností buněčných enhancerů pro zahájení transkripce.



**Obr. . 1: Kroky vstupu viru endocytosou**

Vstup mnoha obalených i neobalených virů závisí na endocytických drahách hostitelské buňky. Některé viry mají složitý plán vstupu a rozvolnění jim umožní pohybovat se z periferie buňky do perinukleárního prostoru. Na zázorném příkladu se viry snaží doručit svůj obnažený genom do nukleoplazmy. Interakce mezi virem a hostitelskou buňkou začíná zachycením viru na receptorech buněčného povrchu, následovaným laterálním pohybem komplexu viru s receptorem a indukci signálu, které mají za následek internalizaci virové částice endocytosou. Po transportu vakuoly a doručení do lumen endosomu, kaveosomu nebo endoplazmatického retikula dojde ke změně konformace viru vyvolané podmínkami uvnitř kompartmentu. Tato změna způsobí penetraci viru nebo jeho kapsidy skrz membránu do cytosolu. Obalené viry využívají pro penetraci fúzi membrán, zatímco neobalené viry indukují lýzi nebo tvorbu porů. Po transportu podél mikrotubulů se virus nebo jeho kapsida naváže na komplex jaderného poru, jako v tomto příkladu, podstoupí finální přestavbu a uvolní virový genom do jádra. Detaily vstupní strategie se liší mezi viry a buněčnými typy, ale mnoho klíčových kroků zde ukázaných platí obecně. Upraveno podle Marsh a Helenius (2006).

## 2.1 Interakce viru s receptorem

Rozhodujícím krokem virové infekce je vazba viru na povrchový buněčný receptor. Některé viry se vážají přímo na receptory, jež zprostředkují internalizaci viru, jiné se nejprve zachytí na molekulách buněčného povrchu zjevně díky nesespecifické interakci (například elektrostatickými silami se záporně nabitými sacharidy), odkud se potom mohou snadněji laterální difuzí přesunout ke specifickému receptoru pro internalizaci viru (Mercer et al., 2010).

Viry pro svůj vstup do buňky využívají rozmanité molekuly nalézající se na buněčném povrchu, které obvykle slouží buďce k jinému účelu, často vážají ligandy, jejichž vazba vyvolá v buňce signalizaci. Z pohledu virového vstupu tyto molekuly představují receptory vázající virus. Afinita vazby buněčného receptoru se svým přirozeným ligandem nebývá příliš vysoká, což dává šanci virům, aby svojí vyšší afinitou pro daný receptor dokázali receptor obsadit a využít jej pro svůj vstup. Viry navíc často pokrývají při kontaktu s receptorem větší povrch tohoto receptoru než přirozené ligandy, například virus lidské imunitní nedostatečnosti (HIV) i adenovirus (shrnutí Stuart a Jones, 1995).



Pravidelné uspořádání virových částic navíc virům umožňuje zvýšit aviditu multivalentní vazbou k receptorům. Avidita závisí na počtu vazebných míst, která se vazby účastní a dochází tak k násobení afinity jednotlivých interakcí. Příkladem takové vazby je vazba adenoviru na buněčný receptor CAR (receptor coxsackie viru a adenoviru). Lortat-Jacob et al. (2000) studovali kinetiku této vazebné interakce a jednoznačně potvrdili, že při vazbě adenoviru na receptor se uplatňuje mechanismus založený na multivalentní vazbě. Adenovirus nese na svém povrchu výčnělky, zakončené trimerní globulární doménou, tzv. knoflíkem. Tyto molekuly receptoru CAR jsou vázány na jediné adenovirové vlákno a celková síla vazby viru se dále zvyšuje s počtem interakcí mezi dalšími vlákny a CAR, což zajišťuje pevnou vazbu viru k buňce (Lortat-Jacob et al., 2000).

Na základě pozorování vztahu mezi počtem receptorů pro virus na buňce a počtem vazebných proteinů viru, i vztahem mezi velikostí viru a počtem vazebných míst pro virus na buňce navrhli již v roce 1990 Wickham et al. (1990) teoretické modely receptorem zprostředkovaného připojení viru k buněčnému povrchu. Prvním modelem jsou viry, jejichž přichycení k buňce je založeno na monovalentní vazbě (Obr. 2a). Jsou to viry, které jsou stericky neschopné vázat více než jeden receptor s vysokou afinitou, případně se jejich receptor vyskytuje na povrchu buňky ve velmi nízké hustotě. Do této skupiny byl zařazen rhinovirus. Druhý způsob přichycení k buňce, který využívá například adenovirus, je založen na multivalentní vazbě virového receptoru. Nejprve dojde k interakci s jedním receptorem, která je následována řadou reversibilních vazeb k dalším receptorům (Obr. 2b). Je zde patrná negativní kooperativita celkové vazby, nebo dochází k saturaci receptorů a další viry se již nemohou na buňku navázat. Ve třetím modelu dochází k prostorové saturaci multivalentní vazbou. Povrch buňky s vysokým počtem virových receptorů je plně obsazen virovými částicemi dříve, než dojde k saturaci receptorů (Obr. 2c). Tímto způsobem se na povrch buňky zřejmě váže virus vezikulární stomatitidy. Dalším, již dříve navrženým způsobem, je vazba viru pouze ke specifickým oblastem buňky, tzv. doménám (Lipkind a Urbakh, 1988).



**Obr. 2: Tři teoretické modely vazby viru na buněčný receptor**

(a) Schéma monovalentní vazby viru na receptor. (b) Schéma multivalentní vazby viru na receptor, při níž dochází k saturaci receptorů. (c) Schéma multivalentní vazby viru na receptor, při níž dochází k prostorové saturaci. Upraveno podle Wickham et al. (1990).

Je tedy zřejmé, že kromě afinity a avidity vazby, hraje při interakci viru s receptorem důležitou roli také koncentrace a rozmístění receptorů určující stechiometrii vazby. Velké množství buněk nese molekuly, ke kterým se viry umí vázat, málokdy však virus pro vstup využívá molekulu specifickou pouze pro jediný buněčný typ. K selektivní internalizaci viru určitými buňkami však pravděpodobně dochází jen tehdy, vyskytne-li se na povrchu kritické množství receptorů, které umožní významnou vazbu viru (Wickham et al., 1990).

Multivalentní vazba viru může být pravděpodobně ovlivněna také geometrií virových částic. Proteiny, které jsou vzdálenější od místa vazby k receptoru, mají menší pravděpodobnost, že se budou nacházet ve vhodné rovině pro interakci s dalšími receptory (Wickham et al., 1990).

Dopad na účinnost virového vstupu do buňky má jistě i fakt, že hladina a distribuce receptorů a koreceptorů je variabilní jak mezi různými typy buněk, tak i mezi buňkami stejného typu a dokonce i v rámci jediné buňky (Gibbons et al., 2010). Nejen celková koncentrace receptorů, ale jejich lokální hustota může tedy hrát zásadní roli, a proto je třeba uvažovat i pohyblivost receptorů v plazmatické membráně.

Vliv pohyblivosti receptorů na vstup viru do buňky zkoumal Ewers et al. (2007). Pomocí metody interferometrické optické detekce zaznamenali stopu pohybu virionu SV40 (opičí virus 40) navázaného na uměle vytvořené membrány. Tato metoda má nespornou výhodu v možnosti sledovat neznámé objekty pouze na základě rozptylu světla. Vlastnosti sledovaného objektu tedy nejsou poznamenány vazbou fluoroforu či jiné značky. Viriony SV40 navázané na molekule receptoru GM1 se pohybovaly v membráně s difusní konstantou pouhých  $0,0088 \pm 0,0004 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Metodou obnovění fluorescence po fotovybílání (FRAP, z angl. fluorescence recovery after photobleaching) poté změřili difusní konstantu fluorescenční značky gangliosidu GM1 zabudovaného v membráně. Tato konstanta činila  $3,8 \pm 1,4 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Vazba virionů na receptor tedy snížila pohyblivost GM1 receptorů v membráně o více než 2 řády.

Metodou výpočetního modelování založeného na experimentálních datech získaných z umělé membránové dvouvrstvy Szklarczyk et al. (2013) zkoumali roli difuze receptorů, koncentrace receptorů a počet receptorů vyžadovaných pro stabilní vazbu viru SV40 na receptor GM1. Zjistili, že pro stabilní interakci tohoto viru s buňkou je zapotřebí po vytvoření prvního kontaktu s jedním receptorem, navázat během krátkého časového úseku nejméně 4 receptory GM1. Při nízkých koncentracích receptorů (které se zřejmě nacházejí v buňkách) je difuze receptorů důležitá pro ustavení stabilní vazby. Při těchto fyziologických koncentracích je totiž pohyb receptorů v rámci membrány důležitý pro nahromadění dostatečného množství navázaných receptorů. Když se receptor pohyboval pomalu, viriony disociovaly z membrány předtím, než mohly shromáždit dostatečné množství receptorů pro formaci stabilní vazby. V normálních buňkách dochází ke shlukování GM1

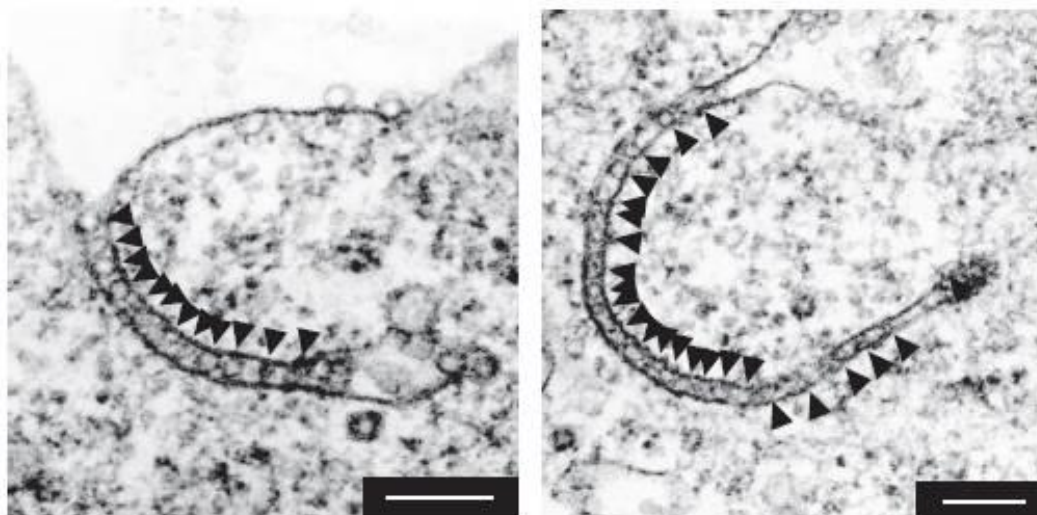
molekul (Fujita et al., 2007; Parton, 1994), a SV40 je tedy schopen stabilní vazby i na buňky, jejichž celková koncentrace GM1 je pro vazbu příliš nízká.

## 2.2 Vstup viru do buňky

Po zachycení viru na buněném povrchu následuje receptorem zprostředkovaný vstup viru do buňky. Obalené viry vstupují do buňky fúzí mezi lipidovým obalem viru a buněnou membránou, který je zajištěn glykoproteiny umístěnými v lipidové dvojvrstvě viru. Glykoproteiny jsou membránové proteiny kódované virovým genomem, ale syntetizované buněným aparátem. K jejich zabudování do hostitelské membrány dochází i při puštění viru z buňky. Některé viry jsou nezávislé na pH, fúzí tedy s plazmatickou membránou, zatímco viry závislé na nízkém pH fúzí s membránami endosomálních kompartmentů. Nejprve dojde ke štěpení prekursoru virového glykoproteinu, čímž se dostane do metastabilního stavu. Po vazbě viru na receptor a vystavení nízkému pH dojde ke konformační změně a obnažení fúzního peptidu, krátké oblasti glykoproteinu, který umožní fúzi membrán (shrnutí Eckert a Kim, 2001).

Některé obalené viry (závislé na pH) a všechny neobalené vstupují do buňky endocytosou. Interakce viru s receptorem často vyvolá signalizaci, potřebnou pro zahájení endocytózy viru připojeného k receptoru do buňky. Někdy však pro zahájení endocytózy nemusí být nezbytná aktivace signální dráhy, ani vlastnost buněného receptoru, ale pouze mechanické síly na membráně. Ewers et al. (2010) totiž zjistili, že pokud se částice viru SV40 naváže na povrch buňky, kde je dostatečné množství jeho receptoru (gangliosid GM1), dojde samovolně k zakřivení membrány mnohonásobnou vazbou receptorů a následně k tvorbě invaginací buněné membrány obsahující viry dovnitř do buňky (Obr. 3). Za odstředění těchto invaginací od povrchu membrány je již zodpovědný buněný aparát (tyrosin kinázová signalizace, dynamika aktinového cytoskeletu, přítomnost cholesterolu v membráně).

Ewers et al. (2010) dále objevili, že na tvorbu endocytických tubulů má vliv struktura receptorového gangliosidu GM1. Modifikovaný gangliosid s kratším acylovým řetězcem sice umožnil přichycení viru, ale nedošlo k tvorbě membránových invaginací, zatímco gangliosidy s delšími a už nasycenými i nenasycenými acylovými řetězci spontánní invaginaci umožňovaly. Rigidní struktura uhlovodíkového řetězce tohoto gangliosidu je tedy podstatná pro infekci virem SV40. Prokázali dále, že schopnost indukovat membránové invaginace sdílí také ostatní polyomaviry a dokonce i některé bakteriální toxiny (Shiga a cholera toxin), jejichž geometrie vazebných míst pro GM1 je podobná jako u SV40.



**Obr. 3: Vazba SV40 indukuje membránové invaginace na buňce**

Snímek z elektronové mikroskopie VLPs polyomaviru po 30ti minutách inkubace s buňkami CV-1. VLPs lemují lumen tubulárních membránových invaginací (šipky). Mřítko 200 nm. Upraveno podle Ewers et al. (2010).

Vlastní zakřivení virů a jejich schopnost interagovat přímo a s vysokou aviditou s molekulami na povrchu membrány může vyvolat tvorbu membránového zakřivení a invaginace v místě kontaktu. Invaginace může zapříčinit akumulaci specifických lipidů, proteinů, které interagují s těmito lipidy v těchto signálních proteinů, které mohou být také aktivovány shlukováním receptorů, a molekul snímajících zakřivení membrány. Všechny tyto molekuly se mohou společně podílet na stimulování specifického endocytického aparátu (Doherty a McMahon, 2009). Mechanickou indukci zakřivení a vchlipování membrány pravděpodobně nedokážou vyvolat viry s monovalentní vazbou na receptor, například rhinovirus (Wickham et al., 1990).

Na které viry pro zvýšení frekvence vstupu do buňky využívají více mechanismů, jak proniknout přes plazmatickou membránu do endosomálních kompartmentů. Virus chřipky například využívá podobně ze dvou těchto vstup pomocí endocytosy zprostředkované klatrinem, zatímco zbylé částice vstupují do buňky cestou nezávislou na klatrinu i kaveolinu (Rust et al., 2004). Obě cesty následně vedly k fúzi viru s vnitrobuněnými membránami s podobnou účinností. Virové částice, které byly transportovány pomocí klatrinu, iniciovaly vznik klatrinových váček okolo viru *de novo*, a pouze 5 % všech částic asociovalo s oblastmi membrány, kde již klatrin akumulován byl. Rust et al. (2004) dále navrhl, že silná multivalentní vazba viru chřipky na kyselinu sialovou, která je jeho receptorem, může vést k zakřivení membrány okolo viru, čímž spouští tvorbu klatrinového obalu pod membránou.

## 2.3 Nespecifický vstup viru do buňky

### 2.3.1 Cesty nespecifického vstupu

Pro doručení látek do buněk pomocí virových vektorů je třeba vstoupit do kterých buněk je virus schopen vstoupit a to nejen specificky, ale také nespecificky, a už například makropinocytózou tekuté fáze, i dosud neznámými mechanismy.

### 2.3.2 Proteinová korona

Nanočástice v tekutinách asociují s různými biomolekulami, zejména proteiny, které se zachytávají na jejich povrchu a tvoří takzvanou proteinovou korunu. Tyto proteiny se mohou vyměňovat v závislosti na okolním prostředí. Proteinový obal může mít vliv na interakci nanočástic s buněčnými receptory a jejich vstup do buněk (shrnutí Monopoli et al., 2012). Doposud nebyl proveden výzkum výskytu a případného vlivu proteinových korun na virech. Virové částice zejména neobalených virů, které mají exponovanou kapsidu s mnoha vazebnými místy, se nanočásticím strukturně podobají a je tedy možné, že se proteinová korona vytváří i na jejich povrchu. Pokud by tomu tak skutečně bylo, proteinové korony by se podílely na nespecifickém vstupu viru do buňky skrze některé z proteinů, které na virus adherovaly.

Zajímavý objev učinili Surviladze et al. (2012), když zjistili, že lidské papilomaviry (HPV) se při infekci keratinocytů nejprve zachytí na nespecifickém faktoru na povrchu buňky, kterým jsou heparan sulfátové proteoglykany (HSPG) (Giroglou et al., 2001; Joyce et al., 1999), a poté jsou odštěpeny buněčnými metaloproteinázami z povrchu buňky v komplexu s tímto HSPG, různými faktory (GF) a dalšími bioaktivními molekulami, které jsou přirozenými ligandy HSPG. Virus následně využívá specifitu a vysokou afinitu asociovaných různých faktorů pro přechod k receptoru pro různý faktor (GFR) a jejich interakci, HPV tedy s tímto receptorem neinteraguje přímo, ale přesně prostřednictvím vytvořeného GF. Tato vazba zároveň vyvolá signalizaci potěbnou pro zahájení endocytózy. Ve své studii ukázali, že HPV asociované se solubilními komplexy HSPG-GF mohou dokonce infikovat buňky postrádající HSPG. Buňka tedy nemusí mít receptor pro vstup papilomaviru a přesto může dojít k jejich vstupu, pokud se buňky nacházejí v blízkosti jiné buňky nesoucí HSPG.

## 2.4 Exocytóza internalizovaného viru

Exocytóza byla dosud studována především u nanočástic, kde hraje roli v setrvání nanočástic v buňce. Panyam a Labhasetwar (2003) ukázali, že nanočástice, které nenesou směřující ligandy a tedy nemohou vstupovat do buňky specificky, vstupovaly do buněk hladké svaloviny cév pomocí pinocytózy tekuté fáze a nespecifikovaným receptorem zprostředkované endocytózy. Exocytóza nanočástic byla pomalejší než exocytóza markeru fluidní fáze a byla závislá na energii. Intracelulární hladina nanočástic se zvyšovala při udržení stálé koncentrace nanočástic v extracelulárním prostředí.

Po nahrazení extracelulárního média s částicemi prvním médiem se hladina intracelulárních částic snížila. Délka přetrvání částic v bučce vzrostla se vzrostající dávkou částic v médiu. Odebrání séra z média způsobilo zastavení exocytosis nano částic, naopak přidání BSA (hovězího sérového albuminu) do média obnovoval exocytosis částic, což napovídá, že proteiny z média mohou být adsorbovány na povrch nano částic, a unášeny společně s nano částicemi do bučky, kde interagují s exocytickou dráhou a mohou způsobit vyšší míru exocytosis nano částic.

Furumoto et al. (2001) pozorovali, že míra exocytosis polystyrenových nano částic v hepatocytech se lišila podle toho, jaké molekuly séra se na částicích před jejich endocytováním zachytily. Zdá se tedy, že typ specifického ligandu na povrchu viru a tedy buněčný receptor ligandu působící, má vliv na exocytosis viru, směřuje totiž virus do konkrétní endocytické dráhy, která je určitým způsobem propojena s dráhou exocytickou, což může určit dobu přetrvání nespecificky zavzatých virových částic v bučce.

Gibbs a Lienhard (1984) odvodili, že za jednu hodinu se recykluje 20 % plazmatické membrány adipocytů, přičemž membrány, které jsou internalizovány, jsou nahrazeny exocytickými váčky ve stejné míře jako je míra internalizace. Lze tedy očekávat, že část nano částic přítomných v médiu by měla být neustále recyklována dovnitř a ven z bučky, zatímco část nano částic vstoupí do pozdních endosomů a lysosomů a některé částice z nich uniknou do cytoplazmy.

Uvnitř endosomů vznikají tzv. intraluminální váčky, kam jsou často dopravovány genomy virů. Pokud endosom fúzuje s plazmatickou membránou, dojde k exocytosis intraluminálních váčků ve formě tzv. exosomů, které mohou být v extracelulárním prostředí pohlceny jinou bučkou a tím dojde k přenosu viru do jiné bučky bez nutnosti interakce samotného viru s receptorem a tedy v podstatě k nespecifickému vstupu viru do bučky (shrnutí Nour a Modis, 2014).

Exocytóza, s výjimkou nově objevených exosomů, během virové infekce nebyla dosud systematicky zkoumána. Naše nepublikované výsledky ukazují, že v případě hu produktivní infekce myším polyomavirem k exocytóze nadbytečných virových částic dochází (Morávková, nepublikované výsledky) a v nepermissivních lidských bučkách virus vydrží více než 48 hodin než je z bučky odstraněn (Stančíková, nepublikované výsledky).

### 3 P esm rování virových ástic

Viry jsou velmi dokonalými nástroji pro p enos nukleové kyseliny. Tého schopnosti se využívá zejména v metodách genové terapie, kdy m že být do virové kapsidy uložena DNA kódující protein, který je v cílových bu kách defektní, malé nukleové kyseliny s regula ními funkcemi a v neposlední ad také nukleová kyselina kódující antigeny pro vakcinaci (shrnuli Giacca a Zacchigna, 2012). Viry a vir m podobné ástice (VLPs), které jsou tvo eny pouze obalovými proteiny, ale postrádají nukleovou kyselinu, díky emuž jsou neinfek ní, mohou být také využity pro p enos lé iv, antigen a kontrastních látek do cílových bun k.

Pro aplikaci dopravy pomocí virových vektor je třeba vytvo it virové ástice, jež specificky interagují s vybraným bun ným typem. V sou asnosti používané virové vektory však nejsou schopné pokrýt veškeré spektrum bun k, na n ž se má doprava cílit a je tedy třeba modifikovat virové ástice za ú elem jejich p esm rování z p irozeného receptoru na receptor nalézající se na povrchu cílových bun k. S tím je však spojeno úskalí, že ne každý bun ný typ nese na svém povrchu jedine ný typ molekul, který by byl navíc schopen vyvolat internalizaci viru, a proto pravd podobn v dohledné dob nebude možné cílit virové ástice na libovolné bu ky. Jako bu ky, nesoucí charakteristickou povrchovou molekulu, na které je zapot ebí dopravu cílit, m žeme ozna it nádorové bu ky, nebo u nich dochází k dramatickým zm nám genové exprese p i nádorové transformaci a dochází asto k nadm rné expresi n kterých povrchových molekul, mezi n ž pat í například prostatický specifický membránový antigen (PSMA) nacházející se na bu kách rakoviny prostaty (Israeli et al., 1993), molekula HER2/*neu* [receptor pro lidský epidermální r stový faktor vyskytující se ve zvýšené mí e na bu kách rakoviny prsu (Yarden, 2001)], i EGFR [receptor pro epidermální r stový faktor (Walker a Dearing, 1999; Hirsch et al., 2003; Colquhoun a Mellon, 2002)].

Pro sm rování a p esm rování virových ástic bylo dodnes využito n kolika p ístup modifikace virové kapsidy. P i sm rování dojde k využívání nových bun ných receptor pro vstup viru, ale virus má stále zachován i p vodní tropismus, zatímco p esm rování docílí nejen zm ny vstupního receptoru, ale i zrušení vazby na receptor p vodní. Ráda bych zde jak jednotlivé p ístupy, tak i n které konkrétní pokusy o p esm rování vir rozvedla podrobn ji, nebo na nich lze ukázat možnosti a omezení virového sm rování.

#### 3.1 P esm rování virových ástic pseudotypováním

Pseudotypování je metoda nahrazení virových protein pro p ichycení viru k bu ce proteiny p íbuzného viru. U obalených vir jde o nahrazení t chto protein v lipidové dvojvrstvě, zatímco u neobalených je nahrazen kapsidový protein jednoho viru kapsidovým proteinem jiného sérotypu téhož viru i jiného viru. Tento p ístup tedy m že vést k unikátnímu tropismu pseudotypovaného viru.

Adenoviry (Ad) jsou jedny z nejdéle studovaných a nejvíce užívaných vektorů pro genovou terapii, a proto existuje mnoho publikovaných dat o různých formách jejich přenosu, včetně pseudotypování. Jak již bylo zmíněno, za vazbu na receptor je zodpovědná trimerní proteinová struktura (nacházející se na vláknitém výběžku kapsidy) nazývaná knoflík. Nejlépe studovaný sérotyp 5 adenoviru (Ad-5) rozpoznává buňky nesoucí CAR (receptor coxsackie viru a adenoviru) (Bergelson et al., 1997). Pro přenos na buňky, které nenesou CAR je možno využít i pseudotypování, přičemž je dobře prozkoumaný genom Ad-5 obalen kapsidovými proteiny nesoucími knoflíky jiného Ad sérotypu například jiného viru. Mercier et al., 2004 zvolili pro přenos strukturní protein zcela nepříbuzného viru, reoviru (neobalený virus s dvojitým RNA genomem). Vytvořili adenovirus, který na svém povrchu vystavuje trimerní reovirový vnější kapsidový protein  $\sigma 1$ , jenž je strukturně podobný adenovirovému knoflíku. Tento protein umožnil transdukcí dendritických buněk skrze adhezní molekulu tsných spoj 1 (JAM1, z angl. junctional adhesion molecule 1), která je receptorem reoviru (Barton et al., 2001).

Murakami et al. (2010) se snažili zacílit adenovirové vektory na prostatické nádorové buňky, na kterých se ale neprojevuje receptor adenoviru sérotypu 5, CAR, příliš nevyskytuje (Okegawa et al., 2000). Zaměřili tedy vláknitou strukturu adenoviru sérotypu 5 za vláknitou strukturu jiných sérotypů příslušejících druhu B adenoviru, které se na rozdíl od ostatních druhů neváží na CAR (Roelvink et al., 1998). Potvrdili, že vytvořené vektory vstupují do buněk cestou, která je nezávislá na CAR a dále ukázali, že vektor s vláknitou strukturou adenoviru druhu B sérotypu 3 velmi dobře vstupuje do nádorových buněk prostaty, nejspíše díky interakci s receptorem CD46 (diferenciální skupina 46 fungující jako regulační protein komplementu), který je receptorem B druhu adenoviru (Sirena et al., 2004; Fleischli et al., 2007) a je nadměrně exprimován na nádorových buňkách (Hara et al., 1992; Thorsteinsson et al., 1998; Kinugasa et al., 1999; Murray et al., 2000). Zároveň však tento vektor transdukoval i normální buňky prostaty (primární prostatické epiteliální buňky) a kolipřibližně 13krát méně než buňky nádorové. Vytvořený vektor má tedy vysokou selektivitu pro buňky prostaty, avšak pro zajištění specificity pouze na nádorové buňky prostaty by ještě bylo třeba provést další modifikace.

Pro genovou terapii se také často využívají vektory odvozené od adeno-asociovaných virů (AAV). AAV jsou malé neobalené viry nesoucí jednovláknovou DNA. Lze je jednoduše manipulovat pro přenos heterologních genů a experimentálně využívat pro léčbu monogenních genetických chorob. Jednou z takových chorob je cystická fibróza. Jedná se o vážnou poruchu zapříčiněnou nefunkčním transmembránovým regulátorem vodivosti (CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), která se projevuje chronickým onemocněním dýchacích cest (Ratjen a Döring, 2003). Možnost její léčby genovou terapií v postnatálním věku je obtížná, Keswani et al. (2012) se pokoušeli zjistit, jestli postižené špatně dostupné tkáně nejsou lépe přístupnější *in utero* (v děloze). Pro pokus použili adeno-asociovaný virus sérotypu 2 (AAV-2) a zjistili, zda jeho pseudotypováním



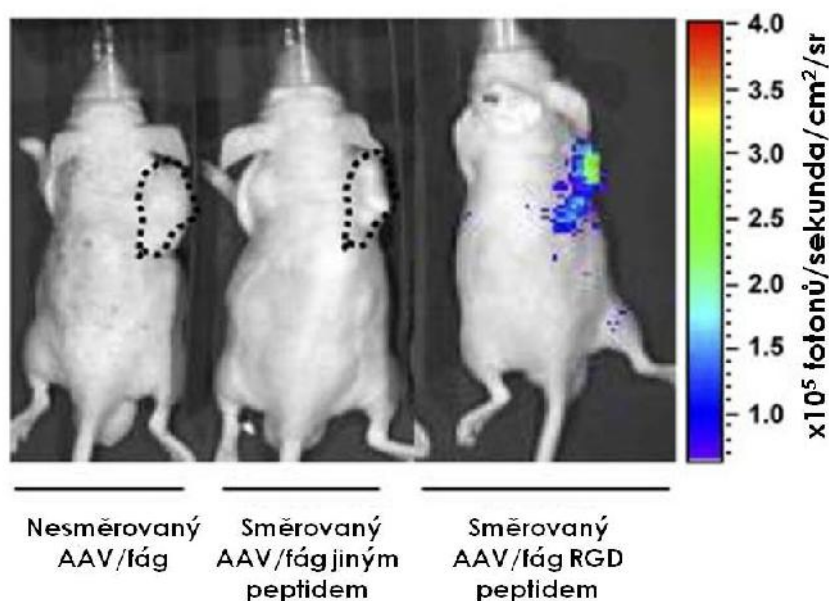
jinými sérotypy, proti nimž se v lidské populaci nevyskytuje tolik protilátek jako proti AAV-2 (Boutin et al., 2010), dosáhnou vyšší účinnosti transdukce těchto tkání na modelu myši se štěpem lidské fetální i dospělé prdušnice. Nejlépe byly prdušnice transdukovala chiméra AAV2/8 (genom AAV-2 obalený kapsidovými proteiny AAV-8) a nepseudotypovaný AAV-2. Po jednom měsíci od aplikace  $10^{11}$  virových částic bylo transdukováno zhruba 91% buněk respiračního epitelu a 54 % submukózních buněk žláz sérotypem AAV2/8 a 93 % buněk respiračního epitelu a 37 % submukózních žláznatých buněk v případě AAV-2. Po těchto měsících od aplikace se transdukce obou typů buněk obma typy AAV zvýšila na 99 % [účinnost transdukce byla určena jako procento pozitivně zbarvených buněk expresí LacZ (gen pro bakteriální  $\beta$ -galaktosidázu)]. Podobné výsledky úspěšného přenosu genů poskytovaly i lentivirové vektory pseudotypované obalovými glykoproteiny viru vezikulární stomatitidy (Lim et al., 2003) a další AAV vektory (Lim et al., 2002), zdá se tedy, že fetální prdušnice by mohla být snadno přístupná jakékoli smrovačí strategií. Jako důvod pro tuto domněnku uvádí Keswani et al. (2012) sníženou fyzickou bariéru, imunologicky tolerantní prostředí, snazší přístup k vyvíjejícím se submukózním žlázám a možnost transdukovat kmenové bučky respiračního epitelu. Selektivita pro transdukcí fetální prdušnice byla ověna porovnáním s transdukcí prdušnice dospělého jedince, která byla významně nižší.

Použití chimérického AAV2/5 sérotypu (genom AAV-2 obalený kapsidovými proteiny AAV-5) namísto běžného AAV-2 sérotypu umožnilo snížit účinnou dávku částic pro transdukcí slinné žlázy v myším modelu (Geguchadze et al., 2012). Po doručení genu byla jeho exprese stabilní po dobu 8 týdnů. Navíc nižší dávka snížila toxicitu vektoru pro organismus a zmírnila efekt na normální funkci slinné žlázy.

### **3.2 Přesměrování virových částic spojením prvků prokaryotických a eukaryotických vektorů**

Nevýhodou používání vektorů odvozených od virů infikujících eukaryotické bučky je zpravidla jejich široký tropismus, který brání specifickému směrování. Na rozdíl od eukaryotických vektorů, prokaryotické virové vektory infikují savi bučky s nízkou účinností, je však možné je směrovat vložением epitopu, rozeznávajících určitý ligand do virové kapsidy. Hajitou et al. (2006) zavedením AAV kapsidy do jednovláknového genomu bakteriofága a RGD (Arginin-Glycin-Aspartát) motivu, rozpoznávajícího  $\alpha_v$  integrin [nadměrně exprimovaný protein v krevním řečišti nádoru (Arap et al., 1998; Hood et al., 2002)] do kapsidy fága (AAV/fág) přesměrovali tento vektor *in vivo* na nádorové bučky. Imunobarvením, pozitronovou emisní tomografií a zobrazováním bioluminiscence studovali na myších nosičích štěpů lidských nádorových tkání expresi reportérových genů doručovaných vektorem. Genová exprese byla specifická pro bučky nádoru nosičích integrin  $\alpha_v$ , kontrolní vektor bez RGD motivu nebyl schopen nádorové bučky transdukovat (Obr. 4). Zdravé orgány nebyly vektorem transdukovány. Po vložení cytotoxického genu do zkonstruovaného vektoru

se podařilo docílit zmenšování nádoru. Vytvořený vektor by se mohl stát dobrým cíleným nástrojem doručení požadovaných genů, ale i pro zobrazování rozložení konkrétních molekul v těle.



**Obr. 4:** Molekulární zobrazování myši nesoucí nádor zprostředkované směřovaným chimerním virem AAV/fág

*In vivo* zobrazení bioluminescence exprese luciferázy po systémovém doručení AAV/fág. Nahé myši nesoucí štěp nádoru odvozeného od DU-145 obdržely jednu intravenózní dávku AAV/fág směřovaného RGD peptidem nebo kontrol (nesměřovaného AAV/fág i AAV/fág směřovaného jiným peptidem). Upraveno podle Hajitou et al. (2006).

### 3.3 Přesměrování virových částic směřujícím ligandem

#### 3.3.1 Adaptorová strategie

Jednou z možností jak připojit na virus specifický ligand, je vytvořit bispecifický molekulární adaptor. Ten na jedné straně váže virovou kapsidu a na druhé obsahuje nebo váže ligand pro receptor, na který chceme virus cílit.

Adaptorová strategie je opět často využívána u adenovirů. Pomocí vysoké účinnosti a specifity doručení genu do dendritických buněk bylo dosaženo nekovalentním připojením adaptorové molekuly, která přemostila adenovirový vektor sérotypu 5 (Ad5) a povrchový receptor dendritických buněk CD40 (diferenční skupina 40) (Pereboev et al., 2004). Adaptorová molekula se skládala z povrchové domény CAR (receptoru adenovirů a coxsackievirů) a CD40L (ligandu pro receptor CD40 dendritických buněk) spojených trimerizační molekulou. Aplikací tohoto vektoru *in vitro* na myšičí dendritické buňky kostní dřeně dosáhli transdukce 70% těchto buněk, přičemž k transdukci nesměřovanými Ad5 vektory docházelo jen v 1% buněk. Účinnost přenosu genu do dendritických buněk byla dokonce o 4 řády vyšší než účinnost přenosu necílenými Ad5. Kromě

samotné transdukce se aplikací vektoru nesoucího CD40L interagujícího s CD40 receptorem podařilo dosáhnout maturace a aktivace dendritických buněk a antigenně specifické imunitní reakce *in vivo*.

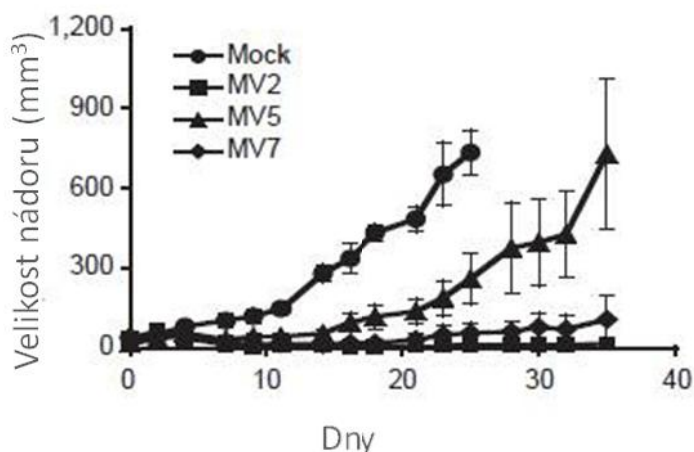
### 3.3.1.1 Systém založený na vazbě avidin-biotin

Existují pokusy o přesměrování virů, které využívají vysoké afinity vazby avidin-biotin. Adenoviry byly přesměrovány na buňky zhoubných gliomů, které však obsahují velmi málo či žádné přirozené adenovirové receptory CAR (Kim et al., 2003). K HVR5 smyčce kapsidového proteinu adenoviru byl geneticky připojen akceptorový pepitid pro biotin (BAP), který je biotinylován během produkce viru v buňkách (Chen et al., 2013). Skrze tento biotin byl následně přes nekovalentní vazbu avidinu připojen biotinylovaný aptamer. Aptamery jsou malé, vysoce strukturované a stabilní jednovláknové oligonukleotidy, které se dokáží s vysokou afinitou vázat na cílové molekuly (shrnutí Cerchia et al., 2002). Účinnost transdukce gliomových buněk adenoviry s asociovanými aptamery specifickými pro nádorové buňky při multiplicitě infekce 0,5 byla 4,1 – 5,2 krát vyšší než transdukce Ad s kontrolním aptamerem, zatímco transdukce nenádorových buněk probíhala se stejnou účinností pro vytvoření i kontrolní Ad vektor. Transdukce byla tedy vysoce selektivní pro nádorové buňky.

### 3.3.1.2 Systém založený na monoklonální protilátce

Pro přesměrování virů je možné připojit k viru specifickou protilátku, jako tomu bylo v případě přesměrování adenoviru na buňky spinocelulárního karcinomu hlavy a krku (Figures et al., 2009). Fragment vážící antigen (Fab, z angl. fragment antigen-binding) protilátky proti adenovirovému knoflíku byl konjugován s FGF2 (fibroblastovým růstovým faktorem 2), jehož receptor (receptor pro fibroblastový růstový faktor, FGFR) se v nadměrné míře vyskytuje na nádorových a kapilárních endoteliálních buňkách spinocelulárního karcinomu hlavy a krku (Dellacono et al., 1997). Adenoviry konjugované s FGF2-Fab vykazovaly 4krát vyšší transdukci buněk, které exprimovaly vysoké množství FGFR a nízké množství CAR, oproti necíleným adenovirovým částicím.

Velmi úspěšného přesměrování *in vitro* i *in vivo* tentokrát obaleného viru – viru spalničky, bylo docíleno genetickou fúzí jednotlivých protilátek proti CD38 (diferenční skupina 38), EGFR (receptor pro epidermální růstový faktor) a EGFRvIII (EGFR mutanta vIII postrádající velkou část extracelulární domény), které jsou selektivními nádorovými markery (Nakamura et al., 2005). Virus měl úplně odstraněný přirozený tropismus a přitom zůstal zmenšování nádoru svojí protinádorovou aktivitou na modelu myši se šesti různými lidskými nádory (Obr. 5). Myši přežily dvojnásobně déle a zbylé nádory byly silně fluorescenční, tedy infikované vytvořenými viry. Potomstvo těchto virů vykazovalo shodné vlastnosti s jejich rodiči, nedocházelo tedy k obnově přirozeného tropismu.



**Obr. . 5: Specifická receptorem zprostředkovaná onkolytická aktivita viru po vnesení do nádoru**

Graf ukazuje rostoucí velikosti podkožního nádoru SKOV3ip.1. Velikost nádoru (mm<sup>3</sup>) v den 0: Mock: 31 ± 15; MV2: 36 ± 16; MV5: 16 ± 9; MV7: 41 ± 11. MV2 – kontrolní virus spalnice bez jedné z obojích protilátek, MV5 – virus spalnice nesoucí jedinou z obojích protilátek proti CD38, MV7 – virus spalnice nesoucí jedinou z obojích protilátek proti EGFR. Upraveno podle Nakamura et al. (2005).

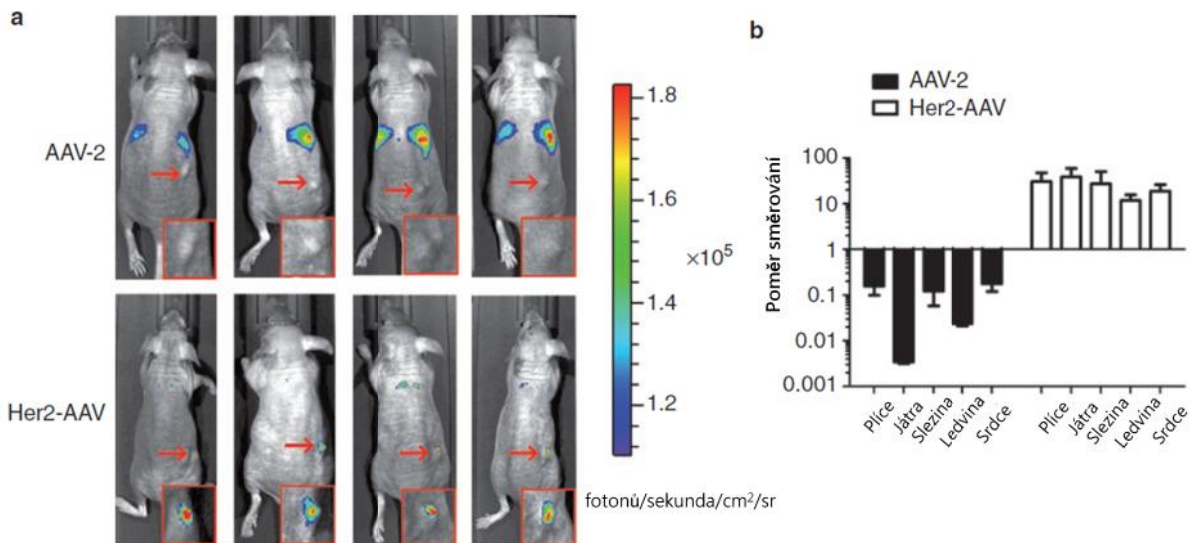
### 3.3.1.3 Systém založený na alternativních molekulách vázících antigen

Nový přístup pro přesměrování virových částic využívá uměle vytvořených chemických molekul, které se vyznačují velmi vysokou specificitou a afinitou pro cílové proteiny a mohou tedy svojí funkcí nahradit protilátky. Mezi tyto molekuly patří například afibody, DARPiny, afiliny, antikaliny, avimery, tetranektiny, Kunitz domény, thioredoxin i cystin-knot motiv (shrnul Skerra, 2007). Pro přesměrování virů jsou z těchto molekul nejčastěji užívány DARPiny (z angl. designed ankyrin repeat protein), molekuly odvozené od proteinů s opakujícím se ankyrinovým motivem. Na rozdíl od protilátek mají malou velikost, nízkou tendenci k agregaci, nevlastní efektorové domény a postrádají cysteinové zbytky (což dovoluje zavést thiolové skupiny pro vazbu jiných molekul, aniž by tím byla narušena jejich struktura) (shrnuli Stumpp et al., 2008). Existuje rozsáhlá knihovna DARPinů, z níž lze selektovat požadované molekuly (Binz et al., 2004).

Munch et al. (2013) se snažili zacílit vektory odvozené od adeno-asociovaných virů (AAV) nesoucích sebevražedný gen na nádorovou tkáň. Fúzovali proto DARPin vázající HER2/*neu* (povrchový protein některých rakovinných buněk) s VP2 proteinem (virový strukturální protein 2) adeno-asociovaných virů s deletovaným vazebným místem pro povodní AAV receptor. Účinnost transdukce buněk přímo korelovala se vzrůstající hustotou HER2/*neu* receptorů.

Slabinou vektorů založených na AAV může být skutečnost, že AAV mají tendenci akumulovat se v játrech, čímž snižují transdukci jiných cílových tkání (Gao et al., 2004). Aby se Munch et al. (2013) přesvědčili o účinnosti dopravení vektoru *in vivo*, intravenózně aplikovali AAV-2 s geneticky připojeným DARPinem pro HER2/*neu* (Her2-AAV), mutovaných na pozicích interagujících s povodním receptorem HSPG, a částice divokého sérotypu 2 AAV (AAV-2) do myši s podkožním SK-OV-3 nádorem (Obr. . 6a). Na rozdíl od myši s injektovaným AAV-2, které způsobily silný luciferázový signál v jaterní oblasti, byl u myši s Her2-AAV dobře patrný signál

v oblasti nádoru, což ukazuje na dobrou specificitu připravených vektorů. Objevil se u nich ale také slabý signál v hrudní oblasti (Obr. 6a). Ukázali, že tento signál byl způsoben defektními částicemi viru v roztoku, které postrádaly protein VP2 s fúzovaným DARPinem. Nádorová tkáň obsahovala 10ti až 100násobně více kopií Her2-AAV genomu v porovnání s tkání ze zdravých orgánů (Obr. 6b). Spočítali, že po jedné dávce Her2-AAV  $17,64 \pm 3,75 \%$  všech nádorových buněk SK-OV-3 vykazovalo luciferázový signál.

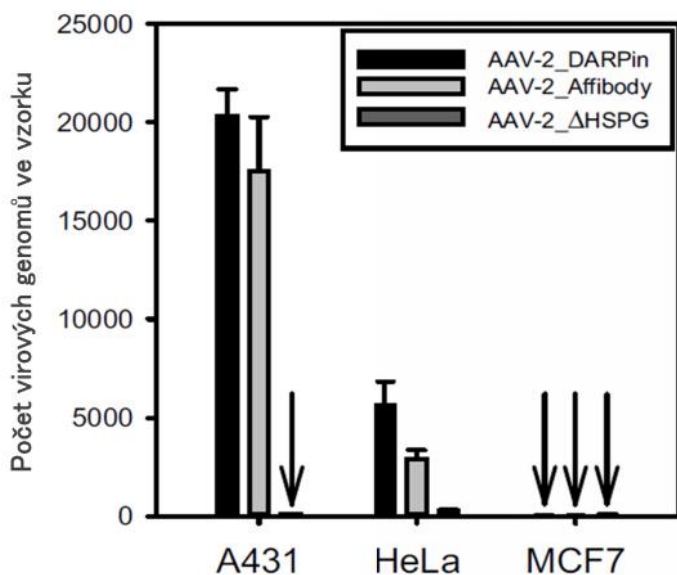


**Obr. 6: Cílení Her2-AAV na nádorové buňky nesoucí HER2/neu in vivo**

(a) *In vivo* zobrazení nahých myší nesoucích podkožní rostoucí tumor odvozený od SK-OV-3 (šipka). Data byla monitorována jeden týden po intravenózní injekci  $2 \times 10^{10}$  kopií genomu AAV-2 nebo Her2-AAV nesoucích luciferázovou expresní kazetu. červené tverce ukazují zvidněná místa injekce nádorových buněk. (b) Biodistribuce AAV částic. Bezprostředně po zobrazení byly myši usmrceny, uvedené orgány byly izolovány a počet kopií genomu vektoru (luc-2 gen) byl kvantifikován pomocí kvantitativní PCR. Směrovací koeficient byl vyjádřen normalizováním počtu kopií v nádorové tkáni vůči počtu kopií v uvedeném orgánu. Upraveno podle Munch et al. (2013).

Obdobou předchozího experimentu je pokus o standardizované příměrování AAV vektorů a zajištění jistoty připravených virů, aby nemohlo docházet k jejich nespecifickému vstupu (Hagen et al., 2014). Tentokrát byly použity DARPiny a afibody [antigen specifické molekuly odvozené ze stabilní konformace Z domény proteinu A bakterie *Staphylococcus aureus* (Eklund et al., 2002)], které s vysokou afinitou váží nádorový marker EGFR (receptor pro epidermální růstový faktor). Aby se předešlo výskytu nemodifikovaných virových částic v roztoku, byla inkorporována histidinová značka do povrchových smyček viru pro snadnou purifikaci. Vektor byl konstruován tak, aby bylo možné všechny prvky, a už příměrovací, purifikaci i cytotoxické, snadno vyměnit. AAV-2 s deletovaným vazebným místem pro HSPG (přirozený receptor), sfúzované s DARPiny nebo afibody

transdukovaly buňky A431 [obsahují  $3 \times 10^6$  molekul EGFR (Xu et al., 1984)] až 700krát a HeLa buňky [obsahují  $2 \times 10^5$  molekul EGFR (Xu et al., 1984)] až 200krát více než buňky MCF7 [obsahují jen  $10^4$  molekul EGFR (Xu et al., 1984)] které byly celkově jen velmi málo transdukovány (Obr. 7). Po 4-denním působení AAV-2 fúzovaných s afibody, nesoucích cytosin deaminázu v kombinaci s 500 mM 5-fluorocytosinem [cytosin deamináza v rakovinných buňkách působí 5-fluorocytosin na toxický 5-fluorouracil, jehož zabudování do nukleových kyselin vede ke smrti buňky (Nishiyama et al., 1985)], došlo k usmrcení 80 % cílových A431 i HeLa buněk. Avšak po odečtení 20-ti procent buněk, které byly usmrceny aplikací AAV-2 bez afibody, získáme účinnost 60 %, která není dostatečně vysoká k tomu, aby dokázala eliminovat veškeré nádorové buňky v této klinické aplikaci. Testování bylo také prováděno *in vitro* ve směsné kultuře všech typů výše uvedených buněk, kdy byla potvrzena specificita pro A431 buňky.

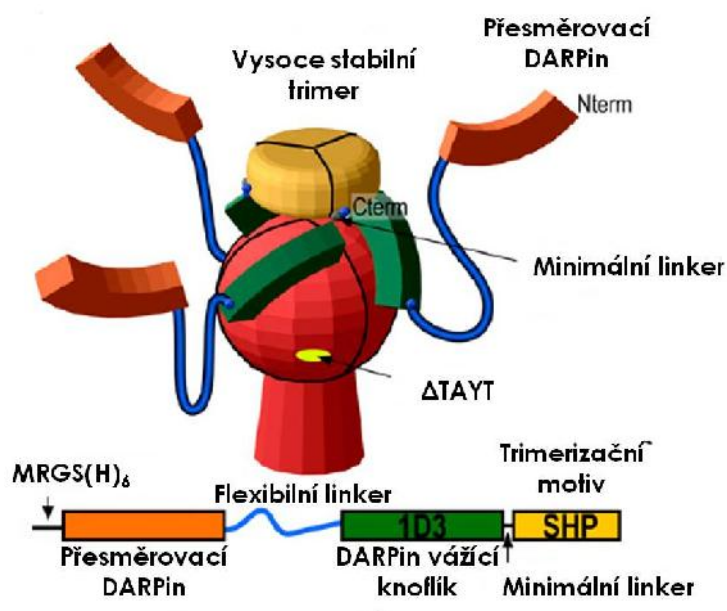


**Obr. 7: Specificita infekce modifikovaných částic AAV-2 pro různé buněčné typy**

$10^4$  A431, HeLa i MCF7 buněk bylo inkubováno s  $3 \times 10^8$  virovými částicemi (počet částic stanoven pomocí počtu genomů) po dobu 24 hodin. Následně byly buňky sklizeny, štěpeny proteinázou K a inkubovány s S1 nukleázou. Dvojvláknová virová DNA byla poté kvantifikována pomocí kvantitativní PCR. Upraveno podle (Hagen et al., 2014).

Na rozdíl od výše zmíněných prací Dreier et al. (2013) využili negenetickou inkorporaci DARPin pro cílení adenoviru na buňky bez nutnosti produkovat nové viry při cílení na nový receptor. Byl vyvinut nástavec (Obr. 8) sestávající z DARPin specificky vázajících knoflíků na jících z adenovirové kapsidy, které jsou drženy pohromadě trimerní svorkou vytvořenou kapsidovým proteinem SHP z lamoidního fága 21 o výjimečné kinetické stabilitě. Z krystalografické struktury bylo predikováno, že vazba DARPinu by měla navíc interferovat s vazbou přirozeného receptoru adenoviru na knoflík. Nástavec nese další DARPiny, které váží specifické buněčné markery, pro pokus byly zvoleny některé markery nádorové tkáně: receptor pro lidský epidermální růstový faktor 2 (HER2/*neu*), epiteliální buněčná adhezní molekula (EpCAM) a receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR). Celý nástavec tedy spojuje adenovirus s receptorem pouze nekovalentní vazbou.

Dreier et al. (2013) ale ukázali, že tato nekovalentní interakce nástavce s virovými knoflíky je velmi silná a disociuje až po více než 10ti dnech *in vitro*, přesto v prostředí *in vivo* by mohlo dojít ke kompetici interakce například komponentami séra (Khare et al., 2011). Účinnost transdukce buněk obsahujících nadměrně exprimované nádorové markery adenovirem s DARPiny specifickými pro tyto markery byla 293 krát vyšší než transdukce virem s připojeným „slepým“ nástavcem (kontrolní DARPin) pro HER2/*neu*, 200 krát vyšší pro EGFR a 18 krát vyšší pro EpCAM. Tyto virové částice netransdukovaly linii neobsahující EGFR. Kompetice solubilními DARPiny vedla k výraznému snížení účinnosti transdukce, zatímco kompetice kontrolním DARPinem neměla na účinnost transdukce vliv. Transdukce buněk pomocí receptoru EpCAM je na rozdíl od ostatních dosti nízká (pouze 18-ti násobné zvýšení), účinnost transdukce tedy zejména závisí zejména na afinitě a specifitě vybraného DARPinu.



**Obr. 8: Konstrukce trimerního nástavce založeného na krystalové struktuře komplexu DARPin-knoflík**

Schematická reprezentace adaptorového komplexu. Přesměrovací DARPiny (oranžové) jsou fúzovány skrze dlouhý flexibilní nástavec (modrý) k N konci domény DARPinu vázící knoflík (zelená). DARPin vázící knoflík je fúzován naopak krátkým minimálním linkerem (modrý puntík) k trimerizačnímu modulu (žlutý) což je SHP protein lamdoidního fága 21. Knoflík a vláknitý výčnělek jsou znázorněny červeně. Pod modelem je ukázáno schéma genu. Upraveno podle Dreier et al. (2013).

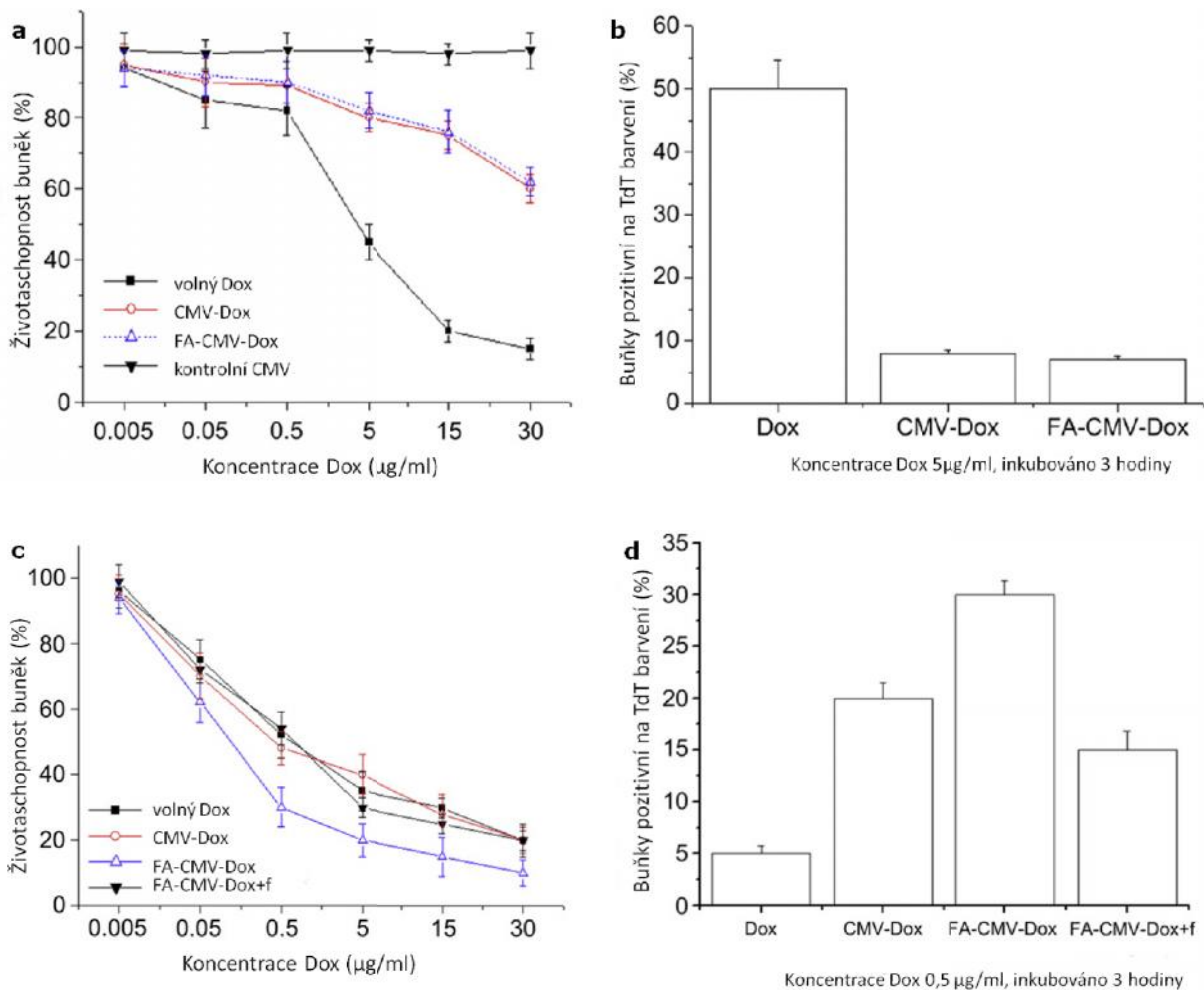
### 3.3.2 Chemická konjugace ligandu

Rostlinné viry jsou v současné době hojně využívány pro doručení látek do savčích buněk. Jsou totiž bezpečnější než savčí viry, netoxické, strukturně jednotné, biodegradovatelné, snadno produkovatelné a také snadno modifikovatelné (shrnutí Lico et al., 2013). Jako prostředek pro dopravu doxorubicinu (protinádorového léku, Dox) byl použit virus mozaiky okurky (CMV, z angl. cucumber mosaic virus) konjugovaný s kyselinou listovou (FA, z angl. folic acid), která je ligandem folátového receptoru nadměrně exprimovaného na povrchu nádorových buněk vaječníku (Weitman et al., 1992; Zeng et al., 2013). Doxorubicin (Dox) je antracyklinové antibiotikum účinné proti mnoha druhům nádorů, je však těžko rozpustné a ve vysokých koncentracích má nežádoucí účinky na zdravou tkáň, zejména srdeční (shrnutí Minotti et al., 2004). Z tohoto důvodu byl zabalen do virových částic CMV (CMV-Dox), jenž disponuje RNA genomem, do něhož se doxorubicin interkaluje, aby nemohl

nespecificky pronikat do nežádoucích bun k. Doxorubicin je po pr níku viru do bu ky uvoln n p ítomností zvýšené koncentrace RNáz, které otvorem v kapsid viru penetrují dovnit , degradují RNA genom CMV, tím rozruší nekovalentní interakce mezi RNA genomem CMV a doxorubicinem a ten je uvoln n z kapsidy. Nádorové bu ky vaje ník mají navíc vyšší RNázovou aktivitu než jiné bu ky (Schleich et al., 1987). Selektivnímu vstupu CMV-Dox pomáhá také tzv. EPR efekt (efekt zvýšené propustnosti a zadržení; z angl. enhanced permeability and retention effect), kdy dochází k selektivní akumulaci a dlouhodob jšímu (5 dní) zadržování biomakromolekul (nap íklad virových nano ástic) v pevných nádorech, zatímco nízkomolekulární látky zadržovány nejsou a vracejí se do ob hu (Maeda et al., 2000).

Aplikace FA-CMV-Dox byla pro nádorové bu ky vaje ník dlouhodob jší a více cytotoxická než ostatní formy (Obr. . 9cd). Patrná byla až 3 krát vyšší internalizace doxorubicinu u FA-CMV-Dox než z CMV-Dox v rakovinných bu kách vaje níku. FA-CMV-Dox dále vykazoval kompetici kyselinou listovou, což potvrdilo endocytosu zprost edkovanou listovou kyselinou. Po 21 dnech lé by myší se št pem nádorové tkán a srdce doxorubicinem (5 mg Dox/kg každých 5 dní) vykazovalo 66 % myší lé ených volným doxorubicinem vážné poruchy t lesných funkcí, žádná z myší lé ených FA-CMV-Dox i CMV-Dox tyto poruchy nem la a 95 % myší lé ených formami CMV m la mén apoptotickou morfologii kardiocyt než myší lé ené volným Dox. *In vitro* byla zaznamenána o 40 % nižší míra apoptózy kardiocyt zap í in ných ošet ením FA-CMV-Dox (pouze 7 % apoptotických kardiocyt ) než pro volný doxorubicin (Obr. . 9ab) (Zeng et al., 2013).





**Obr. . 9: Cytotoxicita doxorubicinu (Dox).**

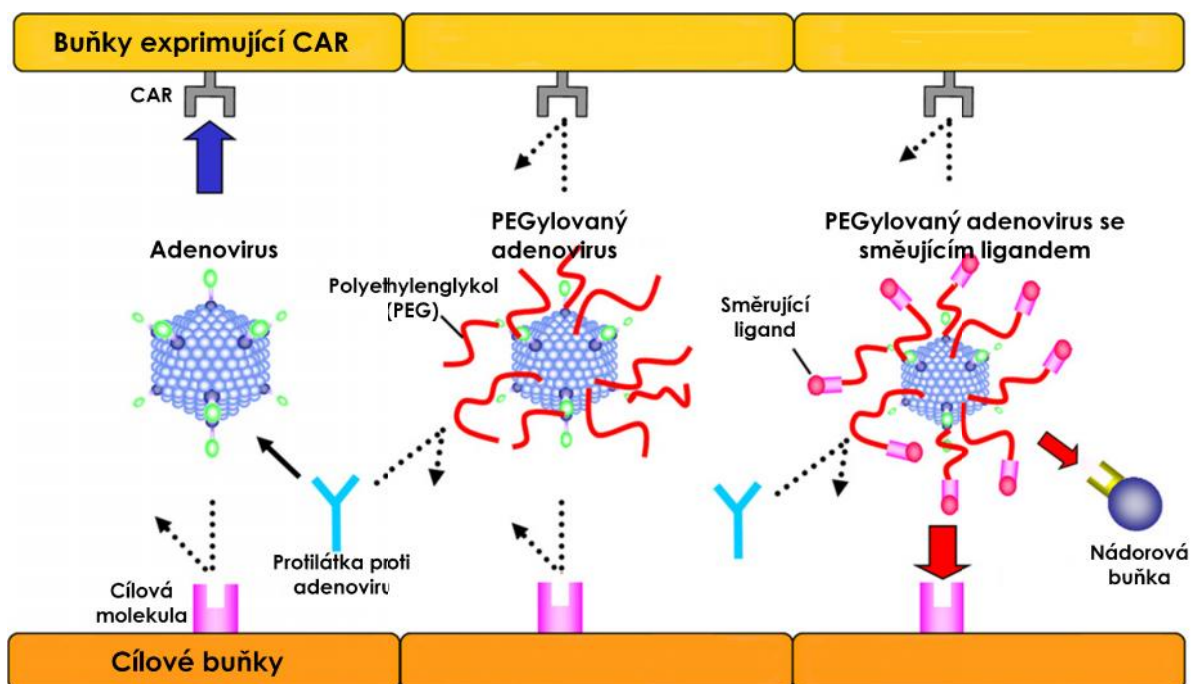
(a) Cytotoxicita doxorubicinu v různých formách při stejné koncentraci na primárních myších kardiomyocytech (MTT test - kolorimetrické stanovení životaschopnosti buněk). (b) Procento apoptotických kardiomyocytů ošetřených 5  $\mu\text{g/ml}$  Dox v různých formách [TUNEL test - znanění koncenzních fragmentací pomocí dUTP předaného terminální deoxynukleotidyl transferázou (TdT)]. (c) Cytotoxicita doxorubicinu v různých podobách při stejné koncentraci na nádorových buňkách OVCAR-3 (MTT test). (d) Procento apoptotických kardiomyocytů ošetřených 0,5  $\mu\text{g/ml}$  Dox v různých formách (TUNEL test); + f značí kompetici kyselinou listovou. Upraveno podle Zeng et al. (2013).

Dalším rostlinným virem používaným pro dopravu látek je virus mozaiky vigny (CPMV, z angl. cowpea mosaic virus). Tento neobalený virus v savčích buňkách interaguje s vimentinem, proteinem, který se vyskytuje na povrchu endoteliálních buněk a na kterých typech nádorových buněk (Koudelka et al., 2009), například v buňkách HeLa. Exprese vimentinu na těchto buňkách však není příliš vysoká, je zvýšená pouze před mitózou buněk, což snižuje účinnost internalizace CPMV (Steinmetz et al., 2011). Pro zvýšení internalizace nanočástic do buňky se používají peptidy penetrující do buňky (CPP; z angl. cell penetrating peptides) (shrnutí Farkhani et al., 2014). Toho využili při úpravě VLPs (viru podobných částic) odvozených od viru CPMV Wu et al. (2012). Připojením polyargininového (R5) CPP peptidu přes hydrazonový linker (CPMV-R5) dosáhli toho, že tyto částice byly do buněk internalizovány 8krát účinněji než samotné CPMV, které byly internalizovány jen do

10ti % všech bun k. To naznačuje, že CPMV-R5 používají pro vstup do HeLa bun k jiné povrchové molekuly než vimentin. Dále bylo zjištěno, že CPMV-R5 vstupují do bun k energeticky závislým mechanismem, byly lokalizovány v endolysosomálním kompartmentu, ze kterého však zřejmě vystupovaly do cytoplazmy i jiného typu vák, na rozdíl od nemodifikovaných CPMV. Znalost, kam částice v buce doputují, může být důležitá pro dopravu látek, neboť některé látky jsou nejvíce účinné pouze ve specifických buněčných kompartmentech. Například doxorubicin je výhodné pro maximální účinnost dopravit přímo do jádra, kde je interkalován do DNA, čímž inhibuje syntézu makromolekul. Mezi další účinky doxorubicinu patří tvorba radikál způsobujících poškození DNA a peroxidace lipidů, alkylace a zesíťování DNA. Interkalace doxorubicinu také brání rozvolnění DNA, separaci vláken a helikázové aktivit a inhibuje topoizomerázu II, čímž iniciuje poškození DNA a vyvolává apoptózu (shrnutí Gewirtz, 1999).

### 3.3.3 Chemická konjugace v kombinaci s polyethylenglykolem

Závažným problémem aplikace virových částic do organismu je jejich vysoká imunogenita, která způsobuje snížení cirkulační doby částic v těle a ovlivňuje jejich biodistribuci (Alemany et al., 2000). Polyethylenglykol (PEG) je proto prakticky inertní látka, kterou je možné kovalentně asociovat například s proteiny (PEGylace), čímž prodlužuje přetrvání těchto látek v oběhu, brání jejich degradaci a snižuje interakce mezi proteiny (shrnutí Harris a Chess, 2003). PEGylace adenovirových vektorů (Obr. 10) pomáhá prodloužit dobu jejich setrvání v krevním řečišti (Alemany et al., 2000), čímž získají dostatek času pro přesun k cílové tkáni, a dále bránit jejich hromadění v játrech. Navíc výrazně snižuje imunitní odpověď na tyto vektory (Mok et al., 2005), může však *in vitro* snižovat účinnost vazby a internalizace cílovou buňkou, proto se využívá například spojení molekul (zejména peptidů), které specificky směřují vektor na konkrétní buňky (Obr. 10).



Obr. . 10: Vlastnosti PEGylovaných adenovir . Upraveno podle Eto et al. (2008).

Nádorová angiogeneze je zásadní pro r st metastází nádoru (Carmeliet a Jain, 2000). Sm ruující peptid CGKRRK vybraný z fágové knihovny peptid jako peptid sm ruující na cévní systém nádoru (Hoffman et al., 2003), byl p iipojen ke konci PEG et zce konjugovaného s adenovirem (Ad-PEG<sub>CGKRRK</sub>), ímž došlo k zacílení adenovirového vektoru jak na nádorovou tká , tak i bu ky krevního e íšt nádoru (Yao et al., 2011). Ú innost transdukce nádorové tkán vytvo eným vektorem byla 480krát vyšší než transdukce vyvolaná Ad a 110krát vyšší oproti Ad-PEG. Transdukce jaterní tkán typická pro adenoviry byla u Ad-PEG<sub>CGKRRK</sub> 370krát nižší než u Ad, avšak stále nebyla zanedbatelná. Expresse sebevražedného genu doru eného vektorem Ad-PEG<sub>CGKRRK</sub> vyvolala zmenšení nádor a inhibici r stu nových cév v nádoru.

Cílení adenovirových vektor na bu ky rakoviny prsu bylo dosaženo konjugací PEGylovaného adenoviru s Herceptinem (Ad-PEG-HER) (Jung et al., 2007). Herceptin je monoklonální protilátka proti HER2/*neu* (receptor lidského epidermálního r stového faktoru 2), který je na bu kách rakoviny prsu nadm rn exprimován. Vektor Ad-PEG-HER transdukoval 64 a 45 % dvou typ bun k nádoru prsu nesoucích HER2/*neu* vzaženo k samotnému adenoviru (100 %), což je o poznání více než míra transdukce Ad-PEG (10 a 20 %). Bu ky nádoru mozku neobsahující HER2/*neu* byly transdukovány Ad-PEG-HER pouze ze 6 – 7 %. P ítomnost PEG navíc redukovala p iirozenou imunitní odpov . Výsledek byl pozd ji potvrzen *in vivo* (Kim et al., 2011). Je patrné, že p iipojení sm rovací protilátky k PEGylovanému adenoviru zvýšilo transdukci bun k oproti PEGylovaným adenovir m bez sm rovací molekuly, ú innost transdukce se však nevyrovnala nemodifikovaným Ad. Vzniklé vektory jsou tedy z ejm selektivní pro nádorové bu ky pozitivní na HER2/*neu*, ale nejsou p íliš ú inné.

### 3.3.4 Chemicko-genetická modifikace kapsidy

Pro přesměrování viru lze využít připojení celých proteinů na virovou částici, které navedou virus na specifický protilačný receptor a zároveň svou velikostí napomohou ke zrušení povodního tropismu. Příkladem geneticko-chemické modifikace Corjon et al. (2008) vytvořili adenovirový vektor, který nese v kapsidovém proteinu pIX cysteinovou skupinu, přes kterou vektor kovalentně spojili s vysoce afinními ligandy – s proteinem asociovaným s receptory (RAP) a transferinem (Tf). Nezvykle nebylo pro přesměrování použito knoflíku adenoviru, nýbrž kapsidového proteinu IX (pIX) adenoviru, který se na rozdíl od vlákná adenoviru neúčastní interakce s receptorem a je pouze strukturálním proteinem kapsidy. Vektor nesoucí RAP byl schopen *in vivo* specificky vstoupit do hepatocytů a proniknout až do jádra, což je v rozporu s tvrzením Campose a Barryho (2006), že cílené přesměrované transdukce je možné dosáhnout jedině připojením ligandu na vlákno adenoviru, nikoli na kapsidový protein pIX. V souladu s tímto tvrzením je však výsledkem přesměrování vektoru s připojeným transferinem, který sice do buněk nesoucích vysoké množství receptoru pro transferin *in vitro* vstupoval, avšak s nižší účinností než přesměrovaný adenovirus a navíc *in vivo* nebyl schopen doputovat do jádra. Corjon et al. (2008) tedy vyvodili, že ačkoli vlastnosti a poloha proteinu pIX dovoluje vazbu celých proteinů, jejich velikost je omezená, neboť do jádra vstoupily pouze virové částice nesoucí RAP (39 kDa) a nikoli Tf (80 kDa) ani BSA (hovězí sérový albumin; 70 kDa). Příliš velký ligand může zřejmě bránit vazbě kapsidy na mikrotubuly. Zjistili dále, že pro doručení vektoru do příslušných kompartmentů je třeba zvolit takový proteinový ligand, který buď přirozeně disociuje od svého receptoru změnou podmínek uvnitř buňky, nebo dochází intracelulárně k jeho odštěpení.

## 3.4 Přesměrování virových částic genetickými modifikacemi

Je-li znám epitop, který se specificky váže na receptor cílových buněk, je možné genetickou modifikací virového proteinu vložit sekvenci tohoto epitopu na vhodné místo virových kapsidových proteinů a dosáhnout tím přesměrování viru na cílové buňky.

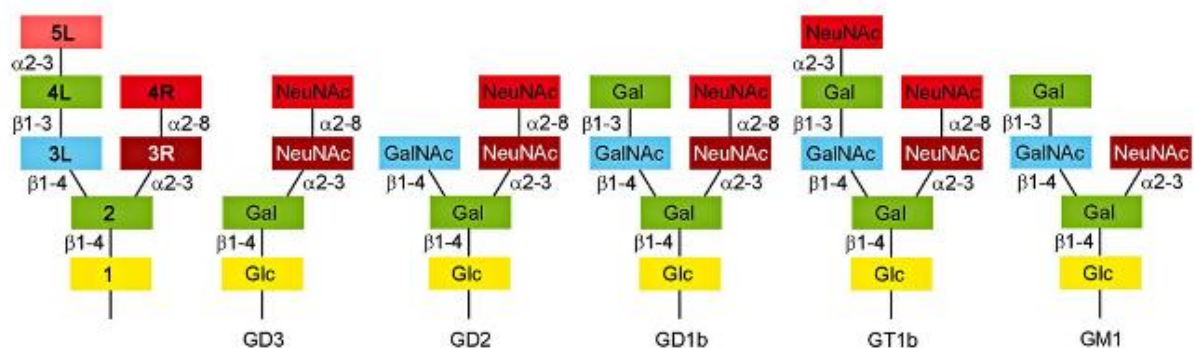
### 3.4.1 Místně specifická mutagenese kapsidy

V případě, že je známo, jaká oblast genu kódujícího kapsidové proteiny je zodpovědná za interakci s receptorem, je nejjednodušším postupem změnou receptoru cílená mutace této oblasti.

Záměrem na pouhé jediné aminokyseliny stačila k tomu, aby přesměrovala BK polyomavirus ze svých přirozených receptorů, gangliosidů b-série (GD3, GD2, GD1b a GT1b) na gangliosid GM1, který je přirozeným receptorem jiného polyomaviru SV40 (Obr. 11) (Tsai et al., 2003; Neu et al., 2013). Mutovaná aminokyselina byla vybrána na základě strukturální studie pomocí krystalové struktury kapsidového proteinu VP1 BK viru v komplexu s gangliosidem GD3. Neu et al. (2013) dále zjistili, že dle vodní molekuly, pro které je přes 74% podobnost viry BK, JC a SV40 liší spektrem svých hostitelů, je kavita ve struktuře VP1, která interaguje s methylovou skupinou NeuNAc kyseliny sialové. Tato kavita je u viru

SV40 prostornější a hydrofilnější než u zbylých dvou polyomavirů, a může tedy kromě NeuNAc interagovat i se sialovou kyselinou obsahující NeuNGc, která se vyskytuje u opic. Tato odlišnost by tedy mohla být příčinou tropismu viru SV40 nejen pro lidské, ale zejména pro opičí buňky a naopak specifitu BK a JC virů pro lidské hostitele.

Na interakci s terminální kyselinou sialovou se u virů BK, JC i SV40 podílí na kolik hlavních aminokyselinových zbytků velmi podobným způsobem. Pro určení specifity vazby na receptor jsou však zásadní strategicky rozmístěné aminokyselinové zbytky, dále od této pozice, které dávají vzniknout charakteristickým kontaktům s dalšími cukerními zbytky gangliosidu a určují tím, v jakém kontextu je kyselina sialová rozpoznávána. Tato skutečnost se zdá být atraktivní možností pro změnu specifity receptoru (Neu et al., 2013).



**Obr. 11: Gangliosidy série b jsou receptory BK polyomaviru**

Schematická reprezentace struktur gangliosidů série b obsahujících disialovou kyselinu (gangliosidy GD3, GD2, GD1b, GT1b) a série a obsahujících kyselinu monosialovou (GM1). Zkratky reziduí gangliosidů: NeuNAc - 5-N-acetylneuraminová kyselina, GalNAc - N-acetylgalaktosamin, Gal - galaktosa, Glc - glukosa. Upraveno podle Neu et al. (2013)

### 3.4.2 Usmírněná evoluce

Usmírněná evoluce je metoda, napodobující proces přirozené evoluce, založená na náhodné mutageně genu kódujícího protein, která vede ke vzniku nových vlastností tohoto proteinu. Využit lze například usmírněné evoluce virů hlavně tehdy, pokud se na interakci s cílovou buňkou podílí pouze omezený počet kapsidových proteinů (ideálně jeden), které lze snadno mutovat. Jedná se tedy o možnost, kterou lze zatím využít hlavně u virů s jednoduchým uspořádáním kapsidy - parvovirů a polyomavirů.

Pro získání požadovaných vlastností proteinu našeho zájmu však na rozdíl od racionálního postupu konstrukce není nutné znát jeho strukturu, mechanismus působení i dopad záměny jednotlivých aminokyselin (You a Arnold, 1996). Základem experimentu usmírněné evoluce jsou dva kroky. Nejprve je třeba vytvořit rozsáhlou knihovnu variant náhodným mutováním genu, a poté se vyselektují pouze ty mutanty, které mají požadované vlastnosti. Tyto nově vzniklé mutanty pak

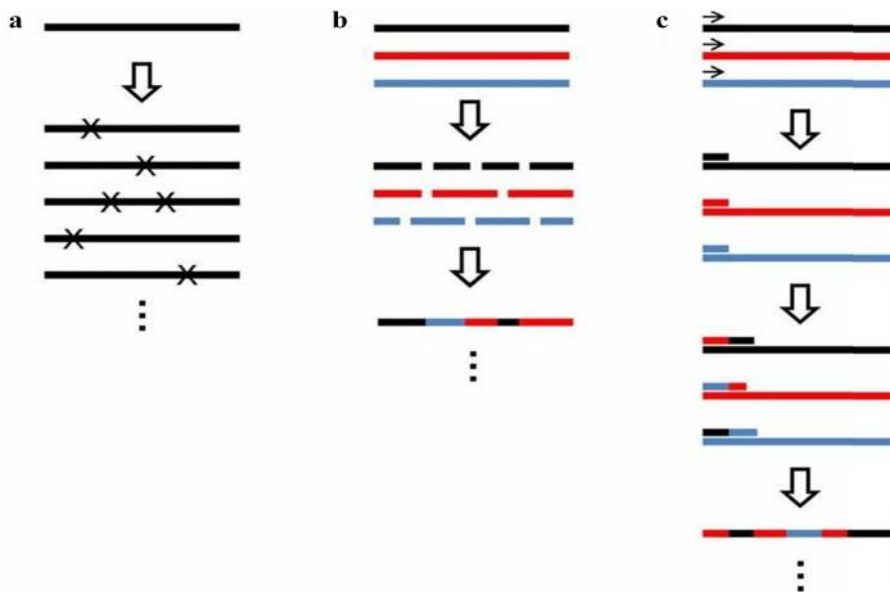
mohou být podrobeny dalším kolům náhodné mutagenese a selekce, aby došlo ke zdokonalení této vlastnosti.

V nejjednodušším uspořádání byl tento přístup vyzkoušen u adeno-asociovaných virů patřících mezi parvoviry. Pro tvorbu virů s modifikovaným tropismem byla použita metoda *in vitro* selekce na buněčných liniích rezistentních k infekci divokými AAV (Perabo et al., 2003). Byla vytvořena knihovna mutantních forem AAV, založená na náhodné inserci 7 aminokyselin na pozici, u níž se předpokládá schopnost vazby na pirozený receptor (pozice 587 kapsidového proteinu) (Girod et al., 1999). Mutanty získané selekcí byly schopné transdukovat cílové buňky až se 100násobně vyšší účinností oproti divokému AAV. Jednalo se však pouze o receptorovou selektivitu, nikoli buněčnou selektivitu.

Běžně užívanou metodou pro generování náhodných mutací je tzv. error-prone PCR, což je polymerázová řetězová reakce provedená v mutagenních podmínkách s polymerázou bez opravné aktivity, kdy při syntéze nových řetězců DNA může ve zvýšené míře docházet k záměně bází (Obr. 12a). Lze pro ni využít například Taq polymerázu, která však nemá zcela náhodný poměr záměny jednotlivých bází, i jiné, speciálně vyvinuté polymerázy.

Další cestou, jak náhodně mutovat sekvence, jsou metody založené na rekombinaci, například tzv. DNA shuffling neboli míchání DNA. Při této metodě jsou DNA sekvence příbuzných genů našťepeny DNázou I na fragmenty a tyto fragmenty jsou poté náhodně znovu složeny pomocí polymerázové řetězové reakce do chimerních genů (Obr. 12b) (Stemmer, 1994).

Na rekombinaci je také založen proces kolísavého prodlužování (StEP, z angl. staggered extension process). Vychází ze sekvencí příbuzných genů, na něž nasedají primery. Syntéza komplementárních řetězců z těchto primerů je však rychle přerušena, prodloužené fragmenty nasednou na jiné templáty a proces krátké syntézy vlákna, jeho disociace a nasednutí na nový templát se stále opakuje (Obr. 12c) (Zhao et al., 1998).



**Obr. 12: Metody umělé evoluce**

(a) Při metodě error-prone PCR jsou do sekvence genu zaváděny náhodné mutace. (b) Při metodě DNA shuffling jsou výchozí sekvence rozlámány na malé kousky a náhodně znovu složeny. (c) Při metodě StEP jsou chimerní sekvence syntetizovány pomocí postupného nasedání, prodlužování a disociace již nasyntetizovaných úseků na původní sekvence. Upraveno podle Cobb et al. (2013).

Přístup umělé evoluce byl úspěšně využit pro změnu ve využívání receptorů buněčného tropismu viru SV40 (Magaldi et al., 2012). Změna používaného receptoru byla dosažena několika náhodnými mutacemi ve vazebném místě proteinu VP1 (virový strukturální protein 1), který tvoří virovou kapsidu a je zodpovědný za interakci s receptorem. Mutované SV40 viriony s modifikovaným VP1 proteinem byly inkubovány s rozpustným gangliosidem GM1 (GM1 je přirozeným receptorem viru SV40), který obsadí všechna vazebná místa na virionu, jež jsou schopna vázat GM1 a znemožní tedy vazbu viru na buněčný povrch skrze interakci s receptorem GM1 vyskytující se na povrchu buněk permissivních pro SV40. Selekcí těchto mutantů na buňkách měla vést k získání mutantů, které se pro vstup do buněk naučily využívat jiný receptor než GM1. Výsledkem experimentu byl vznik dvou mutantů, které nebyly neutralizovány inkubací s GM1, nebyly ani stimulovány zvýšením obsahu GM1 gangliosidu v buněčné membráně a nebyly schopné vázat se na GM1 na buněčném povrchu. Jedna z nich navíc infikovala buňky s nízkým obsahem GM1 v membráně účinněji než divoký SV40, pravděpodobně pro infekci využívala jiný gangliosid než GM1. Došlo tedy ke změně receptorové specifity, avšak stále se jednalo o receptor velmi podobného typu. Otázkou zůstává, zda je tímto přístupem možné zajistit přesměrování na zcela jiný, v ideálním případě volitelný receptor.

*In vivo* selekcí knihovny mutantních AAV kapsidových proteinů v transgenických myších se Dalkarovi et al. (2013) podařilo získat mutantu, která je po vstříknutí do tekutiny sklivce schopná proniknout skrze hustou tkáň do hlubších vrstev sítnice, které jsou pro nemožifikované AAV vektory

jinak nedostupné. Je tedy možné získané vektory využít pro léčbu dědičných degenerativních onemocnění sítnice. Úspěšná mutanta vznikla náhodnou mutagenezí AA2 *cap* genu kódujícího kapsidové proteiny s vloženými náhodnými 7 aminokyselin dlouhými sekvencemi do smyčky 4 v oblasti domény vážící heparin. Až když byla mutanta schopná transdukovat všechny buňky sítnice, volbou vhodného promotoru zajistili její specifitu výlučně pro fotoreceptory.

Náhodným promícháním fragmentů (DNA shuffling) sekvencí sedmi sérotypů AAV bylo docíleno vzniku chimerních AAV s novými vazebnými místy pro buněčné receptory, které se nevyskytují u žádného z přirozených sérotypů AAV, jež byly pro přípravu použity (Koerber et al., 2008). Navíc díky porovnání odlišností sekvencí roděrovských a nově vytvořených chimerních AAV bylo identifikováno několik nových míst, která se nejen na vazbu receptoru, ale i určení tropismu viru zřejmě zásadně podílí a mohou být tedy použita pro cílené přesměrování částic. Změna tropismu byla vyvolána změnou pouze dvou povrchových aminokyselin.

### 3.4.3 Kombinace přístupů

Přítomnost doposud provedených experimentech usměrňující evoluce bylo zpravidla dosaženo určité míry virové selektivity pro konkrétní buněčný receptor, ale výsledná mutanta měla buď stále částečně zachovanou schopnost interakce s přirozeným receptorem, nebo byla schopná infikovat i jiné než cílové buňky, proto na této úrovni nemůžeme hovořit o specifitě.

První případ, kdy se kombinací racionálních úprav a usměrňující evoluce dosáhlo vytvoření viru, který využívá pouze jediný receptor a to receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR), který se hojně a často v nadměrném množství vyskytuje na nádorových buňkách (Yarden a Pines, 2012; Ciardiello a Tortora, 2008), provedli Dai et al. (2013). Pro získání selektivity pro EGFR byl do vnějších povrchových smyček kapsidového proteinu Sindbis (SINV) viru (obalený virus z čeledi *Togaviridae*) vložen epidermální růstový faktor (ligand EGFR). Vzniklá mutanta vykazovala částečnou selektivitu pro EGFR, ale byla atenuovaná a zachovala si zbytkový tropismus SINV viru. Proto byla na tuto mutantu aplikována náhodná mutageneze a dvojí selekce. Viry byly selektovány jednak pro zvýšení EGFR selektivity, a jednak pro zvýšení stability viru. Výsledný virus vykazoval specifickou vazbu k EGFR; 99,8 % infekčních virů nedokázalo iniciovat infekci v nepřítomnosti EGFR a specifita byla také potvrzena kryoelektronovou mikroskopií, kdy vazebné místo pro receptor u roděrovského viru bylo překryto vloženým ligandem (epidermální růstový faktor; EGF), což zabránilo zachování tropismu přirozeného viru (Dai et al., 2013). Konfokální mikroskopie navíc ukázala, že získaná mutanta vážala EGFR a spouštěla EGFR akumulaci a endocytosu během 2 minut. Tento virus by tedy mohl najít využití jako onkolytické terapeutikum, nebo je schopný infikovat specificky nádorové buňky a tyto buňky i zabít.



## 4 Závěr

Na základě práce byly zmíněny faktory, které se podílejí na určení specifity a účinnosti vstupu viru do buňky. Patří mezi ně jak události na buněném povrchu a mechanismus internalizace viru, tak i nespecifický vstup viru do buňky i jeho exocytosa. Při přesměrování viru na cílové buňky je třeba tyto faktory pochopit a následně využít těchto v domostí pro přesměrování viru na cílové buňky, do kterých je třeba terapeutický gen i diagnostickou látku doručit.

V posledních letech byla provedena řada experimentů, které ukázaly, že je opravdu možné viry přesměrovat a efektivita tohoto přesměrování pak závisí zejména na účelu použití cílených vektorů. Pro specifické cílení je třeba, aby daný buněný typ vystavoval na svém povrchu jedinou molekulu. Směrování se často cílí na nádorové buňky, které nadměrně exprimují určité molekuly, ale málokdy molekuly unikátní. O úspěšném směrování pak rozhodují takové charakteristiky, jakými jsou množství a lokální koncentrace receptorů, jejich pohyblivost určující kinetiku interakcí mezi virem a buňkou a dále také afinita vazby, která usnadňuje vazbu vzdálenějších receptorů, pokud je dostatečně vysoká.

Úplné specifity se zatím podařilo dosáhnout jen v ojedinělých případech. Výsledky experimentů naznačují, že specificky přesměrovat lze zejména obalené viry. Příčinou by mohl být rozdílný mechanismus vstupu obalených a neobalených virů. Endocytosa neobalených virů vyžaduje pouze vazbu mezi virovou částicí a receptorem, po níž dojde k internalizaci receptoru s virem zajištěným buněným aparátem. Pro fúzi viru s plazmatickou membránou je třeba, aby dostatečně silná vazba mezi receptorem a virem uvolnila velké množství energie, která umožní konformační změny obalových glykoproteinů. Glykoproteiny potom nezávisle na buněčné energii fúzí viru s virovým obalem s plazmatickou membránou. Obalené viry tedy nutně vyžadují velmi silnou vazbu na receptor, tudíž by nemělo být možné, aby fúzí vstupovaly do buňky nespecificky.

Nicméně, ve většině studií modifikované viry transdukovaly i jiné než cílové buňky. Pro směrovanou dopravu látek (např. cytotoxických látek do nádorových buněk) je tak selektivita i účinnost transdukce stále poměrně malá a pro tento záměr je třeba použít vysokou dávku částic, což by však mohlo vyvolat v některých případech nežádoucí imunitní reakci organismu. Specifitu přenosu lze zvýšit v případě genové terapie, a to volbou vhodného promotoru, který zajistí expresi genu pouze v cílových buňkách (shrnutí Sadeghi a Hitt, 2005).

Je těžké porovnat a vůbec určit skutečnou účinnost směrování, studie ji totiž často uvádí formou kolikrát je vyšší signál reportérového genu (zeleného fluorescenčního proteinu i luciferázy) kódovaného virem po aplikaci na buňky pomocí zkonstruovaného vektoru než pomocí povodního viru, od něhož je nový vektor odvozen. Někdy tedy neznáme absolutní hodnotu účinnosti, ale pouze relativní a závisí velkou měrou na povodním tropismu viru pro danou buňku. Také podmínky, v nichž

jsou experimenty prováděny, se zásadně liší, například dávka viru, doba od infekce, kdy je transdukce odebrána, použitý promotor a model pro hodnocení, což znemožňuje spolehlivé srovnání dosažených výsledků i v případě volby stejného markerového systému. Pouze malé množství dosavadních studií navíc sledovalo fyzickou přítomnost viru v buňce, zpravidla šlo totiž o sledování projevu genu, který virus nesl a nedá se tedy vlastně říci, že je možno dosáhnout specifické dopravy. Vyšší specifické účinnosti je dosahováno, jsou-li v kultuře buněk *in vitro* částice aplikovány ve vysoké koncentraci a pak odmyty, než v tkáni, kde se nesrovnatelně nižší koncentrace snižují v dlouhodobém horizontu, čímž dochází ke vstupu do jiných buněk a vektory mají menší šanci, že se dostanou do blízkosti buněk, které pro ně mají specifické receptory. Účinnost může ovlivnit také imunitní systém daného organismu a *in vivo* pokusy jsou pro hodnocení účinnosti nezbytné.

Z uvedených metod přispívá se pro zvýšení selektivity k určitému buněčnému typu velmi dobře osvědčila kombinace vložení epitopu, o němž je známo, že rozpoznává cílový receptor, do povrchových proteinů viru, čímž je zajištěno základní přispívání viru, a náhodné mutagenese, která rozpoznání zdokonalí. Z publikovaných dat je však zřejmé, že tento přístup vede k tomu, že si modifikovaný virus alespoň částečně zachovává tropismus pro vodní.

Dramatické změny ve využívání receptoru lze nejnázorněji docílit připojením smrovcového ligandu. Připojení ligandu přes adaptor a chemická konjugace ligandu jsou atraktivní v možnosti cílit stejnou kostru vektoru na různé cílové buňky pouze volbou vhodného ligandu. Hrozí zde však riziko disociace ligandu, i kompetice sérovými proteiny se smrovcovým ligandem, a tím obnovení přirozeného tropismu viru s možnými fatálními následky, proto je bezpečnější používat tento přístup *in vitro* i *ex vivo*. Genetická fúze se zdá být v tomto ohledu méně riskantní, je však třeba pro každou cílovou molekulu přizpůsobit unikátní vektor a v těchto ligandy připojené bez nástavce mohou omezit správné složení virové kapsidy. Existuje pestrá škála způsobů přispívání, každý má určité výhody a nevýhody, ale volbou optimální metody a jejího zdokonalení lze zajistit rozmanité použití.

S ohledem na dříve prováděnou internalizaci viru a dosud provedené experimenty tato práce ukazuje, že zamezit nespecifickému vstupu nanostruktur (včetně virových) do buněk bude velmi problematické a dosažení absolutní specifické je pravděpodobně nemožné. Je však absolutní specifická nutná? Při léčbě nádorů se ukazuje, že i malé zvýšení selektivity doručení toxické látky do nádorových buněk může významně zlepšit terapeutický index (Kamaly et al., 2012). Pro diagnostické účely zase postačí docílit ne selektivní internalizace, ale selektivní vazby na cílovou molekulu s výrazně odlišnou kinetikou. časové parametry mohou pomoci odfiltrovat nespecificky navázané částice jako pozadí.

Viry se v podstatě přirozeně vyvinuly k tomu, aby byly schopné doručit svůj náklad do hostitelské buňky. I přes drobné nedostatky tedy virové nanočástice a rozsáhlé spektrum metod jejich modifikace představují velký potenciál, který není možné nevyužít.

## 5 Seznam použité literatury

- Aleman, R., Suzuki, K., and Curiel, D.T. (2000). Blood clearance rates of adenovirus type 5 in mice. *J Gen Virol* 81, 2605–2609.
- Arap, W., Pasqualini, R., and Ruoslahti, E. (1998). Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science* 279, 377–380.
- Barton, E.S., Forrest, J.C., Connolly, J.L., Chappell, J.D., Liu, Y., Schnell, F.J., Nusrat, A., Parkos, C.A., and Dermody, T.S. (2001). Junction adhesion molecule is a receptor for reovirus. *Cell* 104, 441–451.
- Bergelson, J.M., Cunningham, J.A., Droguett, G., KurtJones, E.A., Krithivas, A., Hong, J.S., Horwitz, M.S., Crowell, R.L., and Finberg, R.W. (1997). Isolation of a common receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275, 1320–1323.
- Binz, H.K., Amstutz, P., Kohl, A., Stumpp, M.T., Briand, C., Forrer, P., Grütter, M.G., and Plückthun, A. (2004). High-affinity binders selected from designed ankyrin repeat protein libraries. *Nature Biotechnology* 22, 575–582.
- Boutin, S., Monteilhet, V., Veron, P., Leborgne, C., Benveniste, O., Montus, M.F., and Masurier, C. (2010). Prevalence of Serum IgG and Neutralizing Factors Against Adeno-Associated Virus (AAV) Types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the Healthy Population: Implications for Gene Therapy Using AAV Vectors. *Hum. Gene Ther.* 21, 704–712.
- Campos, S.K., and Barry, M.A. (2006). Comparison of adenovirus fiber, protein IX, and hexon capsomeres as scaffolds for vector purification and cell targeting. *Virology* 349, 453–462.
- Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249–257.
- Cerchia, L., Hamm, J., Libri, D., Tavitian, B., and de Franciscis, V. (2002). Nucleic acid aptamers in cancer medicine. *FEBS Letters* 528, 12–16.
- Chen, H., Zheng, X., Di, B., Wang, D., Zhang, Y., Xia, H., and Mao, Q. (2013). Aptamer modification improves the adenoviral transduction of malignant glioma cells. *Journal of Biotechnology* 168, 362–366.
- Ciardello, F., and Tortora, G. (2008). EGFR Antagonists in Cancer Treatment Drug Therapy: The New England Journal of Medicine 358, 1160–1174.
- Cobb, R.E., Chao, R., and Zhao, H. (2013). Directed evolution: Past, present, and future. *AIChE J.* 59, 1432–1440.
- Colquhoun, A.J., and Mellon, J.K. (2002). Epidermal growth factor receptor and bladder cancer. *Postgrad. Med. J.* 78, 584–589.
- Corjon, S., Wortmann, A., Engler, T., van Rooijen, N., Kochanek, S., and Kreppel, F. (2008). Targeting of Adenovirus Vectors to the LRP Receptor Family With the High-affinity Ligand RAP via Combined Genetic and Chemical Modification of the pIX Capsomere. *Mol Ther* 16, 1813–1824.
- Dai, H.-S., Liu, Z., Jiang, W., and Kuhn, R.J. (2013). Directed Evolution of a Virus Exclusively Utilizing Human Epidermal Growth Factor Receptor as the Entry Receptor. *J. Virol.* 87, 11231–11243.

- Dalkara, D., Byrne, L.C., Klimczak, R.R., Visel, M., Yin, L., Merigan, W.H., Flannery, J.G., and Schaffer, D.V. (2013). In Vivo-Directed Evolution of a New Adeno-Associated Virus for Therapeutic Outer Retinal Gene Delivery from the Vitreous. *Sci. Transl. Med.* 5, 189ra76.
- Dellacono, F.R., Spiro, J., Eisma, R., and Kreutzer, D. (1997). Expression of basic fibroblast growth factor and its receptors by head and neck squamous carcinoma tumor and vascular endothelial cells. *Am. J. Surg.* 174, 540–544.
- Doherty, G.J., and McMahon, H.T. (2009). Mechanisms of Endocytosis. In *Annual Review of Biochemistry*, (Palo Alto: Annual Reviews), pp. 857–902.
- Dreier, B., Honegger, A., Hess, C., Nagy-Davidescu, G., Mittl, P.R.E., Grutter, M.G., Belousova, N., Mikheeva, G., Krasnykh, V., and Pluckthun, A. (2013). Development of a generic adenovirus delivery system based on structure-guided design of bispecific trimeric DARPin adapters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, E869–E877.
- Eckert, D.M., and Kim, P.S. (2001). Mechanisms of Viral Membrane Fusion and Its Inhibition. *Annual Review of Biochemistry* 70, 777–810.
- Eklund, M., Axelsson, L., Uhlen, M., and Nygren, P.A. (2002). Anti-idiotypic protein domains selected from protein A-based affibody libraries. *Proteins* 48, 454–462.
- Eto, Y., Yoshioka, Y., Mukai, Y., Okada, N., and Nakagawa, S. (2008). Development of PEGylated adenovirus vector with targeting ligand. *International Journal of Pharmaceutics* 354, 3–8.
- Ewers, H., Jacobsen, V., Klotzsch, E., Smith, A.E., Helenius, A., and Sandoghdar, V. (2007). Label-Free Optical Detection and Tracking of Single Virions Bound to Their Receptors in Supported Membrane Bilayers. *Nano Lett.* 7, 2263–2266.
- Ewers, H., Römer, W., Smith, A.E., Bacia, K., Dmitrieff, S., Chai, W., Mancini, R., Kartenbeck, J., Chambon, V., Berland, L., et al. (2010). GM1 structure determines SV40-induced membrane invagination and infection. *Nat Cell Biol* 12, 11–18.
- Farkhani, S.M., Valizadeh, A., Karami, H., Mohammadi, S., Sohrabi, N., and Badrzadeh, F. (2014). Cell penetrating peptides: Efficient vectors for delivery of nanoparticles, nanocarriers, therapeutic and diagnostic molecules. *Peptides*.
- Figures, M.R., Wobb, J., Araki, K., Liu, T., Xu, L., Zhu, H., O'Malley, B.W., and Li, D. (2009). Head and neck squamous cell carcinoma targeted chemosensitization. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 141, 177–183.
- Fleischli, C., Sirena, D., Lesage, G., Havenga, M.J.E., Cattaneo, R., Greber, U.F., and Hemmi, S. (2007). Species B adenovirus serotypes 3, 7, 11 and 35 share similar binding sites on the membrane cofactor protein CD46 receptor. *J. Gen. Virol.* 88, 2925–2934.
- Fujita, A., Cheng, J., Hirakawa, M., Furukawa, K., Kusunoki, S., and Fujimoto, T. (2007). Gangliosides GM1 and GM3 in the living cell membrane form clusters susceptible to cholesterol depletion and chilling. *Mol. Biol. Cell* 18, 2112–2122.
- Furumoto, K., Ogawara, K., Yoshida, M., Takakura, Y., Hashida, M., Higaki, K., and Kimura, T. (2001). Biliary excretion of polystyrene microspheres depends on the type of receptor-mediated uptake in rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1526, 221–226.
- Gao, G.P., Vandenberghe, L.H., Alvira, M.R., Lu, Y., Calcedo, R., Zhou, X.Y., and Wilson, J.A. (2004). Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J. Virol.* 78, 6381–6388.

- Geguchadze, R.N., Machen, L., Zourelas, L., Gallo, P.H., and Passineau, M.J. (2012). An AAV2/5 Vector Enhances Safety of Gene Transfer to the Mouse Salivary Gland. *J Dent Res* 91, 382–386.
- Gewirtz, D. (1999). A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochemical Pharmacology* 57, 727–741.
- Giacca, M., and Zacchigna, S. (2012). Virus-mediated gene delivery for human gene therapy. *J. Control. Release* 161, 377–388.
- Gibbons, M.M., Chou, T., and D’Orsogna, M.R. (2010). Diffusion-Dependent Mechanisms of Receptor Engagement and Viral Entry. *J. Phys. Chem. B* 114, 15403–15412.
- Gibbs, E., and Lienhard, G. (1984). Fluid-Phase Endocytosis by Isolated Rat Adipocytes. *J. Cell. Physiol.* 121, 569–575.
- Girod, A., Ried, M., Wobus, C., Lahm, H., Leike, K., Kleinschmidt, J., Deleage, G., and Hallek, M. (1999). Genetic capsid modifications allow efficient re-targeting of adeno-associated virus type 2. *Nat. Med.* 5, 1052–1056.
- Giroglou, T., Florin, L., Schafer, F., Streeck, R.E., and Sapp, M. (2001). Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J. Virol.* 75, 1565–1570.
- Hagen, S., Baumann, T., Wagner, H.J., Morath, V., Kaufmann, B., Fischer, A., Bergmann, S., Schindler, P., Arndt, K.M., and Müller, K.M. (2014). Modular adeno-associated virus (rAAV) vectors used for cellular virus-directed enzyme prodrug therapy. *Sci. Rep.* 4.
- Hajitou, A., Trepel, M., Lilley, C.E., Soghomonyan, S., Alauddin, M.M., Marini III, F.C., Restel, B.H., Ozawa, M.G., Moya, C.A., Rangel, R., et al. (2006). A Hybrid Vector for Ligand-Directed Tumor Targeting and Molecular Imaging. *Cell* 125, 385–398.
- Hara, T., Kojima, A., Fukuda, H., Masaoka, T., Fukumori, Y., Matsumoto, M., and Seya, T. (1992). Levels of Complement Regulatory Proteins, Cd35 (cr-1), Cd46 (mcp) and Cd55 (daf) in Human Hematological Malignancies. *Br. J. Haematol.* 82, 368–373.
- Harris, J.M., and Chess, R.B. (2003). Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nature Reviews Drug Discovery* 2, 214.
- Hirsch, F.R., Varella-Garcia, M., Bunn, P.A., Di Maria, M.V., Veve, R., Bremnes, R.M., Baron, A.E., Zeng, C., and Franklin, W.A. (2003). Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: Correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J. Clin. Oncol.* 21, 3798–3807.
- Hoffman, J.A., Giraudo, E., Singh, M., Zhang, L.L., Inoue, M., Porkka, K., Hanahan, D., and Ruoslahti, E. (2003). Progressive vascular changes in a transgenic mouse model of squamous cell carcinoma. *Cancer Cell* 4, 383–391.
- Hood, J.D., Bednarski, M., Frausto, R., Guccione, S., Reisfeld, R.A., Rong Xiang, and Cheresch, D.A. (2002). Tumor Regression by Targeted Gene Delivery to the Neovasculature. *Science* 296, 2404–2407.
- Israeli, R.S., Powell, C.T., Fair, W.R., and Heston, W.D.W. (1993). Molecular Cloning of a Complementary DNA Encoding a Prostate-specific Membrane Antigen. *Cancer Res* 53, 227–230.
- Joyce, J.G., Tung, J.S., Przysiecki, C.T., Cook, J.C., Lehman, E.D., Sands, J.A., Jansens, K.U., and Keller, P.M. (1999). The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11

recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 274, 5810–5822.

Jung, Y., Park, H.-J., Kim, P.-H., Lee, J., Hyung, W., Yang, J., Ko, H., Sohn, J.-H., Kim, J.-H., Huh, Y.-M., et al. (2007). Retargeting of adenoviral gene delivery via Herceptin–PEG–adenovirus conjugates to breast cancer cells. *Journal of Controlled Release* 123, 164–171.

Kamaly, N., Xiao, Z., Valencia, P.M., Radovic-Moreno, A.F., and Farokhzad, O.C. (2012). Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. *Chem Soc Rev* 41, 2971–3010.

Keswani, S.G., Balaji, S., Le, L., Leung, A., Katz, A.B., Lim, F.-Y., Habli, M., Jones, H.N., Wilson, J.M., and Crombleholme, T.M. (2012). Pseudotyped AAV Vector-Mediated Gene Transfer in a Human Fetal Trachea Xenograft Model: Implications for In Utero Gene Therapy for Cystic Fibrosis. *PLoS ONE* 7, e43633.

Khare, R., Chen, C.Y., Weaver, E.A., and Barry, M.A. (2011). Advances and Future Challenges in Adenoviral Vector Pharmacology and Targeting. *Curr Gene Ther* 11, 241–258.

Kim, M., Sumerel, L.A., Belousova, N., Lyons, G.R., Carey, D.E., Krasnykh, V., and Douglas, J.T. (2003). The coxsackievirus and adenovirus receptor acts as a tumour suppressor in malignant glioma cells. *British Journal of Cancer* 88, 1411.

Kim, P.-H., Sohn, J.-H., Choi, J.-W., Jung, Y., Kim, S.W., Haam, S., and Yun, C.-O. (2011). Active targeting and safety profile of PEG-modified adenovirus conjugated with herceptin. *Biomaterials* 32, 2314–2326.

Kinugasa, N., Higashi, T., Nouse, K., Nakatsukasa, H., Kobayashi, Y., Ishizaki, M., Toshikuni, N., Yoshida, K., Uematsu, S., and Tsuji, T. (1999). Expression of membrane cofactor protein (MCP, CD46) in human liver diseases. *Br. J. Cancer* 80, 1820–1825.

Knipe, D.M., and Howley, P.M. (2007). *Fields' Virology* (Lippincott Williams & Wilkins).

Koerber, J.T., Jang, J.-H., and Schaffer, D.V. (2008). DNA shuffling of adeno-associated virus yields functionally diverse viral progeny. *Mol. Ther.* 16, 1703–1709.

Koudelka, K.J., Destito, G., Plummer, E.M., Trauger, S.A., Siuzdak, G., and Manchester, M. (2009). Endothelial Targeting of Cowpea Mosaic Virus (CPMV) via Surface Vimentin. *PLoS Pathog.* 5, e1000417.

Lico, C., Schoubben, A., Baschieri, S., Blasi, P., and Santi, L. (2013). Nanoparticles in Biomedicine: New Insights from Plant Viruses. *Curr. Med. Chem.* 20, 3471–3487.

Lim, F.Y., Martin, B.G., Sena-Esteves, M., Radu, A., and Crombleholme, T.M. (2002). Adeno-associated virus (AAV)-mediated gene transfer in respiratory epithelium and submucosal gland cells in human fetal tracheal organ culture. *J. Pediatr. Surg.* 37, 1051–1056.

Lim, F.Y., Kobinger, G.P., Weiner, D.J., Raclu, A., Wilson, J.M., and Crombleholme, T.M. (2003). Human fetal trachea-scid mouse xenografts: Efficacy of vesicular stomatitis virus-G pseudotyped lentiviral-mediated gene transfer. *J. Pediatr. Surg.* 38, 834–839.

Lipkind, M., and Urbakh, V. (1988). Dependence of virus adsorption to the cell surface on the input multiplicity of infection. *Zentralblatt Für Bakteriologie, Mikrobiologie Und Hygiene. Series A: Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology* 269, 501–505.

Lortat-Jacob, H., Chouin, E., Cusack, S., and Raaij, M.J. van (2000). Kinetic Analysis of Adenovirus Fiber Binding to its Receptor Reveals an Avidity Mechanism for Trimeric Receptor-Ligand Interactions. *J. Biol. Chem.*

- Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y., and Hori, K. (2000). Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *Journal of Controlled Release* 65, 271–284.
- Magaldi, T.G., Buch, M.H.C., Murata, H., Erickson, K.D., Neu, U., Garcea, R.L., Peden, K., Stehle, T., and DiMaio, D. (2012). Mutations in the GM1 Binding Site of Simian Virus 40 VP1 Alter Receptor Usage and Cell Tropism. *J. Virol.* 86, 7028–7042.
- Marsh, M., and Helenius, A. (2006). Virus Entry: Open Sesame. *Cell* 124, 729–740.
- Mercer, J., Schelhaas, M., and Helenius, A. (2010). Virus Entry by Endocytosis. *Annual Review of Biochemistry* 79, 803–833.
- Mercier, G.T., Campbell, J.A., Chappell, J.D., Stehle, T., Dermody, T.S., and Barry, M.A. (2004). A chimeric adenovirus vector encoding reovirus attachment protein 1 targets cells expressing junctional adhesion molecule 1. *PNAS* 101, 6188–6193.
- Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., and Gianni, L. (2004). Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 56, 185–229.
- Mok, H., Palmer, D.J., Ng, P., and Barry, M.A. (2005). Evaluation of polyethylene glycol modification of first-generation and helper-dependent adenoviral vectors to reduce innate immune responses. *Mol. Ther.* 11, 66–79.
- Monopoli, M.P., Åberg, C., Salvati, A., and Dawson, K.A. (2012). Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nature Nanotechnology* 7, 779–786.
- Munch, R.C., Janicki, H., Volker, I., Rasbach, A., Hallek, M., Buning, H., and Buchholz, C.J. (2013). Displaying High-affinity Ligands on Adeno-associated Viral Vectors Enables Tumor Cell-specific and Safe Gene Transfer. *Mol Ther* 21, 109–118.
- Murakami, M., Ugai, H., Belousova, N., Pereboev, A., Dent, P., Fisher, P.B., Everts, M., and Curiel, D.T. (2010). Chimeric Adenoviral Vectors Incorporating a Fiber of Human Adenovirus 3 Efficiently Mediate Gene Transfer into Prostate Cancer Cells. *Prostate* 70, 362–376.
- Murray, K.P., Mathure, S., Kaul, R., Khan, S., Carson, L.F., Twiggs, L.B., Martens, M.G., and Kaul, A. (2000). Expression of complement regulatory proteins - CD 35, CD 46, CD 55, and. *Gynecol. Oncol.* 76, 176–182.
- Nakamura, T., Peng, K.-W., Harvey, M., Greiner, S., Lorimer, I.A.J., James, C.D., and Russell, S.J. (2005). Rescue and propagation of fully retargeted oncolytic measles viruses. *Nature Biotechnology* 23, 209–214.
- Neu, U., Allen, S.A., Blaum, B.S., Liu, Y., Frank, M., Palma, A.S., Ströh, L.J., Feizi, T., Peters, T., Atwood, W.J., et al. (2013). A Structure-Guided Mutation in the Major Capsid Protein Retargets BK Polyomavirus. *PLoS Pathog* 9, e1003688.
- Nishiyama, T., Kawamura, Y., Kawamoto, K., Matsumura, H., Yamamoto, N., Ito, T., Ohyama, A., Katsuragi, T., and Sakai, T. (1985). Antineoplastic Effects in Rats of 5-Fluorocytosine in Combination with Cytosine Deaminase Capsules. *Cancer Res* 45, 1753–1761.
- Nour, A.M., and Modis, Y. (2014). Endosomal vesicles as vehicles for viral genomes. *Trends Cell Biol.*
- Okegawa, T., Li, Y., Pong, R.-C., Bergelson, J.M., Zhou, J., and Hsieh, J.-T. (2000). The Dual Impact of Coxsackie and Adenovirus Receptor Expression on Human Prostate Cancer Gene Therapy. *Cancer Res* 60, 5031–5036.

- Panyam, J., and Labhasetwar, V. (2003). Dynamics of endocytosis and exocytosis of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles in vascular smooth muscle cells. *Pharmaceutical Research* 20, 212–220.
- Parton, R. (1994). Ultrastructural-Localization of Gangliosides - Gm(1) Is Concentrated in Caveolae. *J. Histochem. Cytochem.* 42, 155–166.
- Perabo, L., Büning, H., Kofler, D.M., Ried, M.U., Girod, A., Wendtner, C.M., Enssle, J., and Hallek, M. (2003). In Vitro Selection of Viral Vectors with Modified Tropism: The Adeno-associated Virus Display. *Mol Ther* 8, 151–157.
- Pereboev, A.V., Nagle, J.M., Shakhmatov, M.A., Triozzi, P.L., Matthews, Q.L., Kawakami, Y., Curiel, D.T., and Blackwell, J.L. (2004). Enhanced Gene Transfer to Mouse Dendritic Cells Using Adenoviral Vectors Coated with a Novel Adapter Molecule. *Mol Ther* 9, 712–720.
- Ratjen, F., and Döring, G. (2003). Cystic fibrosis. *The Lancet* 361, 681–689.
- Roelvink, P.W., Lizonova, A., Lee, J.G.M., Li, Y., Bergelson, J.M., Finberg, R.W., Brough, D.E., Kovcsdi, I., and Wickham, T.J. (1998). The Coxsackievirus-Adenovirus Receptor Protein Can Function as a Cellular Attachment Protein for Adenovirus Serotypes from Subgroups A, C, D, E, and F. *J. Virol.* 72, 7909–7915.
- Rust, M.J., Lakadamyali, M., Feng Zhang, and Xiaowei Zhuang (2004). Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry. *Nature Structural & Molecular Biology* 11, 567–573.
- Sadeghi, H., and Hitt, M.A. (2005). Transcriptionally targeted adenovirus vectors. *Curr. Gene Ther.* 5, 411–427.
- Schleich, H., Wiest, W., Schmidt, R., Hofmann, I., Altenburg, H., and Melchert, F. (1987). Ovarian-Carcinoma - Increase in Clinical Validity by Simultaneous Determination of Sra and Ca-125. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 113, 603–607.
- Sirena, D., Lilienfeld, B., Eisenhut, M., Kalin, S., Boucke, K., Beerli, R.R., Vogt, L., Ruedl, C., Bachmann, M.F., Greber, U.F., et al. (2004). The human membrane cofactor CD46 is a receptor for species B adenovirus serotype 3. *J. Virol.* 78, 4454–4462.
- Skerra, A. (2007). Alternative non-antibody scaffolds for molecular recognition. *Current Opinion in Biotechnology* 18, 295–304.
- Steinmetz, N.F., Cho, C.-F., Ablack, A., Lewis, J.D., and Manchester, M. (2011). Cowpea mosaic virus nanoparticles target surface vimentin on cancer cells. *Nanomedicine (Lond)* 6, 351–364.
- Stemmer, W. (1994). Dna Shuffling by Random Fragmentation and Reassembly - in-Vitro Recombination for Molecular Evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 10747–10751.
- Stuart, D.I., and Jones, E.Y. (1995). Recognition at the cell surface: recent structural insights. *Current Opinion in Structural Biology* 5, 735–743.
- Stumpp, M.T., Binz, H.K., and Amstutz, P. (2008). DARPin: A new generation of protein therapeutics. *Drug Discov. Today* 13, 695–701.
- Surviladze, Z., Dziduszko, A., and Ozbun, M.A. (2012). Essential Roles for Soluble Virion-Associated Heparan Sulfonated Proteoglycans and Growth Factors in Human Papillomavirus Infections. *PLoS Pathog* 8, e1002519.



- Szklarczyk, O.M., González-Segredo, N., Kukura, P., Oppenheim, A., Choquet, D., Sandoghdar, V., Helenius, A., Sbalzarini, I.F., and Ewers, H. (2013). Receptor Concentration and Diffusivity Control Multivalent Binding of Sv40 to Membrane Bilayers. *PLoS Comput Biol* 9, e1003310.
- Thorsteinsson, L., O'Dowd, G.M., Harrington, P.M., and Johnson, P.M. (1998). The complement regulatory proteins CD46 and CD59, but not CD55, are highly expressed by glandular epithelium of human breast and colorectal tumour tissues. *APMIS* 106, 869–878.
- Tsai, B., Gilbert, J.M., Stehle, T., Lencer, W., Benjamin, T.L., and Rapoport, T.A. (2003). Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40. *Embo J.* 22, 4346–4355.
- Walker, R.A., and Dearing, S.J. (1999). Expression of epidermal growth factor receptor mRNA and protein in primary breast carcinomas. *Breast Cancer Res. Treat.* 53, 167–176.
- Weitman, S.D., Lark, R.H., Coney, L.R., Fort, D.W., Frasca, V., Zurawski, V.R., and Kamen, B.A. (1992). Distribution of the Folate Receptor GP38 in Normal and Malignant Cell Lines and Tissues. *Cancer Res* 52, 3396–3401.
- Wickham, T.J., Granados, R.R., Wood, H.A., Hammer, D.A., and Shuler, M.L. (1990). General analysis of receptor-mediated viral attachment to cell surfaces. *Biophysical Journal* 58, 1501–1516.
- Wu, Z., Chen, K., Yildiz, I., Dirksen, A., Fischer, R., Dawson, P.E., and Steinmetz, N.F. (2012). Development of viral nanoparticles for efficient intracellular delivery. *Nanoscale* 4, 3567–3576.
- Xu, Y., Richert, N., Ito, S., Merlino, G., and Pastan, I. (1984). Characterization of Epidermal Growth-Factor Receptor Gene-Expression in Malignant and Normal Human Cell-Lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* 81, 7308–7312.
- Yao, X., Yoshioka, Y., Morishige, T., Eto, Y., Narimatsu, S., Kawai, Y., Mizuguchi, H., Gao, J.-Q., Mukai, Y., Okada, N., et al. (2011). Tumor Vascular Targeted Delivery of Polymer-conjugated Adenovirus Vector for Cancer Gene Therapy. *Mol Ther* 19, 1619–1625.
- Yarden, Y. (2001). Biology of HER2 and its importance in breast cancer. *Oncology* 61, 1–13.
- Yarden, Y., and Pines, G. (2012). The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nature Reviews Cancer* 12, 553–563.
- You, L., and Arnold, F.H. (1996). Directed evolution of subtilisin E in *Bacillus subtilis* to enhance total activity in aqueous dimethylformamide. *Protein Eng.* 9, 77–83.
- Zeng, Q., Wen, H., Wen, Q., Chen, X., Wang, Y., Xuan, W., Liang, J., and Wan, S. (2013). Cucumber mosaic virus as drug delivery vehicle for doxorubicin. *Biomaterials* 34, 4632–4642.
- Zhao, H., Giver, L., Shao, Z., Affholter, J.A., and Arnold, F.H. (1998). Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination. *Nat. Biotechnol.* 16, 258–261.

## 6 Seznam použitých zkratek

<b>A431</b>		bun ěná linie lidského karcinomu k ěže
<b>AAV</b>	adeno-associated virus	adeno-asociovaný virus
<b>AAV-2</b>		adeno-asociovaný virus sérotypu 2
<b>AAV2/5</b>		genom AAV-2 obalený kapsidovými proteiny AAV-5
<b>AAV2/8</b>		genom AAV-2 obalený kapsidovými proteiny AAV-8
<b>AAV/fág</b>		bakteriofág s kazetou AAV vloženou do genomu
<b>Ad</b>	adenovirus	adenovirus
<b>Ad-5</b>		adenovirus sérotypu 5
<b>Ad-PEG</b>		adenovirus s kovalentn ěp ipojenými molekulami PEG
<b>Ad-PEG<sub>CGKRRK</sub></b>		adenovirus s kovalentn ěp ipojenými molekulami PEG, konjugovaný s peptidem CGKRRK
<b>Ad-PEG-HER</b>		adenovirus s kovalentn ěp ipojenými molekulami PEG, konjugovaný s Herceptinem
<b>BAP</b>	biotin acceptor peptide	akceptorový pepitid pro biotin
<b>BSA</b>	bovine serum albumin	hov ězí sérový albumin
<b>CAR</b>	coxsackievirus and adenovirus receptor	receptor coxsackie viru a adenoviru
<b>CD38</b>	cluster of differentiation 38	diferencia ění skupina 38
<b>CD40</b>	cluster of differentiation 40	diferencia ění skupina 40
<b>CD40L</b>	cluster of differentiation 40 ligand	ligand diferencia ění skupiny 40
<b>CD46</b>	cluster of differentiation 46	diferencia ění skupina 46
<b>CFTR</b>	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	transmembránový regulátor vodivosti
<b>CGKRRK</b>	cysteine-glycine-lysine-arginine-lysine	cystein-glycin-lysin-arginin-lysin
<b>CMV</b>	cucumber mosaic virus	virus mozaiky okurky
<b>CMV-Dox</b>		virus mozaiky okurky nesoucí doxorubicin uvnit ěkapsidy
<b>CPMV</b>	cowpea mosaic virus	virus mozaiky věgny
<b>CPMV-R5</b>		virus mozaiky věgny s ěp ipojeným polyargininovým (R5) CPP peptidem
<b>CPP</b>	cell penetrating peptides	peptidy penetrující do bu ěky
<b>DARPin</b>	designed ankyrin repeat protein	molekuly odvozené od protein s opakujícím se ankyrinovým motivem
<b>Dox</b>	doxorubicin	doxorubicin
<b>DU-145</b>		lidská bun ěná linie rakoviny prostaty
<b>EGF</b>	epidermal growth factor	epidermální r ěstový faktor
<b>EGFR</b>	epidermal growth factor receptor	receptor pro epidermální r ěstový faktor
<b>EGFR<math>\nu</math>III</b>	EGFR mutant $\nu$ III	mutanta EGFR $\nu$ III
<b>EpCAM</b>	epithelial cell adhesion molecule	epiteliální bun ěná adhesní molekula

<b>EPR</b>	enhanced permeability and retention	zvýšená propustnost a zadržení
<b>FA</b>	folic acid	kyselina listová
<b>FA-CMV-Dox</b>		virus mozaiky okurky konjugovaný s kyselinou listovou, naplněný doxorubicinem
<b>Fab</b>	fragment antigen-binding	fragment vázající antigen
<b>FGF2</b>	fibroblast growth factor 2	fibroblastový růstový faktor 2
<b>FGF2-Fab</b>		fragment vázící antigen protilátky proti Ad knoflíku byl konjugován s fibroblastovým růstovým faktorem
<b>FGFR</b>	fibroblast growth factor receptor	receptor pro fibroblastový růstový faktor
<b>FRAP</b>	fluorescence recovery after photobleaching	obnovení fluorescence po fotovyblednutí
<b>Gal</b>	galactose	galaktosa
<b>GalNAc</b>	N-Acetylgalactosamine	N-acetylgalaktosamin
<b>GF</b>	growth factor	růstový faktor
<b>GFR</b>	growth factor receptor	receptor pro růstový faktor
<b>Glu</b>	glucose	glukosa
<b>HeLa</b>		buněčná linie odvozená od rakoviny děložního čípku pacienta Henrietty Lacksové
<b>Her2-AAV</b>		AAV-2 s geneticky upraveným DARPinem pro HER2/ <i>neu</i>
<b>HER2/<i>neu</i></b>	human epidermal growth factor receptor 2	receptor pro lidský epidermální růstový faktor 2
<b>HIV</b>	human immunodeficiency virus	virus lidské imunitní nedostatečnosti
<b>HPV</b>	human papillomavirus	lidský papilomavirus
<b>HSPG</b>	heparan sulfate proteoglycan	heparan sulfátový proteoglykan
<b>HVR5</b>	hypervariable region 5	hypervariabilní oblast 5
<b>JAM1</b>	junctional adhesion molecule 1	adhezní molekula těsných spojů 1
<b>kDa</b>	kilodalton	kilodalton
<b>LacZ</b>		gen pro bakteriální enzym $\beta$ -galaktosidázu
<b>luc-2 gen</b>		gen kódující luciferázu
<b>MCF7</b>		buněčná linie rakoviny prsu
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenylyltetrazolium bromid
<b>MV2</b>		kontrolní virus spalniček bez jednoetazcové protilátky
<b>MV5</b>		virus spalniček nesoucí jednoetazcovou protilátku proti CD38
<b>MV7</b>		virus spalniček nesoucí jednoetazcovou protilátku proti EGFR
<b>NeuNAc</b>	5-N-acetyl neuraminic acid	5-N-acetylneuraminová kyselina
<b>NeuNgc</b>	5-N-glycolyl neuraminic acid	5-N-glykolyneuraminová kyselina
<b>OVCAR-3</b>		buněčná linie lidské rakoviny vaječníku
<b>PEG</b>	polyethylenglycol	polyethylenglykol
<b>pIX</b>	protein IX	protein IX

<b>PCR</b>	polymerase chain reaction	polymerázová et žová reakce
<b>PSMA</b>	prostate specific membrane antigen	prostatický specifický membránový antigen
<b>R5</b>		peptid sestávající z p ti arginin
<b>RAP</b>	receptor-associated protein	protein asociovaný s receptory
<b>RLU</b>	relative light units	relativní sv telné jednotky
<b>RGD</b>	arginine-glycine-aspartate	arginin-glycin-aspartát
<b>SINV</b>	Sindbis virus	Sindbis virus
<b>SK-OV-3</b>		lidská bun ná linie rakoviny vaje níku
<b>StEP</b>	staggered extension process	proces kolísavého prodlužování
<b>SV40</b>	simian virus 40	opi í virus 40
<b>Taq</b>		izolováno z bakterie <i>Thermus aquaticus</i>
<b>TdT</b>	terminal deoxynucleotidyl transferase	terminální deoxynukleotidyl transferáza
<b>Tf</b>	transferrin	transferin
<b>TUNEL</b>	terminal deoxynucleotidyl transferase deoxyuridine triphosphate nick end labeling	zna ení konc vzniklých fragmentací pomocí deoxyuridin trifosfátu p idaného terminální deoxynukleotidyl transferázou
<b>VLPs</b>	virus-like particles	ástice podobné vir m
<b>VP1</b>	viral structural protein 1	virový strukturní protein 1
<b>VP2</b>	viral structural protein 2	virový strukturní protein 2