

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA



DISERTAČNÍ PRÁCE

V OBORU MOLEKULÁRNÍ A BUNĚČNÁ BIOLOGIE, GENETIKA
A VIROLOGIE

**VÝVOJ TERAPEUTICKÉ VAKCÍNY PROTI NÁDORŮM
VYVOLANÝM LIDSKÝM PAPILOMAVIREM 16 - VLIV
MODIFIKACE ANTIGENU E7 NA BUNĚČNOU
IMUNITNÍ ODPOVĚĎ**

Mgr. Jana Macková

Školitel: RNDr. Šárka Němečková, DrSc.
Pracoviště: Ústav hematologie a krevní transfuze

Praha 2007

Prohlašuji, že jsem tuto doktorskou disertační práci vypracovala samostatně, s použitím uvedených pramenů. Dále prohlašuji, že jsem tuto práci ani její podstatnou část dříve nepředložila k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 30.1.2007

Děkuji své školitelce RNDr. Šárce Němečkové, DrSc. za trpělivé vedení mé disertační práce, za cenné rady a připomínky a za vytvoření přátelského pracovního prostředí provázejícího celé mé studium. Dále děkuji RNDr. Ludě Kutinové a také všem svým ostatním kolegům v laboratoři za skvělou pracovní atmosféru a ochotu pomoci. Rovněž děkuji Ing. Petru Šebovi, CSc. z Mikrobiologického ústavu AV ČR a členům jeho pracovního týmu za výbornou spolupráci.

OBSAH

1. ÚVOD.....	6
1.1. Lidské papilomaviry asociované s nádory.....	8
1.1.1. Charakterizace papilomavirů.....	8
1.1.2. Papilomaviry a karcinom cervixu.....	8
1.1.3. Imunitní odpověď proti papilomavirům.....	10
1.1.4. Preventivní vakcíny proti papilomavirům.....	13
1.1.5. Terapeutické vakcíny proti nádorům asociovaným s HPV infekcí	14
1.2. Hodnocení protinádorové imunitní odpovědi.....	19
1.2.1. Humorální imunitní odpověď.....	20
1.2.2. Buněčná imunitní odpověď.....	21
1.2.2.1. Analýza fenotypu.....	23
1.2.2.2. Analýza funkce.....	26
1.2.2.2.1. Sledování produkce cytokinů.....	27
1.2.2.2.2. Sledování proliferace.....	30
1.2.2.2.3. Sledování cytotoxické aktivity.....	32
1.2.2.3. Charakterizace genové exprese.....	36
1.2.2.4. Výběr vhodné metody pro testování účinnosti vakcíny	36
1.3. Adenylát cyklázový toxin <i>Bordetelly pertusis</i>.....	38
1.3.1. Struktura a funkce CyaA.....	39
1.3.2. Použití rekombinantního proteinu CyaA jako vakcíny	42
2. VÝSLEDKY.....	48
2.1. Vliv modifikací genetických vakcín na zvyšování buněčné imunitní odpovědi specifické pro antigen E7 viru HPV-16.....	48
<i>Publikace 1.</i> (příloha) Immune response to E7 protein of human papillomavirus type 16 anchored on the cell surface. Nemeckova S, Stranska R, <u>Subrtova J</u> , Kutinova L, Otahal P, Hainz P, Maresova L, Sroller V, Hamsikova E, Vonka V. <i>Cancer Immunol Immunother.</i> 2002 Apr;51(2):111-9.....	48
<i>Publikace 2.</i> (příloha) Adjuvant effect of dendritic cells transduced with recombinant vaccinia virus expressing HPV16-E7 is inhibited by co-expression of IL12. <u>Mackova J</u> , Kutinova L, Hainz P, Krystofova J,	

Sroller V, Otahal P, Gabriel P, Nemeckova S. <i>Int J Oncol.</i> 2004 <i>Jun;24(6):1581-8</i>	50
Publikace 3. (příloha) Enhancement of immunogenicity of HPV16 E7 oncogene by fusion with <i>E. coli</i> beta-glucuronidase. Smahel M, Pokorna D, <u>Mackova J</u> , Vlasak J. <i>J Gene Med.</i> 2004 Oct;6(10):1092-101.....	51
Publikace 4. (příloha) Combined immunization with DNA and transduced tumor cells expressing mouse GM-CSF or IL-2. Rittich S, Duskova M, <u>Mackova J</u> , Pokorna D, Jinoch P, Smahel M. <i>Oncol Rep.</i> 2005 Feb;13(2):311-7.....	52
Publikace 5. (příloha) Combined immunization with fusion genes of mutated E7 gene of human papillomavirus type 16 did not enhance antitumor effect. Pokorna D, <u>Mackova J</u> , Duskova M, Rittich S, Ludvikova V, Smahel M. <i>J Gene Med.</i> 2005 Jun;7(6):696-707.....	53
Publikace 6. (příloha) DNA vaccines based on chimeric potyvirus-like particles carrying HPV16 E7 peptide (aa 44-60). Pokorna D, Cerovska N, Smahel M, Moravec T, Ludvikova V, <u>Mackova J</u> , Synkova H, Duskova M, Hozak P, Veleminsky J. <i>Oncol Rep.</i> 2005 Oct;14(4):1045-53.....	54
2.2. Konstrukce a testování vakcín na bázi CyaA	55
Publikace 7. (příloha) Prime/Boost Immunotherapy of HPV16-Induced Tumors With E7 Protein Delivered By <i>Bordetella</i> Adenylate Cyclase and Modified Vaccinia Virus Ankara. <u>Mackova J</u> , Stasikova J, Kutinova L, Masin J, Hainz P, Simsova M, Gabriel P, Hamsikova E, Sebo P and Nemeckova S. <i>Cancer Immunol Immunother.</i> 2006 Jan; 55(1):39-46.....	55
3. SOUHRNNÁ DISKUSE	56
4. ZÁVĚR	66
5. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	67

1. ÚVOD

Anglický lékař Edward Jenner (1749-1823) přenesl v roce 1796 materiál získaný z puchýřku dojičky krav nakažené kravskými neštovicemi do ranky v kůži osmiletého chlapce a provedl tak první očkování (vakcinaci) proti variole, viru pravých neštovic. Toto očkování se brzy ukázalo jako velmi účinné a rychle se rozšířilo v Evropě i v Americe. Téměř o 100 let později, v roce 1885 použil francouzský vědec Louis Pasteur jako další očkovací látku oslabený virus vztekliny, který byl schopen chránit proti přirozené infekci. Ve 20. století pak očkovací látky přibývaly velmi rychle a úspěšně chránily pacienty před četnými infekčními onemocněními (záškrta, tetanus, dáivý kašel, dětská obrna atd.). Jednalo se o inaktivované (usmrcené), živé atenuované nebo subjednotkové vakcíny, které obsahovaly pouze určitou složku patogena. Plošným očkováním byly významně potlačeny nebo zcela zlikvidovány mnohé do té doby fatální nemoci. Celosvětového úspěchu bylo dosaženo ve 2. polovině 20. století v programu eradikace pravých neštovic. V roce 1966 přijala Světová zdravotnická organizace (WHO) program eradikace varioly a dne 11. září 1977 byl v somálském přístavu Merca diagnostikován poslední přirozeně infikovaný pacient variolou na světě.

Vakcinace proti infekčním onemocněním je založena na aktivaci imunitního systému pacienta, buď nespecificky nebo podáním upraveného antigenu pocházejícího z patogena, proti kterému je následně vyvolána imunitní odpověď. Na podobném principu je založena i myšlenka imunoterapie nádorů. V tomto případě jsou však cílem imunitního systému vlastní nádorově transformované buňky. Imunoterapie může být pasivní, kdy jsou pacientovi podávány přímo aktivní složky imunity, jako protilátky nebo imunitní buňky (lymfocyty, makrofágy) nebo může být cílem aktivace vlastního imunitního systému pacienta, pak hovoříme o aktivní imunoterapii. Imunoterapie může být též nespecifická, kdy je vyvolána obecná stimulace imunitního systému. Cíleně ji provedl koncem 19. století William Coley, který na základě pozorování spontánního ústupu nádorů u pacientů po horečnatém infekčním onemocnění provedl nespecifickou aktivaci imunitního systému supernatanty z bakteriálních kultur. Metoda se ukázala jako nadějná a později potvrzené adjuvantní účinky některých bakteriálních produktů (především BCG *Mycobacterium bovis* nebo extraktů z *Listeria monocytogenes*) jsou využívány

doposud. Jejich adjuvantní působení proti nádorům spočívá hlavně v aktivaci makrofágů a NK buněk. Moderní adjuvans (např. CpG nebo monofosforyl lipid A) jsou pak pokud možno co nejlépe definovaná. Vzhledem k tomu, že i nádorové buňky mohou být pro imunitní systém rozpoznatelné například tím, že exprimují takové antigeny, které se na povrchu zdravých buněk nevyskytují (virové antigeny nebo zárodečné antigeny, které se v dospělém organismu již neexprimují), lze uvažovat i o specifické imunoterapii nádorů prostřednictvím vakcín obsahujících tyto antigeny. Cílem takových vakcín je pak aktivace efektorových protinádorových mechanismů, které jsou specifické pro antigeny nacházející se v nádorových buňkách.

Imunoterapie je spolu s genovou terapií další vyvíjející se alternativou doposud používané klasické léčby nádorů založené na kombinaci chirurgie, chemoterapie a radioterapie. Situace u pacientů s rozvinutým nádorovým onemocněním je však komplikovaná a z doposud získaných poznatků se prozatím předpokládá využití imunoterapie spíše k léčbě tzv. minimální reziduální nemoci po obvyklé léčbě nádorů, její kombinace s klasickými přístupy nebo použití v časných stádiích vývoje nádorů.

Jedním z onemocnění, které by mohlo být vhodné pro nádorovou imunoterapii je karcinom děložního čípku a jemu předcházející léze. Vznik tohoto onemocnění je totiž blízce spjat s virovou infekcí a v nádorových buňkách jsou exprimovány antigeny lidských papilomavirů. Tyto antigeny (zejména E6 a E7) jsou proto vhodným cílem pro vývoj specifických imunoterapeutických vakcín.

Hlavním předmětem této práce je vývoj modelové terapeutické vakcíny proti nádorům asociovaným s lidským papilomavirem 16 (HPV-16) za použití toxinu CyaA bakterie *Bordetella pertusis* a rovněž studium buněčné imunitní odpovědi vyvolané vakcinací různými typy vakcín namířenými proti antigenu E7 viru HPV-16 u myší.

1.1. Lidské papilomaviry asociované s nádory

1.1.1. Charakterizace papilomavirů

Papilomaviry jsou dsDNA viry s neobalenou kapsidou o průměru 52-55 nm, která je tvořena 72 pentamerickými kapsomerami v ikosahedrálním uspořádání. Řadí se do čeledi Papillomaviridae. Genom papilomavirů tvoří kruhová dvouřetězcová DNA o velikosti přibližně 8000 párů bazí, která kóduje časně regulační geny (E1-E8), z nichž některé (E3, E5, E8) jsou přítomné jen u určitých typů papilomavirů. Dále kóduje pozdní geny strukturní (L1, L2), jejichž produkty vytvářejí kapsidu. Protein L1 má schopnost uspořádat se do prázdných partikulí, které jsou strukturně podobné virovým partikulím, tzv. pseudopartikulí (VLP).

Pro papilomaviry je charakteristická druhová a tkáňová specifita, dosud nebyl zaznamenán jejich mezidruhový přenos. Byly detekovány u lidí (HPV) i u širokého spektra dalších obratlovců (králíci, skot, kočky, papoušci). V současné době je známo více než 100 genotypů lidských papilomavirů a jsou objevovány další. Nový typ papilomaviru je definován na základě větší než 10 % odlišnosti v genu L1 od již klasifikovaných typů. V případě, že jsou odlišnosti v rozmezí 2-10%, jedná se o nový subtyp, je-li rozdíl menší než 2%, jde o variantu již klasifikovaného typu.

Podle typu infikovaného epitelu lze rozlišovat papilomaviry kožní a slizniční nebo je lze nalézt současně v lézích kůže i sliznic. Infikují např. dlaždicový epitel genitálního traktu, anální a perianální oblasti nebo slizniční epitel hrtanu. HPV mohou způsobovat různá benigní (např. dysplasie cervixu, condyloma acuminatum, verruca vulgaris, epidermodysplasia verruciformis, orální papilom, laryngeální, nasální papilomatóza atd.) nebo maligní onemocnění (např. karcinom cervixu, vulvy, penisu, dlaždicový karcinom kůže, ústní dutiny, karcinom hrtanu, jícnu). Podle svého onkogenního potenciálu se dělí na vysoce rizikové typy (např. 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58) a typy nízké rizikové (např. 6, 11, 34, 40, 42, 43, 44, 54, 70, 74).

1.1.2. Papilomaviry a karcinom cervixu

Karcinom děložního čípku (cervixu) je celosvětově druhým nejčastějším nádorovým onemocněním u žen. V roce 2002 bylo registrováno 493,000 nových případů a zemřelo na něj 274,000 pacientek (Parkin et al., 2005). V České republice je ročně diagnostikováno přibližně 1000 nových pacientek s tímto onemocněním a asi 400 žen na něj umírá. Vznik karcinomu cervixu a jemu předcházejících lézí souvisí

s infekcí vysokorizikovými typy papilomavirů, zejména HPV-16 a 18. Jeho vznik bez přítomnosti HPV je rovněž možný, ale je vzácný (Mikyšková, 2003).

Projevy HPV infekce mohou být latentní, subklinické nebo klinické. Latentní virovou infekci je možné zjistit pouze laboratorní detekcí viru, rutinně přítomností papilomavirové DNA. Subklinické projevy infekce je již možné odhalit kolposkopickým, cytologickým nebo histologickým vyšetřením. Latentní a subklinické formy mohou spontánně regredovat. Klinické projevy jsou viditelné pouhým okem. Cervikální léze s maligním potenciálem, tzv. cervikální intraepiteliální neoplázie (CIN) nebo podle novější klasifikace skvamózní intraepiteliální léze (SIL), se v závislosti na pokročilosti označují jako „low grade“ (LSIL, low-grade CIN, CIN I) a „high grade“ (HSIL, high-grade CIN, CIN II, CIN III). Dalším stupněm je pak invazivní karcinom. V případě cervikálního karcinomu se prevalence infekce HPV pohybuje celosvětově kolem 96%, z čehož v 57,4 % případů je zastoupen typ HPV-16 a v 16,6% je přítomen typ HPV-18 (Munoz et al., 2004).

S onkogenní aktivitou lidských papilomavirů jsou spojovány proteiny E5, E6 a E7. Transformační potenciál proteinu E5 je pouze slabý a uplatňuje se zejména v časných fázích rozvoje nádorového onemocnění. Působí na zvýšení buněčné odpovědi na růstové faktory a oslabuje mezibuněčné kontakty epiteliálních buněk. To vede ke zvýšení proliferace a ke snížení kontroly růstu infikovaného epitelu (Bravo, 2004). Dále se podílí na snížení povrchové exprese MHC-I tím, že interaguje s těžkým řetězcem MHC-I a zadržuje ho v Golgiho aparátu (Ashrafi et al., 2006). Aktivita E5 je mnohem významnější u bovinních papilomavirů. U lidí jsou hlavními onkogeny proteiny E6 a E7, které se podílejí na onkogenní transformaci buňky prostřednictvím své interakce s regulačními buněčnými proteiny. Jedním z těchto proteinů je p53, který reguluje buněčný cyklus a kontroluje přechod do apoptózy. Po vazbě k proteinu E6 je p53 označen ubikvitinem pro proteolytickou degradaci a buněčná proliferace jím přestane být kontrolována. Další aktivitou proteinu E6 je indukce telomerázové aktivity v keratinocytech, která v dospělých buňkách obvykle aktivní není a je tak důležitá pro jejich immortalizaci. Dochází k tomu pravděpodobně zvýšením transkripce hTERT, katalytické podjednotky telomerázy (Oh et al., 2001). Protein E7 se váže na další důležitý regulátor proliferace, protein Rb (protein retinoblastoma), který pak nedokáže inaktivovat transkripční faktor E2F, což také vede ke ztrátě kontroly proliferace. Další protein, se kterým E7 viru HPV-16 interaguje a následně spouští jeho proteolytickou degradaci je IGFBP-3 (insulin-like

growth factor binding protein 3). Tento protein je schopen inhibovat proliferaci a indukovat apoptózu. Tato aktivita je vazbou k E7 zrušena (Mannhardt et al., 2000). Exprese onkoproteinů E6 a E7 vede k imortalizaci infikovaných buněk, destabilizaci genomu a vzniku mutací. Zatímco po infekci epitelu, ve kterém dochází ke konečné diferenciaci buněk do stádia keratinocytů, zůstává HPV DNA v epizomální formě, ve slizničním epitelu v pokročilém stádiu onemocnění dochází v oblasti HPV genů E1/E2 k její integraci do genomu. Tím je zrušen represivní vliv E2 na expresi E6 a E7, což vede k jejich zvýšené produkci. Exprese onkoproteinů E6 a E7 však není dostatečná pro vznik nádorového onemocnění a jsou k tomu nutné ještě další změny (tzv. vícestupňová kancerogeneze).

1.1.3. Imunitní odpověď proti papilomavirům

Většina genitálních infekcí způsobených lidskými papilomaviry proběhne asymptomaticky a je odstraněna ještě před vznikem premaligních nebo maligních lézí. V případě HPV-16 je to obvykle do 1 roku po infekci. Eliminace infekce HPV-18 z organismu trvá déle a pacienti s maligními lézemi, kteří jsou pozitivní na HPV-18, mají obvykle horší prognózu. Rovněž u nich většina lézí tzv. nízkého stupně spontánně regreduje. Vzniku rakoviny děložního čípku předchází období perzistentní infekce HPV, během kterého organismus již nedokáže papilomavirovou infekci odstranit. Papilomavirová DNA je pak v transformovaných buňkách přítomna v epizomální formě a/nebo integrovaná do genomu. Obě tyto formy se vyskytují u HPV-16, u HPV-18 byla DNA nalezena pouze integrovaná do genomu.

Imunitní odpověď, která byla vyvolána přirozenou papilomavirovou infekcí je slabá. Příčin je hned několik. Jednak jsou papilomavirové proteiny málo imunogenní, infekce a množení HPV probíhá lokálně v keratinocytech, nemá viremickou fázi a produktivní infekce není lytická a nevyvolává proto ani lokální zánět. Viriony HPV se skládají v diferencovaných epiteliálních buňkách a virové partikule se uvolňují v odlučujících se buňkách. Vysoce rizikové papilomaviry také dokáží ovlivnit mechanismy, které v organismu vznikají jako protivirová ochrana. Jedním z těchto mechanismů je např. signální dráha interferonů I. třídy. Tohoto procesu se účastní proteiny E6 i E7. Bylo zjištěno, že protein E6 viru HPV-16 se váže k transkripčnímu faktoru IRF-3 (interferon regulatory factor 3) a inaktivuje ho (Ronco et al., 1998). Tento transkripční faktor má důležitou roli v regulaci genů pro IFN- α i IFN- β . Další

transkripční faktor IRF-1, který se účastní signalizace IFN- β , je inaktivován prostřednictvím proteinu E7 viru HPV-16 (Park et al., 2000). Ten má též schopnost inhibovat protivirový účinek IFN- α (Barnard et al., 2000). Dalším důsledkem virové infekce je snížení exprese molekul MHC-I. Bylo zjištěno, že protein E7 virů HPV-16 i HPV-18 je schopen represe promotoru těžkého řetězce MHC-I, takže virem napadené buňky nejsou rozpoznávány prostřednictvím CTL. Protein E7 viru HPV-18 je navíc schopen inhibovat transkripci genu LMP2, kódujícího proteazomální protein, který zvyšuje degradaci cytoplazmatických proteinů a TAP1, který je důležitý pro přenos peptidů z cytoplazmy do endoplazmatického retikula pro vazbu k MHC-I (Georgopoulos et al., 2000). Imunitní odpověď může být inhibována i díky zvýšení exprese TGF β -1, která koreluje s expresí proteinu E7 viru HPV-16 (Xu et al., 2006). Nedávno bylo rovněž zjištěno, že v lidských primárních epiteliálních buňkách byla po infekci HPV-16 snížena transkripční aktivita TLR-9. Zodpovědné za to byly zřejmě proteiny E6 a E7. Mohlo by se tak jednat o možný mechanismus, kterým vysoce rizikové typy papilomavirů potlačují nespecifickou imunitní odpověď (Hasan, 2006). Pokud není HPV z organismu odstraněn, může dojít k nádorové transformaci buněk. Ve většině případů si však nakonec imunitní systém s HPV infekcí poradí. Vzniká lokální buněčná imunitní odpověď a jsou produkovány sérové neutralizační protilátky. Ty vznikají proti strukturním i nestrukturním virovým proteinům. Proti kapsidovému proteinu L1 viru HPV16 jsou protilátky produkovány obvykle mezi 4 měsíci a 5 lety po primární infekci, avšak některé infikované ženy měřitelnou hladinu protilátek nemají (Carter et al., 2000). Protilátky proti E7 byly detekovány v mnohem větší míře u pacientek s invazivním karcinomem cervixu (Jochmus-Kudielka et al., 1989). Buněčná imunitní odpověď proti přirozené HPV infekci je poměrně málo prostudovaná, její význam je však zřejmě zásadní. Např. maligní a premaligní léze spojené s HPV jsou častější u imunosuprimovaných jedinců (Hawes et al., 2006) a v ustupujících genitálních lézích byla zjištěna infiltrace makrofágů a CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocytů (Coleman et al., 1994). Co se týče charakterizace imunitní odpovědi u pacientů s nádorovým onemocněním vyvolaným papilomaviry, podíl pacientů s karcinomem cervixu, u kterých byly detekovány CTL specifické pro antigeny HPV-16 se liší v jednotlivých studiích (18-100%) (Valdespino et al., 2005). Lze však říci, že CTL specifické pro HPV-16 jsou u pacientů obvykle přítomny, i když v malém množství. Rozvoji onemocnění pak zřejmě napomáhají další imunologické deficity, které brání vzniku účinné buněčně zprostředkované odpovědi. Bylo např.

zjištěno, že u pacientů s chronickou infekcí HPV-16 nebo s cervikálním karcinomem je narušená CD4⁺ Th1 imunitní odpověď proti časným nestrukturním papilomavirovým antigenům E2 a E6 (de Jong et al., 2004). Zajímavé je, že nebyly nalezeny odlišnosti ve velikosti indukované Th1 imunity specifické pro antigen L1 viru HPV-16 u zdravých lidí, kteří se v minulosti setkali s papilomavirovou infekcí a u pacientek s karcinomem cervixu. Mechanismy regulace imunity proti L1 jsou tak zřejmě odlišné od regulace odpovědi proti antigenům E2 a E6 (van Poelgeest et al., 2006). V porovnání s HPV-16, je u HPV-18 Th1 imunita proti E6 u zdravých osob nižší a rovněž nebyla nalezena u maligních pacientů (Welters et al., 2006).

V současné době je všeobecně přijímaná teorie, že pro eliminaci nádorových buněk z organismu je nutný dobře fungující imunitní systém, který prostřednictvím mechanismů založených především na buněčné imunitě, zejména na cytotoxických T-lymfocytech a NK buňkách, rozpoznává a odstraňuje nádorově transformované buňky. Humorální imunita reprezentovaná B-lymfocyty hraje v tomto procesu minoritní úlohu. Tento koncept se nazývá „**immunosurveillance**“ a navrhli ho MacFarland Burnet a Lewis Thomas v 50.-tých letech 20. století. Nádorové buňky však mají různé mechanismy, pomocí kterých dokáží imunitnímu systému uniknout. Kromě imunomodulačních a imunosupresivních účinků (např. lokální produkce imunosupresorických látek, indukce anergie nebo apoptóza CTL) jsou velmi časté defekty v prezentaci antigenů prostřednictvím MHC molekul I. třídy a snížená exprese molekul MHC-I, která byla detekována cca u 70-90% pacientů s cervikálním karcinomem (Koopman et al., 2000). Za tyto jevy jsou zodpovědné molekulární mechanismy, které zahrnují mutace v β_2 -mikroglobulinu nebo v těžkém řetězci MHC a změny v expresi proteinů zahrnutých do procesu zpracování antigenů. Nová možná strategie, která by mohla zabránit úniku MHC-I defektních nádorových buněk imunitní kontrole, by mohla být založena na nedávno objevených cytotoxických T-lymfocytech specifických pro soubor peptidových epitopů, které se objevují na molekulách MHC-I na povrchu buněk s poškozenou funkcí TAP, tapasinu nebo proteazómů. I když je úroveň exprese molekul MHC-I na těchto buňkách velmi nízká, je pro zmiňované specifické CTL nezbytná. Jelikož tyto epitopy nejsou prezentovány na normálních buňkách, mohly by být využity pro peptidovou vakcinaci nebo adoptivní přenos T-buněk specifických pro nádorové buňky s poškozenou funkcí zpracování peptidů (van Hall et al., 2006).

Koncept terapeutické vakcinace proti nádorům má za úkol vyvolat imunitní

odpověď proti nádorově transformovaným buňkám. Výhodné je to zejména v případě nádorů asociovaných s virovou infekcí, kde se nádorové antigeny nenacházejí v normálních buňkách. V tom případě je možná i preventivní vakcinace, kdy jde hlavně o vyvolání neutralizačních protilátek proti viru a jeho eliminaci z organismu ještě před zahájením nádorové transformace.

1.1.4. Preventivní vakcíny proti papilomavirům

V současné době jsou již pro klinické použití dostupné dvě preventivní vakcíny proti papilomavirům, které jsou obě založené na pseudopartikulích (VLP, virus-like particle) tvořených kapsidovými proteiny různých typů papilomavirů. Tyto pseudopartikule jsou schopné vyvolat vznik vysoce specifických neutralizačních protilátek a zabránit tak virové infekci. Bohužel nejsou schopné ovlivnit již probíhající infekci určitým typem papilomaviru, dokáží však vyvolat neutralizační protilátky proti jiným typům papilomavirů obsaženým v pseudopartikulích. Jednou ze zmiňovaných vakcín je **GardasilTM** firmy Merck (USA). V Evropské unii byla tato vakcína schválena pod názvem SILGARD. Gardasil je kvadrivalentní rekombinantní vakcína, která obsahuje kapsidový protein L1 papilomavirových typů 6, 11, 16 a 18. Jednotlivé typy HPV jsou v jedné dávce zastoupeny v uvedeném pořadí v poměru 20/40/40/20 µg. Vakcína slouží pro prevenci karcinomu cervixu a některých dalších onemocnění vyvolaných lidskými papilomaviry typu 16 a 18 (vulvární a vaginální prekancerózní léze) a rovněž pro prevenci genitálních bradavic způsobených HPV typy 6 a 11. Téměř 100% účinnost Gardasilu byla prověřena ve čtyřech placebo-kontrolovaných, dvojité slepých, randomizovaných klinických studiích ve fázi II a III. Celkem bylo ve fázi II a III sledováno 20 541 žen ve věku od 16 do 26 let, po dobu až 5-ti let. Celková délka ochrany a nutnost případné revakcinace však doposud není známa. Vzhledem k tomu, že se jedná o sexuálně přenosnou infekci, je ideální doba pro vakcinaci ještě před možným stykem s HPV, tedy u mladých dívek. Bylo zjištěno, že dívky ve věku 9-15 let odpovídaly na vakcínu obdobně jako ženy ve věku 16-26 let, proto je vakcína určena právě pro dívky v tomto věku. Vakcína se podává v adjuvans alum (aluminium hydroxyfosfát sulfát) intramuskulárně ve 3 dávkách, v průběhu 6 měsíců a cena jedné dávky byla stanovena na 120\$. O něco později by měla být dostupná i vakcína firmy GlaxoSmithKline (Belgie), která byla nazvána **CervarixTM**. Cervarix obsahuje pouze HPV typů 16 a 18 a je podáván

v adjuvans AS04, tvořeným aluminium hydroxidem a monofosforyl lipidem A, což je syntetický derivát lipopolysacharidů. Na rozdíl od vakcíny Gardasil, která je připravována v kvasinkovém systému (*Saccharomyces pombe*), jsou pseudoviriony vakcíny Cervarix tvořeny proteiny produkovanými v bakulovirovém expresním systému. VLP obou typů HPV jsou vytvořeny odděleně a následně jsou zkombinovány v poměru 1:1.

Další výzkum v oblasti profylaktických vakcín proti HPV se nyní soustředí na vývoj vakcín druhé generace, které by měly být zaměřené na další typy HPV, na snížení výrobních a distribučních nákladů (produkce v rostlinách, produkce kapsomer v *E.coli*, stabilizace partikulí, nasální a orální vakcíny) a na produkci kombinovaných vakcín (chimerické partikule, kombinace s terapeutickými vakcínami). Výzkum je rovněž zaměřen na imunizaci polypeptidem L2, který je schopen indukovat křížově neutralizační protilátky, tedy L2 jednoho typu HPV je schopen indukovat protilátky i proti jiným typům HPV. Titry těchto protilátek jsou však výrazně nižší než titry protilátek indukovaných VLP, které jsou však zase vysoce specifické pro daný typ HPV (Pastrana et al., 2005). Imunogenita L2 je v současné době předmětem studia, protože v případě imunizace DNA vakcínou nesoucí gen L2 byla vyvolána velice slabá protilátková odpověď, která je křížově neutralizační pouze v případě, že je L2 součástí VLP (Hitzeroth, 2006).

1.1.5. Terapeutické vakcíny proti nádorům asociovaným s HPV infekcí

Vzhledem k tomu, že současné metody pro léčbu premaligních a maligních lézí asociovaných s HPV neléčí všechny pacientky a také proto, že velkou část populace tvoří ženy, které nejsou cílovou skupinou pro vakcinaci preventivními vakcínami, je stále velmi aktuální vývoj terapeutické vakcíny. Na rozdíl od preventivních vakcín nebyla doposud schválena žádná terapeutická vakcína, která by mohla být použita pro terapii karcinomu cervixu a jemu předcházejících lézí u lidí. Různé typy vakcín se však stále vyvíjejí a testují. Jejich hlavním cílem je vyvolat a posílit imunitní odpověď proti papilomavirovým antigenům, která by vedla k likvidaci buněk, které je exprimují. Jako cílové antigeny jsou nejčastěji používány proteiny E6 a E7, neboť jsou exprimovány v buňkách většiny HPV karcinomů (jedná se o antigeny asociované s nádory, TAA), nejsou přítomné v normálních buňkách a jsou

nezbytné pro buněčnou transformaci a udržování transformovaného fenotypu. Proto je také nepravděpodobné, že by mechanismus úniku imunitě nádorových buněk probíhal přes ztrátu exprese těchto antigenů. Kapsidové proteiny L1 a L2 nejsou primárním cílem terapeutických vakcín, protože se nacházejí jen v terminálně diferencovaných epiteliálních buňkách a nikoliv v proliferaujících buňkách premaligních a maligních lezí (Longworth and Laimins, 2004). Po vakcinaci papilomavirovými pseudopartikulami nebo kapsomerami však proti nim také vzniká CTL odpověď a *in vivo* ochrana před nádory exprimujícími L1 (Ohlschlager et al., 2003). Pseudopartikel je možné použít také jako kombinovanou vakcínu pro terapii i prevenci papilomavirové infekce, neboť je lze využít pro dopravu časných antigenů. Bylo zjištěno, že chimerická vakcína skládající se z pseudopartikulí HPV-16 a proteinu E7 je schopna chránit myši před nádory TC-1, které exprimují E7, i indukovat neutralizační protilátky proti virovým kapsidám (Greenstone et al., 1998). Opakovaná vakcinace chimérickými VLP s cílem navodit buněčnou imunitu proti dopravovanému časnému antigenu ale z důvodu existence neutralizačních protilátek proti kapsidovým proteinům vyvolaných předchozí vakcinací není efektivní (Da Silva et al., 2001). Časné papilomavirové antigeny jsou podávány v různých formách, např. pomocí živých vektorů, ve formě peptidů nebo proteinů, ve formě nukleové kyseliny nebo prostřednictvím buněčných a rostlinných vakcín. Používají se celé proteiny nebo jejich části a využívají se jejich různé modifikace. Některé vakcinační přístupy byly úspěšné v preklinických modelech a další jsou již testovány v klinických studiích fáze I a II.

Výhodou virových vektorů je jejich vysoká imunogenita, nevýhodou např. jejich potenciální nebezpečnost nebo preexistující virová imunita. Z tohoto důvodu se vyvíjejí atenuované virové vektory, které mají ale mnohdy sníženou imunogenitu. Imunita proti používanému virovému vektoru se dá částečně překlenout pomocí „prime-boost“ vakcinační strategie, tedy kombinací heterologních vakcín nesoucích stejný antigen. Vhodným virovým vektorem je rekombinantní **virus vakcínie** (rVV), na kterém je založena např. vakcína **TA-HPV** firmy Xenova Research Ltd. Vakcína TA-HPV kóduje proteiny E6 a E7 virů HPV-16 a HPV-18 a je testována na pacientech s cervikálním karcinomem (Kaufmann et al., 2002) i s dalšími onemocněními asociovanými s infekcí HPV jako je anogenitální intraepiteliální neoplázie (Fiander et al., 2006) nebo vulvární a vaginální intraepiteliální neoplázie (Baldwin et al., 2003). Také vakcína **TG4001** (Transgene) exprimující HPV-16 E6,

E7 a IL-2 je založena na viru vakcínie, konkrétně na nereplikujícím se kmeni MVA. V současné době byla skončena II. fáze klinických zkoušek TG4001 na pacientkách s HPV16 CIN2/3 a byly naznačeny dobré výsledky (Brun, 2006). Zajímavý je i virus MVA, který exprimuje protein E2 a který rovněž prochází II. fází klinických zkoušek pro léčbu CIN2/3 (Garcia-Hernandez et al., 2006). Dalšími používanými virovými vektory jsou např. replikačně defektní rekombinantní **adenoviry** (He et al., 2000) nebo rekombinantní **adeno-asociované viry** - rAAV (nesoucí např. HPV16-E7 fúzaný s proteinem teplotního šoku HSP-70 *M. tuberculosis* (Liu et al., 2000)). Na zvířecích modelech se dále testují **alfavirové vektory**, které kódují heterologní antigeny ve formě RNA. Jedná se např. o Semliki Forest virus (SFV) nesoucí HPV-16 E6/E7 (Riezebos-Brilman et al., 2005), Sindbis virus (SIN) (Cheng et al., 2002) nebo Venezuelan equine encephalitis (VEE) virus, jehož nereplikující se částice nesou fúzní geny E6/E7 s několika bodovými mutacemi, které slouží pro inaktivaci onkogenního potenciálu fúzního proteinu (Cassetti et al., 2004). Vysoce imunogenní jsou také vakcíny založené na **atenuovaných bakteriálních vektorech**, např. *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella*, *Escherichia coli*. Jejich nevýhody jsou podobné jako u virových vektorů.

Peptidové vakcíny, které závisí na typu HLA pacienta, jsou zaměřené zejména na alely HLA-A2, které se podle různých studií vyskytují u 40-58 % Kavkazské (bělošské) populace (<http://www.allelefrequencies.net>). Jejich hlavní výhoda je bezpečnost a snadná produkce, bohužel jsou však slabě imunogenní a v klinických studiích prozatím nebyly příliš úspěšné. Zvýšení jejich imunogenity se dosahuje nejlépe pomocí molekulárně definovaných adjuvans aktivujících dendritické buňky, jako např. (ODN)-CpG (imunostimulační CpG oligodeoxynukleotidy), MPL (monofosforyl lipid A), protilátka antiCD40, ISCOMs (immune stimulating complexes), GM-CSF nebo VSSP (very small size proteoliposomes) pocházející z membránových proteinů *Neisseria meningitidis* (Torrens et al., 2005). Vyšší imunogenity než po podání samotného CTL epitopu HPV-16 E7₄₉₋₅₇ v adjuvans IFA (nekompletní Freundovo adjuvans) bylo dosaženo imunizací 35 aminokyselin dlouhým peptidem E7₄₃₋₇₇ s adjuvans (ODN)-CpG. U myši s již hmatnými modelovými nádory došlo po podání tohoto peptidu, který obsahoval kromě CTL i Th epitop, ke zvýšení množství CTL specifických pro E7 a zmenšení nádorů (Zwaveling et al., 2002). Vakcinace dlouhými peptidy vedla ke zmenšení nádorů i u jiného typu preklinického modelu pro terapii HPV onemocnění, který používá virus CRPV

(cottontail rabbit papillomavirus) a jako modelový organismus králíky. V tomto případě byli králíci vakcinováni směsí překrývajících se peptidů o délce 30 AK, které byly odvozené od antigenů E6 a E7 CRPV s adjuvans (ODN)-CpG a Montanide ISA 51 (Vambutas et al., 2005). V současné době byly s imunizací „dlouhými peptidy“ (30-35 AK), pocházejícími z HPV-16 E6 a E7, zahájeny klinické testy fáze I/II (Kenter, 2006). Použitím jiného typu adjuvans bylo dosaženo i zvýšení imunogenity CTL epitopu E7₄₉₋₅₇. Pokud byl podán v adjuvans VSSP (very small size proteoliposomes), došlo rovněž k vymizení hmatných nádorů u myši (Torrens et al., 2005). K vymizení hmatných nádorů u myši došlo rovněž po podání jediné dávky lipozomů obsahujících peptidy HPV-16 E6/E7 fúzované se sekvencí PADRE, která obsahuje univerzální CD4 epitopy, a adjuvans CpG (Daftarian, 2006), (Daftarian et al., 2006).

Použití vakcíny složené z několika peptidů ve vhodném adjuvans je lepší z důvodu rozdílnosti HLA antigenů u lidských pacientů. Na typu HLA pacienta jsou pak méně závislé **vakcíny proteinové**, které ale obvykle rovněž slabě aktivují buněčnou imunitu. Jejich imunogenita může být zvýšena např. fúzí s jinými proteiny a použitím vhodného adjuvans. Mezi proteinové vakcíny, které procházejí klinickými testy patří např. **TA-CIN**, což je fúzní protein HPV-16 L2/E6/E7, vyvinutý firmou Xenova Research Ltd, dále **CerVax16**, což je fúzní protein HPV-16 E6/E7 podávaný s adjuvans ISCOMATRIX, firmy CSL Limited, který se testuje na pacientkách s CIN (Frazer et al., 2004) nebo proteinová vakcína **hspE7**, tvořená fúzním proteinem *Mycobacterium bovis* BCG hsp65 (heat shock protein) a HPV-16 E7, firmy Nventa Biopharmaceuticals Corp. (dříve Stressgen Biotechnologies Corp.) (www.nventacorp.com).

Dalším typem vakcín jsou velmi slibné **DNA vakcíny**. Relativně úspěšné byly např. klinické testy DNA vakcíny **Amolimogene** (fáze I/II) firmy MGI PHARMA (dříve ZYC101 firmy ZYCOS) obsahující části genů E6 a E7 virů HPV-16 a HPV-18 (Garcia et al., 2004) podávané intramuskulárně ve formě mikroparticulí pacientkám s CIN2/3. Do konce roku 2006 měla být dokončena registrace pacientů pro hlavní III. fázi testů. V preklinických modelech byla imunogenita DNA vakcín zvýšena např. pomocí optimalizace kodónů vedoucí ke zvýšení translace proteinu E7 i E6 (Lin et al., 2006). Zajímavé jsou rovněž strategie zaměřené na prodloužení života profesionálních buněk prezentujících antigen, které jsou cílem DNA vakcinace. Jednou z možností je podávání DNA vakcíny v kombinaci s antiapoptotickými geny. Bylo vyzkoušeno

např. současné podání DNA vakcíny kódující fúzní gen Sig/E7/LAMP a DNA vakcíny kódující antiapoptotický gen Bcl-xL, Bcl2, XIAP nebo dominantně negativní kaspázu 8 nebo 9. Největšího zesílení specifické imunitní odpovědi a protinádorového efektu bylo dosaženo v kombinaci s Bcl-xL (Kim et al., 2003). Další strategií je současné podání DNA vakcíny proti HPV a siRNA namířených proti klíčovým proapoptotickým genům Bak a Bax (Kim et al., 2005).

Vyvíjejí se i **buněčné vakcíny**, z nichž některé se klinicky testují. Jednou z těchto studií je např. imunizace 15 pacientů s cervikálním karcinomem **dendritickými buňkami** (DC) pulsovanými rekombinantními proteiny HPV-16 E7 nebo HPV-18 E7 (Ferrara et al., 2003). Výsledky této pilotní studie potvrdily vznik T-buněčných odpovědí u části pacientů, avšak žádné klinické zlepšení. V modelových systémech se dále zkouší např. infekce DC rekombinantními adenoviry koexprimujícími HPV antigeny a další molekuly, např. kostimulační receptory a/nebo ligandy T-lymfocytů. Exprese 4-1BB ligandu zvýšila expresi CD80 a CD86 v DC a zvýšila CTL odpověď specifickou pro HPV-16 E7, stejně jako koexprese RANK/RANKL, T kostimulačních molekul RANKL/CD40L a kostimulačních molekul dendritických buněk RANK/CD40 (Wiethe et al., 2003).

Na inhibici růstu nádorů má vliv i podávání cytokinů (např. IL-12, IL-2, GM-CSF), které se testuje na myších modelech i v klinických studiích. IL-12 podporuje produkci IFN- γ a Th-1 odpověď, IL-2 je růstovým faktorem T-lymfocytů a GM-CSF je nezbytný pro zrání a funkčnost dendritických buněk jako buněk prezentujících antigen. Ve druhé fázi klinické studie byl zjištěn pozitivní vliv IL-12 na buněčnou imunitu u pacientek s rozvinutým cervikálním karcinomem, avšak bez klinického efektu (Wadler et al., 2004). Cytokiny mohou být podávány lokálně ve formě proteinu nebo mohou být produkovány z expresních vektorů (adenoviry, rVV, DNA). Protinádorový efekt u myši vyvolalo také podání **nádorových buněk** transformovaných HPV a transdukovaných genem pro GM-CSF (Chang et al., 2000) nebo IL-2 (Indrova et al., 2002).

Zajímavou možností jsou i **vakcíny rostlinné**, např. imunizace myši listovými extrakty *Nicotiana benthamiana*, které exprimují HPV-16 E7 (Franconi et al., 2006).

Kromě již zmíněných způsobů používaných pro zvyšování účinnosti vakcín (adjuvans, optimalizace kodónů, kombinace s antiapoptotickými nebo kostimulačními geny, cytokiny), může být imunogenita nádorového antigenu zvýšena např. fúzí s dalším proteinem nebo jeho částí, který je schopný zvýšit účinnost zpracování,

stabilitu nebo změnit buněčnou lokalizaci antigenu. Např. po fúzi E7 se signální, transmembránovou a cytoplazmatickou částí LAMP-1 (lysosome-associated membrane protein 1) je E7 směřován do endozomálního a lyzozomálního kompartmentu a je zvýšena jeho prezentace prostřednictvím MHC-II (Wu et al., 1995). Fúzí s γ -tubulinem je antigen E7 směřován do centrozómu bohatého na proteazómy, což zvyšuje jeho proteazomální degradaci a následně prezentaci prostřednictvím MHC-I (Hung et al., 2003). U vakcín založených na viru vakcínie (Hsieh et al., 2004) nebo DNA (Cheng et al., 2005) byla protinádorová odpověď zvýšena fúzí E7 s kalretikulinem, proteinem endoplazmatického retikula, který zesiluje MHC-I prezentaci E7. Dále byly vytvořeny účinné fúzní geny např. s beta-glukuronidázou *E.coli* (GUS) (Smahel et al., 2004) nebo s proteinem teplotního šoku HSP70 (Chen et al., 2000b), (Pokorna et al., 2005).

Další možností jak zvýšit účinnost vakcín a zároveň obejít nebezpečí působení protilátek proti vektoru vyvolaných vícenásobnou imunizací, je opakované podání antigenu prostřednictvím „prime-boost“ způsobu imunizace. Značný protipapilomavirový efekt měla například kombinace DNA (prime) a viru vakcínie (boost) (Chen et al., 2000a) nebo kombinace replikačně defektního Sindbis viru (prime) a rVV (boost) (Lin et al., 2003). V naší laboratoři jsme úspěšně použili kombinaci toxoidu CyaA *Bordetelly pertusis* a rVV (Mackova et al., 2006).

V preklinických modelech a v některých klinických studiích bylo dosaženo značných úspěchů a některé modelové vakcíny jsou již dokonce schopné u myši vyléčit i poměrně velké nádory. Velmi zajímavé proto budou výsledky dosažené s takovými vakcínami v klinických studiích.

1.2. Hodnocení protinádorové imunitní odpovědi

Účinnost imunoterapeutických protinádorových vakcín v klinických studiích i v experimentálních modelových systémech je obvykle hodnocena na základě sledování remise nádorů, avšak pro charakterizaci vakcíny je rovněž důležité sledování indukované protinádorové imunitní odpovědi. Za nejvýznamnější složku protinádorové imunity jsou v současné době považovány efektorové buňky specifické imunity, CD8⁺ cytotoxické T-lymfocyty (CTL), které specificky rozeznávají peptid prezentovaný prostřednictvím molekul MHC-I. Důležité jsou dále efektorové buňky nespecifické imunitní odpovědi, zejména NK, NKT buňky, neutrofilní granulocyty a

aktivované makrofágy a význam mají i $CD4^+$ pomocné Th lymfocyty a protilátky. Protinádorová odpověď imunitního systému je dále ovlivňována regulačními T-lymfocyty (T-reg), které jsou v poslední době stále intenzivněji studovány.

1.2.1. Humorální imunitní odpověď

Humorální imunita, která zřejmě není pro protinádorovou odpověď příliš významná, je obvykle hodnocena na základě přítomnosti protilátek specifických pro antigen v séru. K jejich detekci se používají různé metody, jejichž společným základním principem je **reakce antigenu a protilátky** (receptor-ligand). Nejběžněji používanou metodou je asi **ELISA** (**e**nzyme-**l**inked **i**mmuno**s**orbent **a**ssay). ELISA využívá vznik specifické barevné reakce tekutého substrátu, která je vyvolaná enzymem (např. křenová peroxidáza) konjugovaným s protilátkou. Testované sérum (krev) je aplikováno na plastový povrch jamky mikrotitrační destičky, na kterém je navázaný příslušný purifikovaný antigen. Specifická reakce sérových protilátek s antigenem je vizualizovaná pomocí sekundární protilátky (např. proti IgG, IgA, IgM nebo IgE) konjugované s enzymem. Po odmytí nenavázané protilátky a přidání substrátu enzymu dojde v jamkách, ve kterých jsou přítomny protilátky specifické pro antigen, k barevné změně substrátu. Množství příslušné protilátky ve vzorku je obvykle kvantifikováno automaticky pomocí čtečky, tzv. „ELISA-readeru“. Nevýhodou metody ELISA je velká spotřeba reagensů.

Některé další dnes používané metody využívají **průtokovou cytometrii**. Základem jsou velikostně definované kuličky pokryté antigenem, na který se naváží specifické sérové protilátky, které se pomocí sekundární protilátky fluorescenčně označí a analyzují na průtokovém cytometru. Na podobném principu pracuje také technologie **multi-plex**, která využívá systém Luminex 100. Fluorescenčně značené polystyrénové mikročástice o velikosti 5,6 μm s kovalentně navázanými antigeny se inkubují s testovaným sérem a pomocí biotinylovaných sekundárních protilátek a fluorescenčně značeného streptavidinu (jiná značka než byla použita na označení mikročástic) jsou pak identifikovány dvojitě značené mikročástice. Pro jeden vzorek lze najednou použít až 100 druhů mikročástic s různými antigeny, což šetří biologický materiál. Spotřební materiál a zejména pak přístroj na měření jsou však značně nákladné. Tento test může být použit v kompetitivním uspořádání např. pro současnou detekci protilátek proti několika typům papilomavirů. Základem jsou fluorescenčně

značené známé protilátky, které soutěží s protilátkami přítomnými v séru o vazbu k epitopům na papilomavirových VLP částicích, které jsou navázané na mikročásticích (Opalka et al., 2003).

Další metodou je **neutralizační test**. Tento test je rovněž možné použít pro detekci neutralizačních protilátek proti papilomavirům. Využívá pseudoviriony, které nesou reportérový gen pro sekretorickou alkalickou fosfatázu. Po infekci vhodných buněk v tkáňové kultuře pseudoviriony je alkalická fosfatáza produkována do média a její množství je stanoveno chemiluminiscencí nebo barevnou reakcí. Po inkubaci se sérem zabrání specifické neutralizační protilátky vstupu pseudovirionů do buněk a tedy i produkci alkalické fosfatázy (Pastrana et al., 2004). Neutralizační testy jsou pracné, nákladné a prozatím nepříliš používané. Používanější je např. specifický a citlivý test **kompetitivní RIA** (radioimmunoassay), který však pracuje s radioaktivně značeným materiálem vyžadujícím speciální bezpečnostní opatření a je také poměrně nákladný. K dalším metodám patří např. **imunoblot**, kdy je antigen nebo protilátka otištěna na membráně.

Sérové protilátky mohou být využity také pro identifikaci nádorových antigenů. Slouží k tomu systém **SEREX** (**Ser**ological identification of antigens by recombinant **expression cloning**), což je kombinace serologické analýzy a technik pro klonování antigenů. Tento systém byl vyvinut skupinou M. Pfreundschuhe (University of the Saarland, Homburg, Německo) (Sahin et al., 1995). Na základě mRNA izolované z nádoru je vytvořena expresní cDNA knihovna, která je exprimována v bakteriích. Za použití pacientova séra jsou pak izolovány a sekvenovány klony, které produkují proteiny reagující s protilátkami séra. Pozitivní sekvence jsou následně konfrontovány s DNA databázemi. V roce 1997 byla vytvořena databáze „SEREX“, která byla v roce 2002 nahrazena novou databází CID (Cancer Immunome Database). Cílem CID je popsat všechny genové produkty, proti kterým byl dokumentován vznik imunitní odpovědi u pacientů s nádory, bez ohledu na techniku použitou pro získání těchto informací.

1.2.2. Buněčná imunitní odpověď

Studium buněčné imunity je z důvodu značné fenotypové i funkční heterogenity buněčných populací podstatně složitější než sledování humorální imunity a v souvislosti s aktivní imunoterapií nádorů je zaměřeno zejména na sledování

specifických T-lymfocytů.

Pro hodnocení buněčné imunity se v současné době používají různé imunologické metody, které zahrnují *in vivo* a *in vitro* fenotypové a funkční testy a rovněž molekulárně genetické přístupy (např. PCR, RT-PCR v reálném čase, DNA čipy).

I. Příprava buněk pro testování buněčné imunitní odpovědi

Pro testy *in vitro* je jako nejdůležitější zdroj lymfoidních buněk u lidí používána periferní krev. Dalšími zdroji jsou např. nádory, mízní uzliny a DTH (delayed-type hypersensitivity) místa. U myši je nejpoužívanějším zdrojem lymfoidních buněk slezina a mízní uzliny. Pro testy, které nepoužívají periferní krev, je třeba z příslušné tkáně nejprve vytvořit jednobuněčnou suspenzi, která se pak použije pro oddělení příslušných typů buněk. Pro separaci se používají různé metody. Pro některé aplikace stačí odstranění **erytrocytů** v přítomnosti chloridu amonného, který lyzuje erytrocyty a má minimální vliv na lymfocyty. Další možností separace je **gradientová centrifugace**, která buňky rozdělí podle jejich hustoty. Buněčná suspenze se podvrství roztokem Ficoll-Hypaque a centrifuguje. Na základě rozdílných hustot se na dno zkumavky dostanou erytrocyty a granulocyty, v supernatantu nad vrstvou Ficoll-Hypaque zůstanou krevní destičky a na povrchu vrstvy Ficoll-Hypaque se vytvoří prstenec mononukleárních buněk (lymfocyty, monocyty). Chceme-li lymfocyty oddělit od monocytů a makrofágů, je třeba zařadit krok adherence na plastový povrch, po kterém lymfocyty zůstanou v roztoku, kdežto monocyty a makrofágy adherují. Jednotlivé složky mononukleárních buněk lze odstranit také za použití **bivalentních protilátek** namířených proti erytrocytům a proti markeru toho typu buněk, který chceme odstranit (např. CD3 proti T-lymfocytům, CD19 proti B-lymfocytům). Po Ficoll-Hypaque centrifugaci pak bude příslušná populace ve frakci erytrocytů na dně zkumavky. Jinou možností je separace požadované populace fluorescenčně označené protilátkami, pomocí speciálního typu **průtokového cytometru**, který je vybaven tzv. **sorterem**. Tímto způsobem lze získat vysoce čistou populaci. Metoda je však časově náročná a vyžaduje speciální typ cytometru. Buněčné subpopulace lze separovat dále např. za použití pozitivní (izolace požadovaných buněk) nebo negativní (odstranění kontaminujících buněk) imunomagnetické selekce **MACS** (magnetic cell sorting), která využívá magnetických partikulí pokrytých příslušnou protilátkou. Buňky s navázanou protilátkou jsou pak zachyceny v koloně

umístěné v magnetickém poli. V dnešní době se používají automatické magnetické sortery, které jsou schopné roztřídit až několik milionů buněk/sec. Pro kontrolu účinnosti metody je vhodné získanou buněčnou populaci analyzovat průtokovou cytometrií.

II. Metody pro testování buněčné imunitní odpovědi

1.2.2.1. Analýza fenotypu

Mnohobarevná průtoková cytometrie

Analýza průtokovou cytometrií patří v současné době k nejběžnějším postupům v imunologii. Slouží pro odlišení a kvantifikaci (případně separaci) buněčných subpopulací prostřednictvím fluorescenčně značených protilátek namířených proti povrchovým nebo intracelulárním markerům specifickým pro jednotlivé typy buněk. Současně je možné použít až 17 fluorescenčních značek, tedy odlišit až 17 různých buněčných markerů (Perfetto et al., 2004). Průtoková cytometrie se v nádorové imunologii nejčastěji využívá pro detekci buněčných populací (např. B, T-lymfocyty, NK buňky) a jejich subpopulací (např. detekce T-lymfocytů specifických pro antigen) a k charakterizaci stádia buněčné diferenciaci (např. rozlišení naivních, paměťových a efektorových T-lymfocytů) a aktivace (např. CD69). Kromě povrchových fenotypických markerů lze označit i markery funkční, např. cytokiny produkované a zadržené v buňkách (např. IFN- γ , IL-2, TNF- α , MIP-1 β), molekulu CD107, která je markerem degranulace, případně sledovat proliferaci nebo apoptózu. Metodika je velmi náročná na výběr vhodných fluorochromů a kvalitní softwarové a přístrojové vybavení. Rovněž je třeba počítat s tím, že čím více typů fluorochromů je použito současně, tím více možných vzájemných interakcí a zkreslení může vzniknout. Analýza dat je pak velmi časově náročná a vyžaduje zkušeného experimentátora.

MHC multimery

Průtokovou cytometrii využívá také metoda, která pracuje s fluorescenčně značenými MHC multimery, pomocí kterých je možné detekovat a kvantifikovat T-lymfocyty specifické pro daný antigen. První MHC multimer použitý pro analýzu specifických cytotoxických T-lymfocytů, lidský **MHC-I** tetramer, byl popsán v roce 1996 J. Altmanem (Altman et al., 1996). Jedná se o fluorescenčně označený komplex

čtyř molekul MHC-I s příslušným peptidem, který se specificky a stabilně váže na příslušný T-buněčný receptor cytotoxického T-lymfocyty. Rekombinantní molekuly MHC-I, které jsou základem monomeru MHC-I/peptid, obsahují cílovou sekvenci pro bakteriální enzym BirA, kterým jsou biotinylovány. Čtyři biotinylované molekuly monomerů MHC-I/peptid se naváží na fluorescenčně značený streptavidin a vytvoří tak molekulu tetrameru. Značení MHC-I tetramery patří v současnosti mezi nejdůležitější postupy při monitorování T-buněčné odpovědi. Kromě tetramerů byly vytvořeny i MHC multimery složené z dimerů až oktamerů (Bakker and Schumacher, 2005). Některé multimery jsou komerčně dostupné (firmy Sanquin, ProImmune, Dako) a jsou používány rutinně. V praxi se používají i **multimery MHC-II** pro označení CD4⁺ buněk, avšak nejsou tak rozšířené jako multimery MHC-I. Seznam alel klonovaných pro konstrukci multimeru je dostupný u příslušného výrobce. Nevýhodou tohoto přístupu je možnost detekovat pouze lymfocyty specifické pro již známý syntetizovaný peptid a dále omezení příslušnou alelickou specifitou.

Buňky prezentující antigen (APC) s expresí MHC-I + GFP (green fluorescent protein)

CD8⁺ buňky po kontaktu s APC a po stimulaci specifickým antigenem internalizují komplex MHC-I/peptid endocytózou zprostředkovanou T-buněčným receptorem (TCR). Je-li k MHC-I molekule připojen zelený fluorescenční protein (GFP), dostává se do buněk spolu s MHC-I a fluorescenčně tak označí T-lymfocyty specifické pro daný epitop. Je k tomu nezbytná linie buněk prezentujících antigen, která stabilně exprimuje komplex MHC-I/GFP a která je před inkubací s T-lymfocyty pulsována příslušným peptidem. Pomocí této metody je možné detekovat a kvantifikovat T-lymfocyty specifické pro daný epitop a lze ji použít i pro identifikaci nových CD8 T-imunodominantních epitopů. Metoda byla poprvé úspěšně použita pro alelu HLA-A*201 (Tomaru et al., 2003) a její výsledky korelovaly s výsledky značení specifickými tetramery MHC-I/peptid (viz. výše). Na rozdíl od značení tetramery, pro jejichž konstrukci je nutná předchozí znalost imunodominantního epitopu, lze buňky prezentující antigen používané v této metodě jednoduše pulsovat jakýmkoliv peptidem.

Analýza variabilních oblastí TCR u T-lymfocytů

Indukci specifické imunitní odpovědi může znamenat také zvýšení množství

T-lymfocytů exprimujících určitý typ variabilní oblasti T-buněčného receptoru (TCR). Množství T-buněk, které mají TCR s určitým typem V nebo J oblasti ve svém α nebo β řetězci lze zjistit např. pomocí **průtokové cytometrie**. Používají se k tomu protilátky specifické pro jednotlivé podčeledi V (variable) nebo J (joining) oblastí řetězců α nebo β . Nejčastěji se používá analýza oblasti TCR-V β . V současné době jsou k dispozici komerční kity obsahující protilátky, které dovolují stanovení 19 z 25 rodin V β vyskytujících se u lidí, které pokrývají 70% normálních cirkulujících T-buněk (Morice et al., 2004). Protilátky proti všem podčledím oblastí J nebo V nejsou dosud k dispozici a analýza tedy nemůže být kompletní. Tuto metodu lze tedy použít spíše pro vytvoření představy o velikosti možné specifické imunitní odpovědi na neznámé antigeny, které jsou cílem imunitní odpovědi.

Další možností je **analýza CDR3** (complementarity determining region 3) **oblasti pomocí PCR**. CDR3 oblast kóduje vysoce polymorfní část TCR, která je zodpovědná za rozpoznání komplexu peptid/MHC. Pro β řetězec TCR je to spojení segmentů V-D a D-J a pro řetězec α je to spojení V-J. Charakterizace CDR3 oblasti slouží pro detekci a kvantifikaci klonálně expandovaných T-buněk během imunitní odpovědi. Nejčastěji se pro tyto účely používají dvě metody, typizace spektra (Pannetier et al., 1995) a mapování klonotypů (Thor Straten, 2004). Obě metody jsou založené na RT-PCR amplifikaci CDR3 oblasti TCR za použití primerů pro variabilní oblast v kombinaci s primerem pro konstantní část receptoru, následované detekcí zvýšeného množství určitých transkriptů TCR. Metoda **typizace spektra (immunoscope)** je založena na detekci zvýšeného počtu TCR transkriptů, které mají stejnou délku. U lidí existuje 25 rodin V β segmentů, které se liší délkou o 6-8 aminokyselin. Pro každou rodinu byl vytvořen specifický primer, který se kombinuje s primerem pro konstantní oblast a vzniklé PCR produkty se liší délkou. Populace TCR V β genů tak vykazuje „spektrum“ délek CDR3, které u normálního jedince sleduje Gaussovské rozložení. Výchyly z tohoto rozložení indikují klonální expanzi T-buněk, vzniklou během T-buněčné odpovědi. Metoda **mapování klonotypů** využívá různé vlastnosti tání CDR3 oblasti TCR při dělení na denaturující gradientové gelové elektroforéze. Obě metody se používají pro lidské i myší oblasti TCRBV (TCR β variable). Navíc PCR produkty těchto metod mohou být přímo sekvenovány a vytvořit tak základ pro tvorbu klonotypických PCR primerů vhodných pro hledání specifických sekvencí v dalších vzorcích pomocí RT-PCR analýzy. O klonalitě

nádorově specifických T-buněk u myší je dosud k dispozici jen málo dat. Analýza používání TCR genů u lidí byla v posledních letech provedena v několika klinických nádorových studiích (Thor Straten, 2004), avšak získaná data byla pouze popisná. Podstatně lepší obraz o protinádorových T-buňkách by mohla poskytnout klonotypová charakterizace T-buněk specifických pro určitý peptid v kombinaci s daty o jejich fenotypu a funkci. Kombinací několika metod byly například určeny různé klonotypy HIV-specifických lymfocytů odpovídajících na různé epitopy (Douek et al., 2002). Po selekci CD8⁺ buněk specifických pro dané peptidy (produkovaly IFN- γ) z nich byla izolována mRNA a pomocí ukotvené RT-PCR a primeru pro konstantní oblast TCRB byly amplifikovány sekvence TCRB (TCR β -chain) tak, aby nedošlo k upřednostnění některé rodiny TCRBV. Ve výsledném PCR produktu tedy byly zastoupeny všechny epitop-specifické klonotypy s frekvencemi odpovídajícími původním selektovaným buňkám. PCR produkt byl ligován do vektoru, transformován do bakterií a vybrané klony následně sekvenovány. Takto bylo zjištěno, jaké klonotypy jsou vyvolány kterými epitopy a je-li odpověď na daný epitop monoklonální, oligoklonální nebo polyklonální. Na základě identifikace klonotypů je možné vytvořit specifické primery a sondy a použít je pro **kvantitativní klonotypickou PCR**.

1.2.2.2. Analýza funkce

Samotná přítomnost buněk specifických pro antigen ještě nemusí znamenat jejich funkčnost, jak bylo zjištěno např. u některých chronických infekcí a malignit. Funkčnost lze posuzovat např. podle množství a typu produkovaných cytokinů (1.2.2.2.1.), schopnosti proliferovat po stimulaci antigenem (1.2.2.2.2.) nebo na základě měření cytotoxické aktivity (1.2.2.2.3.).

Mezi nejstarší funkční testy bychom mohli zařadit *in vivo* test oddálené přecitlivělosti, **DTH** (delayed-type hypersensitivity) **test**. Tento test pracuje s antigenem, který je ve formě rozpustného proteinu nebo dopravený prostřednictvím buněk prezentujících antigen podán intradermálně a po 48-72 hodinách je měřen průměr oblasti zarudnutí nebo zatvrdnutí kůže v místě vpichu. Tato reakce je způsobena cytokiny produkovanými lymfocyty specifickými pro antigen, které v místě aplikace antigenu zvyšují cévní propustnost a přitahují monocyty a další buňky zánětlivé odpovědi. DTH test se používá v imunoterapeutických studiích, avšak jeho výsledky nejsou vždy přesvědčivé. V některých studiích nebyla vzniklá reakce

specifická pro antigen a naopak v biopsii tkáně s negativním výsledkem DTH testu byla zjištěna přítomnost specifických T-lymfocytů (Clay et al., 2001).

V následujících oddílech popíší některé metody, které se používají pro analýzu funkce lymfocytů.

1.2.2.2.1. Sledování produkce cytokinů

Jednotlivé subpopulace buněk imunitního systému produkují určité charakteristické spektrum cytokinů (např. Th-1 lze odlišit od Th-2 díky produkci IFN- γ , TNF- α a IL-2, naopak Th-2 produkují IL-4, 5, 6, 10 a 13; paměťové T-lymfocyty produkují jiné cytokiny než efektorové T-lymfocyty atd). Podle detekovaného typu a množství sekretovaných cytokinů lze odvodit druh a velikost imunitní odpovědi.

Detekce sekretovaných cytokinů

ELISA

Sekretované cytokiny lze detekovat pomocí testu **sendvičová ELISA** (heterogenní nekompetitivní EIA). Obvykle se pro tento test používá dvojice protilátek proti dvěma různým antigenním determinantám cytokinu. Na jednu z protilátek je navázán enzym (např. křenová peroxidáza), druhá protilátka bývá navázána na pevnou fázi (obvykle jamka mikrotitrační destičky). Po vytvoření tohoto "sendviče" a odstranění nenavázaného konjugátu následuje přidání substrátu enzymu. Výsledný produkt je pak kvantifikován automaticky.

ELISPOT

Tato metoda pracuje na principu testu ELISA, avšak na rozdíl od něj dovoluje analýzu produkce cytokinů na úrovni jednotlivých buněk. Primární protilátka proti sledovanému cytokinu je imobilizovaná na dně mikrotitrační destičky, které je pokryto nitrocelulózovou nebo PVDF membránou. Po nanesení buněčné suspenze a restimulaci je buňkami produkován cytokin navázán na primární protilátku. Po odmytí buněk se pomocí sekundární protilátky konjugované s enzymem (křenová peroxidáza nebo alkalická fosfatáza) a za použití vhodného substrátu (např. 3-amino-9-ethyl carbazol (AEC) nebo 3,3',5,5''-tetramethylbenzidin (TMB) pro křenovou peroxidázu a 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitroblue tetrazolium (BCIP/NBT-plus) pro alkalickou fosfatázu) vizualizuje barevný „spot“ odpovídající buňce, která v příslušném místě produkovala cytokin. Takto lze sledovat produkci

např. IL-2, 4, 5, 6, 10, 12, 13, TNF- α nebo GM-CSF. Za použití sekundárních protilátek konjugovaných s různými enzymy lze provést též dvoubarevný ELISPOT pro současnou analýzu dvou cytokinů. Pro vyhodnocení výsledků může být použita automatická čtečka spotů, tzv. „ELISPOT reader“. Metoda je velmi citlivá, dovoluje detekci velmi nízkých frekvencí pozitivních buněk (např. 1/500 000).

Proteinový čip Multiplex

Jedná se o proteinový čip, který se používá pro mnohočetnou analýzu produkce různých cytokinů (např. IL-1a, IL-1b, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p70, GMCSF, IFN- γ , TNF- α) v séru nebo buněčném supernatantu. Pomocí této metody je možné porovnávat relativní hodnoty nebo stanovit přesná množství cytokinů. Např. firma Novagen poskytuje kit **ProteoPlex**TM pomocí kterého je možné analyzovat najednou produkci 12 lidských (nebo 10 myších) cytokinů až v 15 vzorcích. Citlivost těchto čipů je 15-2500 pg/ml a jejich analýza je prováděna pomocí fluorescenčního detekčního systému SensiLightTM.

Fluorescenční značení cytokinů produkovaných v buňkách

Metoda je založena na **detekci intracelulárních cytokinů** multiparametrovou průtokovou cytometrií. Po krátkodobé stimulaci antigenem (několik hodin) a zablokování transportu cytokinů z buňky prostřednictvím inhibitoru (brefeldin A, monensin), jsou pro zachování buněčné morfologie lymfocyty fixovány a dále jejich buněčné membrány permeabilizovány vhodným detergentem, aby mohly fluorescenčně značené protilátky proti cytokinu proniknout do buňky. Pro další charakterizaci buněčné populace produkující daný cytokin mohou být zároveň označeny další buněčné markery. Expres některých markerů je však ovlivněna použitými transportními inhibitory (např. brefeldin A snižuje množství CD14 na buněčném povrchu) a rovněž některé protilátky nejsou schopné označit denaturované antigeny na fixovaných buňkách

(http://www.bdbiosciences.com/pharming/en/protocols/Intracellular_Cytokines.shtml).

Velkou výhodou této metody oproti ELISPOTu je možnost multiparametrické fenotypizace buněk. Její nevýhodou je menší citlivost a dále fakt, že fixované a permeabilizované buňky již nelze dále použít pro další aplikace (např. klonování). Proto byla vyvinuta metoda, pomocí které je možné **zachytit sekretovaný cytokin a detekovat ho na povrchu živých buněk**. Tato technika používá tzv. **bispecifické hybridní protilátky**, jejichž dvě vazebná místa pro antigen rozeznávají každé jiný

ligand. Jedním z těchto ligandů je lymfocytární povrchový marker (CD45) a druhým je zkoumaný cytokin. Bispecifická protilátka se naváže na povrchový marker T-lymfocytu a v případě, že buňka produkuje příslušný cytokin, naváže se na druhé vazebné místo bispecifické protilátky. Přítomnost cytokinu na buněčném povrchu je pak detekována prostřednictvím fluorescenčně značené sekundární protilátky. Základ této technologie byl vyvinut skupinou A. Radbruch pod názvem „cell-surface affinity matrix technology” (Thiel, 1999).

Magnetofluorescenční lipozómy pro označení povrchově exprimovaných cytokinů

Magnetofluorescenční lipozómy jsou částice o velikosti přibližně 200-300 nm, které obsahují několik tisíc molekul fluorochromu (fluorescein) a koloidních magnetických částic a slouží pro současné fluorescenční a magnetické označení cílových buněk. Lipozómy jsou konjugované s protilátkami proti povrchově exprimovaným cytokinům (přítomnost cytokinu na povrchu buněk produkujících daný cytokin byla zjištěna např. pro IFN- γ nebo IL-10) a nelze je použít pro označení cytokinů, které na buněčném povrchu nejsou detekovatelné (např. IL-2, IL-4 nebo IL-5). Značení fluorescenčními lipozómy je mnohem citlivější než běžně používané fluorescenční značení, při kterém je potřeba, aby pozitivní buňka obsahovala až několik tisíc molekul antigenu. Molekuly, které se vyskytují na buněčném povrchu v menším množství tak nejsou detekovatelné. Důvodem této malé citlivosti je malé množství fluorochromů, které je možné konjugovat s jednou molekulou protilátky. Bylo zjištěno, že magnetofluorescenční lipozómy jsou schopné zesílit intenzitu fluorescenčního signálu až 1000x a pomocí průtokové cytometrie jasně rozlišit obarvené buňky dokonce je-li přítomno jen 50-100 molekul antigenu na buňku (Scheffold et al., 2000). Buňky označené magnetofluorescenčními lipozómy lze snadno separovat za použití MACS (magnetic cell sorting). Metoda není pro buňky destruktivní a zachovává je živé pro další aplikace (např. klonování).

Měření hladin mRNA cytokinů prostřednictvím kvantitativní PCR v reálném čase (RT-PCR)

Hladinu exprese příslušného cytokinu lze měřit prostřednictvím kvantifikace příslušné mRNA. mRNA je po izolaci přepsána pomocí reverzní transkriptázy do cDNA, z níž je za použití PCR primerů amplifikován cílový gen. Reakční směs obsahuje i sondu označenou reportérovým a „zhašecím“ fluorochromem. Je-li sonda

navázaná na DNA, pod vlivem „zhášedce“ fluorescence nevzniká. Jakmile Taq polymeráza v průběhu elongace odštěpí reportérový fluorochrom, odstraní se vliv „zhášedce“ a uvolní se fluorescence. Přístroj, ve kterém RT-PCR probíhá je schopný tuto fluorescenci detekovat a zaznamenat. Její množství v každém amplifikačním cyklu odpovídá množství vytvořeného produktu. V průběhu času sleduje intenzita fluorescence (amplifikace) dané cDNA křivku s počáteční plochou fází, která je následována fází exponenciální. Nakonec spolu s vyčerpáním reagensů se syntéza DNA zpomaluje a exponenciální křivka se dostává do fáze plató. Čím je počáteční množství příslušné cDNA (a tím pádem i mRNA) ve vzorku větší, tím dříve bude během opakování amplifikačních cyklů detekována. Současně s cílovým genem je amplifikován i gen kontrolní a pomocí počítačového software je zjištěna úroveň exprese daného genu v jednotlivých vzorcích.

1.2.2.2.2. Sledování proliferace

Dalším znakem vzniku specifické imunitní odpovědi je proliferace lymfocytů po specifické stimulaci. *In vitro* ji lze vyvolat inkubací se specifickým antigenem nebo neproliferujícími (např. ozářenými) stimulačními buňkami prezentujícími specifický antigen. Nespecificky lze proliferaci vyvolat prostřednictvím polyklonálního mitogenu, jako je např. fytohemaglutinin (PHA), konkanavalin (ConA) nebo forbol-myristát-acetát (PMA).

Radioaktivní lymfoproliferační testy

Těmito testy lze měřit syntézu DNA, která je odrazem proliferace. Pomocí [³H] **proliferačního testu** se po 72-120 hodinách od stimulace měří míra inkorporace radioaktivně značeného [³H] thymidinu do nově syntetizované DNA proliferujících buněk. [³H] proliferační test má mnohé nevýhody, např. je málo citlivý v případě malé frekvence odpovídajících buněk, existuje možnost zkreslení výsledků syntézou DNA v jiných buňkách, poskytuje informace pouze o celkovém množství buněčných dělení a nedozvíme se nic o dělení jednotlivých buněk ani o jejich fenotypu. Rovněž nedovoluje izolaci pozitivních buněk pro další analýzu a souvisí s ním i omezení vyplývající z nutnosti nakládání s radioaktivním materiálem.

Kolorimetrické lymfoproliferační testy

Proliferaci lze měřit i kolorimetricky, za použití neradioaktivních **tetrazoliových solí**, které jsou v metabolicky aktivních buňkách štěpeny mitochondriálními dehydrogenázami za vzniku jinak zbarveného produktu. Mírou velikosti proliferace je v tomto případě výše aktivity enzymu, kterou lze detekovat změřením absorbance pomocí ELISA readeru. Mezi tetrazoliové barvičky patří např. MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), XTT (2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide), WST-1 nebo WST-8 (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt).

Fluorescenční lymfoproliferační testy

Inkorporace BrdU

Za použití intracelulárního značení **monoklonálními protilátkami** proti nukleotidovému analogu 5-bromo-2-deoxyuridinu (BrdU) (Gratzner, 1982) lze pomocí průtokové cytometrie identifikovat proliferující buňky, které v průběhu syntézy DNA inkorporovaly BrdU. Touto metodou však nelze analyzovat množství proběhlých buněčných cyklů. Vizualizaci až 2 kol replikace dovolí další metoda, která využívá schopnosti BrdU inkorporovaného do DNA **zhášet fluorescenci** bis-imidazolové barvičky (např. Hoechst 33342 nebo 33258). Buňky, které proliferovaly a mají tedy ve své DNA inkorporovaný BrdU, nejsou těmito barvičkami, které jsou vysoce specifické pro thymidin, „obarvitelné“ (Bohmer, 1979).

Značení proliferačních markerů

Za znak proliferace by mohla být považována i zvýšená exprese povrchových aktivačních markerů T-lymfocytů (např. **CD25, CD69, CD71**). Markerem proliferace je také exprese jaderného proteinu **PCNA** (proliferating cell nuclear antigen), který lze detekovat pomocí fluorescenčně značené protilátky.

Značení buněk CFSE

Tato metoda používá fluorescenční značení buněk pomocí carboxyfluorescein-diacetate-succinimidylesteru (CFSE, CFDA-SE). **CFSE** je za normálních okolností nefluoreskující molekula schopná prostupovat buněčnou membránou. Po vstupu do buňky odstraní endogenní esterázy z molekuly CFSE acetátové skupiny, což vyvolá fluorescenci a neschopnost zpět proniknout buněčnou membránou. Navíc

succinimidylester reaguje s aminoskupinami vnitrobuněčných proteinů, což vede k jejich stabilnímu fluorescenčnímu označení. Buňky, které byly před stimulací označeny pomocí CFSE a reagují na stimulaci antigenem proliferací, ztratí 50% fluorescenčního signálu po každém buněčném dělení. Při analýze výsledků průtokové cytometrie jsou rozlišitelné buněčné populace s různě intenzivní fluorescencí, odpovídající počtu proběhlých buněčných cyklů. V případě, že buněčná populace je heterogenní ve velikosti jednotlivých buněk, je pro hodnocení fluorescenčních dat nutné použít počítačové modelování. Sledujeme-li pouze proliferaci, nejsme schopni rozpoznat buňky, které na stimulaci nereagují proliferací, ale efektorovými funkcemi. Důležitou výhodou této metody proto je, že ji lze kombinovat i s dalšími přístupy, například s povrchovou fenotypizací nebo značením cytokinů. Významné je také to, že buňky označené CFSE zůstávají živé a lze tak například izolovat a pro další analýzu využít buňky, které např. prošly určeným počtem buněčných cyklů. (Lyons, 2000), (Lyons and Parish, 1994).

1.2.2.2.3. Sledování cytotoxické aktivity

Hlavním efektorovým imunitním mechanismem bránícím vzniku nádorů je pravděpodobně buněčně zprostředkovaná cytotoxicita. Podílí se na ní více typů buněk a je indukována několika mechanismy. Pro detekci a kvantifikaci cytotoxické aktivity buněk se používají různé metody, z nichž některé zde zmíním.

Hodnocení zabíjení cílových buněk

Cytotoxický test (^{51}Cr -release test)

Jedná se o základní a stále velmi rozšířený test pro kvantifikaci specifické aktivity cytotoxických T-lymfocytů (CTL). Cílové buňky označené radioaktivním ^{51}Cr jsou určitou dobu inkubovány s efektorovými buňkami. Smrt cílových buněk je následně kvantifikována na základě měření radioaktivity uvolněné z mrtvých buněk do supernatantu. Ačkoliv je tato metoda reprodukovatelná a jednoduchá, má i jisté nevýhody. CTL aktivita není kvantifikována na úrovni jednotlivých buněk, neposkytuje údaje o kinetice interakcí mezi efektorovými a cílovými buňkami a je založena na práci s radioaktivními materiály, které vyžadují speciální zacházení. (Brunner et al., 1968).

Kvantifikace CTL prekursorů prostřednictvím LDA (limiting dilution analysis)

Metodou LDA lze kvantifikovat prekursory CTL v suspenzi lymfocytů. Metoda LDA využívá statistickou funkci Poissonovské distribuce, která popisuje náhodné rozdělení předmětů, v tomto případě lymfocytů. Pokud jsou heterogenní T-lymfocyty rovnoměrně rozděleny do sady kultivačních jamek, budou tyto obsahovat různá množství T-lymfocytů specifických pro daný antigen. Testované lymfocyty jsou nasazeny do jamek mikrotitrační destičky v několika různých počátečních koncentracích (např. 4 různé koncentrace T-lymfocytů, každá alespoň ve 24 jamkách) a *in vitro* jsou stimulovány specifickým antigenem, buňkami prezentujícími antigen a růstovými faktory. Po několika dnech růstu a diferenciaci jsou buňky v jamkách testovány na odpověď k antigenu, např. na cytotoxickou odpověď za použití cílových buněk značených **radioaktivním chromem** ^{51}Cr (viz. výše) nebo alternativně **neradioaktivním europiem** Eu^{3+} (Bouma et al., 1992). Logaritmus podílu jamek bez odpovědi pro každou počáteční koncentraci buněk v jamce je vyneseno do grafu. Jednotlivými hodnotami v grafu je proložena přímka, jejíž strmota závisí na frekvenci prekursorů ve vzorcích. Výpočet frekvence buněk specifických pro antigen je založen na předpokladu, že je-li podíl negativních jamek 37%, průměrně na jamku připadá 1 buňka specifická pro antigen (známo z Poissonovské distribuce). Frekvence T-buněk specifických pro antigen v populaci bude tedy odpovídat převrácené hodnotě toho počtu buněk v jamce, kterému odpovídá 37% negativních jamek. Jelikož jde ale o komplikovanou a velmi pracnou metodu, jsou mezi experimentátory preferovány spíše jiné přístupy.

Fluorescenční označení mrtvých cílových buněk

Cytotoxickou aktivitu lze zjišťovat také za použití průtokové cytometrie. Jednou z možností je počáteční označení cílových buněk (např. CFSE) a po jejich inkubaci s efektorovými buňkami následné označení mrtvých buněk DNA vazebnými barvičkami (např. propidium iodid nebo TO-PRO-3 iodid) (Heckelsmiller et al., 2002). Jiným přístupem je označení efektorových buněk CFSE a apoptotických cílových buněk 7-amino actinomycinem D (7-AAD) (Lecoeur et al., 2001). Nevýhodou těchto metod však je, že ve výsledku nezahrnují mrtvé buňky, které zmizely v důsledku fagocytózy. Tento nedostatek se snaží řešit např. metoda **FATAL** (fluorometric assessment of T lymphocyte antigen specific lysis), která zjišťuje množství cílových buněk, které zmizely z populace předem dvojitě označených

cílových buněk. Membránové proteiny cílových buněk jsou permanentně označeny **PKH-26** a současně proteiny uvnitř buňky jsou označeny **CFSE**. V případě poškození buněčné membrány je CFSE uvolněno a buňky již dále nesvítlí. Zůstávají však označeny PKH-26 (Sheehy et al., 2001). Velkou výhodou těchto metod je jejich citlivost, možnost další charakterizace buněčných populací a fakt, že nepracují s radioaktivitou. Nevýhodou je pak nutnost definovat a zajistit optimální reakční podmínky, neboť při vyšších hodnotách poměru efektorových a cílových buněk (E:T) vzniká větší množství apoptotických tělísek a buněčných zbytků, které nejsou průtokovou cytometrií měřitelné.

***In vivo* cytotoxický test**

Cytotoxickou aktivitu lze u myši sledovat také *in vivo*. Cílové buňky připravené z myši sleziny jsou inkubovány v přítomnosti peptidu a následně jsou označeny carboxyfluorescein-diacetate-succinimidylesterem (CFSE, CFDA-SE). Pak jsou intravenózně aplikované myšimu příjemci. *In vivo* eliminace CFSE pozitivních cílových buněk, která odráží přítomnost specifických CTL u myši, je zjišťována druhý den průtokovou cytometrií z izolovaných splenocytů (Otahal et al., 2005). Pomocí značení CFSE lze sledovat také migraci lymfocytů *in vivo*. Zpočátku se k těmto účelům používal radioaktivní chrom, lepší je však značení fluorescenční. CFSE se výborně osvědčil i pro dlouhodobé sledování migrace, v lymfocytech byl detekovatelný ještě 8 týdnů po injekci do myši (Weston and Parish, 1990). Mezi další používané značky patří např. PKH26, Calcein nebo BCECF.

Měření aktivity enzymů uvolněných z cílových buněk

Jiný přístup využívají metody, které sledují aktivitu enzymů uvolněných z cílových buněk. Mezi tyto metody patří např. **CLM** (coupled luminescent method), což je vysoce citlivá, bezpečná a rychlá metoda pro měření cytotoxické aktivity, která nevyžaduje označení cílových buněk (Corey et al., 1997). Metoda je založena na sledování uvolnění **glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenázy** (GAPDH, G3PDH) z mrtvých cílových buněk. Aktivita enzymu GAPDH, který je přítomný ve všech buňkách, je spojená s produkcí vysokoenergetických molekul (ATP, NADH), které jsou luminiscenčním substrátem pro luciferázu. Uvolněná luminiscence je měřena luminometrem. Metoda byla použita např. pro měření cytotoxické aktivity NK buněk (Ogbomo et al., 2006). Další možností je např. kolorimetrické stanovení aktivity **laktát dehydrogenázy** (LDH) uvolněné do média z cílových buněk, za použití tetrazoliových barviček, které jsou redukovány vzniklým NADH, za vzniku

barevného produktu (Decker and Lohmannmatthes, 1988).

FCC (flow cytometry CTL) test

Okamžitě po signalizaci spuštěné cytotoxickými T-lymfocyty se v cílových buňkách aktivuje kaspázová kaskáda. Právě časná **detekce aktivace kaspáz v apoptotických cílových buňkách** může být markerem specifické aktivity CTL. Cílové buňky, které jsou pro odlišení od efektorových buněk fluorescenčně označeny, jsou inkubovány se specifickým fluorogenním substrátem kaspáz, který pronikne dovnitř buněk (např. pro kaspázu-3 byl použit substrát PhiPhiLux). V případě aktivace kaspáz se substrát rozštěpí a pouze tehdy začne vydávat fluorescenční signál. Fluorescence emitovaná cílovými buňkami je detekovatelná průtokovou cytometrií nebo fluorescenční mikroskopií (Liu et al., 2002).

Sledování markerů degranulace

Fluorescenční značení

Jedním ze způsobů, kterým cytotoxické T-lymfocyty zabíjejí cílové buňky, je uvolnění obsahu tzv. lytických granulí (sekrečních lysosomů) přítomných v cytoplazmě CTL, do prostoru imunologické synapse mezi CTL a cílovou buňkou. Lytické granule obsahují husté jádro složené z různých proteinů, mezi nimiž jsou perforiny a granzymy. Pomocí intracelulárního barvení je možné např. **granzym B** a **granzym A** fluorescenčně označit. V membránách cytotoxických granulí jsou přítomné molekuly glykoproteinů **CD107a** (LAMP-1) a **CD107b** (LAMP-2). Po degranulaci aktivovaných CD8⁺ T-buněk, která následuje rychle po specifické stimulaci TCR a která je prekursorem cytolýzy, se jako důsledek fúze membrán cytotoxických granulí a plazmatické membrány vystaví na povrchu cytotoxických T-lymfocytů molekuly CD107a a CD107b. Signifikantní exprese CD107a a CD107b na buněčném povrchu je detekovatelná již za 30 minut po stimulaci CTL a svého maxima dosahuje za 4 hodiny. Pomocí multiparametrové průtokové cytometrie tak lze prostřednictvím povrchového označení molekul CD107a a CD107b detekovat cytotoxické T-lymfocyty, jejichž lytická funkce byla aktivována stimulací příslušným specifickým antigenem. Metodu lze kombinovat i s dalšími přístupy, např. se sledováním produkce cytokinů a značením MHC tetramery. Výhodou této metody je dále také to, že není nutné značené buňky fixovat a permeabilizovat a ty zůstávají živé pro případné další použití (Betts et al., 2003). Výsledky dosažené pomocí této metody korelovaly s produkcí intracelulárního IFN- γ po stimulaci specifickým

antigenem.

ELISPOT

Metodou ELISPOT (princip metody viz. výše) lze sledovat též produkci granzymu B (GrB, (Shafer-Weaver, 2003)) a perforinu (Zuber et al., 2005). Tyto molekuly jsou přítomny v cytotoxických granulích CTL a NK buněk a jejich uvolnění je považováno za indikátor cytotoxické odpovědi. Jedná se o metodu citlivější než „⁵¹Cr-release“ test.

1.2.2.3. Charakterizace genové exprese

DNA čipy (DNA microarrays)

Slouží pro současnou analýzu dat o expresi mnoha genů v buňkách. DNA čipy je možné použít například ke studiu genové exprese v různých buněčných typech nebo v buňkách v různých stádiích maturace a aktivace (např. studium rozdílné genové exprese v Th1 a Th2 subpopulacích). Principem je připojení mnoha různých DNA sekvencí, které mohou reprezentovat tisíce známých genů, na skleněný povrch DNA čipu v definované pozici. mRNA izolovaná z testovaných buněk pak může být přepsána do cDNA, označena (např. fluorescenčně) a hybridizována s čipem. Hybridizace značené mRNA (cDNA) s odpovídající DNA sekvencí čipu je pak detekována a analyzována. Z výsledku je pak možné zjistit např. zda je nebo není v dané tkáni nebo buněčné populaci příslušný gen exprimován a případně vyhodnotit úroveň jeho exprese. Výhodou této metody je možnost paralelní analýzy mnoha různých vzorků. DNA čipy jsou komerčně dostupné (např. GeneChip firmy Affymetrix), avšak jejich pořízení je značně nákladné. Pro studium imunitních odpovědí u myši (Lorenz et al., 2003) a u člověka (Nikula et al., 2005) proto byly vytvořeny jejich podstatně levnější varianty, tzv. **ImmunoChipy**, které nejsou zaměřené na globální screening genové exprese, ale sledují pouze vytypované geny, které by mohly mít vztah ke studovanému problému (např. geny pro transkripční faktory, CD markery, cytokiny, receptory cytokinů, MHC molekuly atd.).

1.2.2.4. Výběr vhodné metody pro testování účinnosti vakcíny

Pro hodnocení protinádorové imunitní odpovědi vyvolané vakcínou a tedy vlastní účinnosti vakcíny se obvykle zjišťuje množství indukovaných T-buněk specifických pro antigen, ať už na základě jejich fenotypu nebo aktivity (např. sekrece

cytokinů, cytotoxicita). Současně by měly být sledovány různé typy imunitní odpovědi, např. CD4⁺, CD8⁺ T-buněčná a případně protilátková odpověď. Pro co možná nejlepší charakterizaci imunitní odpovědi vyvolané vakcínou je pak vhodná detailnější analýza. Např. zjištění, zda MHC-I tetramery váží paměťové CTL (lze je odlišit od naivních prostřednictvím fenotypového markeru CD45RA/RO), by mohlo přispět k poznatku, zda ke stimulaci došlo skutečně imunizací. Při hodnocení imunitní odpovědi je tedy ideální **kombinace několika přístupů**. Používané metody by měly být jednoduché, citlivé, dobře reprodukovatelné a standardizované. Rovněž je vhodné zvyšovat citlivost analýzy, např. používáním obohacených populací.

Tradičně je buněčná imunitní odpověď specifická pro antigen zjišťována prostřednictvím měření buněčné cytotoxicity, proliferace a produkce cytokinů. Od konce 60.-tých let až téměř do konce 20.-tého století byla cytotoxická aktivita CD8⁺ buněk měřena „⁵¹Cr release“ testem. Tento test má však mnohé nevýhody, mezi které patří nízká citlivost, vysoké spontánní uvolnění radioaktivní značky nebo nutnost práce s radioaktivitou. Proto byly vyvíjeny metody nové. V průběhu posledního desetiletí se dostaly do popředí metody, které dovolují analýzu specifické imunitní odpovědi na úrovni jednotlivých buněk. V současné době jsou používány tři základní metody: **ELISPOT, MHC-I tetramerový test a detekce intracelulárních cytokinů**. Jejich hlavními výhodami je kromě analýzy na úrovni jednotlivých buněk také relativní snadnost, spolehlivost a citlivost. Revoluční metodou se stal v 2. polovině 90.-tých let MHC-I tetramerový test, který umožnil jednoduše analyzovat specifitu T-lymfocytů. Pomocí detekce intracelulárních cytokinů je zase možné nejen měřit schopnost buněk produkovat cytokiny v závislosti na stimulaci antigenem, ale také určit jejich fenotyp a kvantifikovat je v buněčné suspenzi. Základní metody jsou pak doplňovány dalšími postupy, z nichž některé jsem zde popsala. Tradiční „⁵¹Cr release“ test se rovněž stále hojně používá, přinejmenším jako referenční metoda.

Výsledky získané metodami, které sledují různé parametry imunitní odpovědi spolu nemusí vždy zcela korelovat (Clay et al., 2001). V případě, že byla zjištěna přítomnost buněk specifických pro antigen, nemusí to ještě znamenat, že jsou tyto buňky také schopné vykonávat své efektorové funkce. Je dobře doloženo, že mnoho buněk specificky vázajících MHC-I tetramer neprodukuje po stimulaci peptidem IFN- γ (Goepfert et al., 2000). I v případě, kdy byla detekována produkce cytokinů CD8⁺ buňkami po stimulaci, je otázka, zda jsou tyto buňky cytotoxické. Bylo pozorováno, že většina CD8⁺ buněk, které produkují IFN- γ po stimulaci také

degranulují (exprimují CD107) a měly by být tedy schopné zabít cílové buňky. V opačném případě však platí, že některé CD8⁺ buňky degranulují, ale neprodukují IFN- γ (Betts et al., 2003). Populace odpovídajících CD8⁺ buněk je tedy funkčně heterogenní.

1.3. Adenylát cyklázový toxin *Bordetelly pertusis*

Bordetella pertusis je striktně aerobní bakterie, která se řadí spolu s dalšími čtyřmi druhy do rodu *Bordetella* a třídy *Alcaligenaceae*. *B. pertusis* byla poprvé izolována v roce 1906. Z morfologického hlediska se jedná o gram-negativní, nepohyblivou, krátkou ovoidní tyčinku, která je obligatorním lidským parazitem. Po infekci, která se šíří kapénkami nebo přímým kontaktem, kolonizuje dýchací cesty člověka a způsobuje vážné akutní respirační onemocnění s těžkým průběhem zejména u dětí, tzv. černý kašel. V průběhu infekce mikroorganismy přisedají k řasinkovému epitelu trachey a bronchů, napadají alveolární makrofágy, rychle se pomnožují na sliznici a exprimují virulentní faktory, které pomáhají kolonizovat horní cesty dýchací. Jedním typem virulentních faktorů jsou tzv. bakteriální adheziny, které umožňují vazbu bakterií k epiteliálním buňkám, makrofágům a neutrofilům. Patří mezi ně povrchové a různé extracelulární bakteriální proteiny a proteinové struktury, jako **fimbrie, vláknitý hemaglutinin a pertactin**. Dalšími významnými virulentními faktory *B. pertusis* jsou proteiny, které navozují poškození hostitelské tkáně a inhibují obranu hostitele: **pertusový toxin, letální toxin** (dříve nazývaný dermonekrotický toxin), **adenylát cyklázový toxin, tracheální cytotoxin, lipopolysacharid** (endotoxin) a **tracheální kolonizační faktor** (Smith et al., 2001). V počáteční fázi, kdy dochází ke kolonizaci epitelu, pomnožení bakterií a produkci toxinů, je onemocnění ještě dobře léčitelné antibiotiky. Pozdější fáze jsou provázené záchvaty kašle, zvracením, křečemi a nadměrnou produkcí hlenu, což může skončit smrtí.

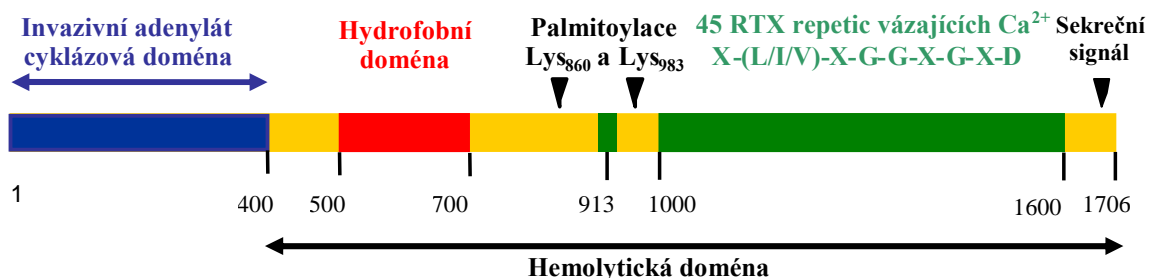
Mezi klíčové virulentní faktory *Bordetelly* patří adenylát cyklázový toxin (ACT) CyaA, který byl objeven v roce 1976 (Hewlett and Wolff, 1976). Uplatňuje se v časných fázích infekce, v průběhu kolonizace dýchacího ústrojí. Toxin CyaA se váže na povrch různých typů buněk, prostupuje jejich buněčnou membránou a díky své **adenylát cyklázové aktivitě** významně zvyšuje vnitrobuněčnou hladinu cyklického AMP (Confer and Eaton, 1982). To vede k vážným změnám ve fyziologii

cílových buněk (intoxikace) a k supresi funkcí napadených leukocytů (např. chemotaxe, fagocytóza a oxidativní vzplanutí). CyaA je také schopen vytvářet v membráně cílových buněk póry a tím narušit membránový iontový gradient. V případě erytrocytů vede tato aktivita k jejich osmotické lyzi a je proto nazývána aktivitou **hemolytickou**. Pro oblast nádorové imunoterapie je toxin CyaA zajímavý z hlediska jeho možného využití jako vektoru při tvorbě vakcín (viz. dále).

1.3.1. Struktura a funkce CyaA

CyaA je polypeptid o molekulové hmotnosti 177 kDa (Gentile et al., 1990), který je složen ze 1706 aminokyselin. Je tvořen dvěma funkčními doménami (Obr.1). Katalytická **adenylát cyklázová** doména (400 AK na N-konci) vstupuje do cytosolu hostitelské buňky, kde po aktivaci eukaryotickým kalmodulem katalyzuje konverzi buněčného ATP v cAMP. **Hemolytická** doména (1306 AK na C-konci) zprostředkuje vazbu a vstup katalytické domény do buňky a je zodpovědná za indukci tvorby kanálů v buněčné membráně (hemolýza). Ze strukturního hlediska můžeme protein rozdělit na 4 oblasti (Obr.1):

1. **adenylát cykláza** (AK 1-400): adenylát cyklázová aktivita, vazba kalmodulinu, vazba ATP
2. **hydrofobní oblast** (4 hydrofobní segmenty, AK 500-700): tvorba kation-selektivních kanálů v membráně
3. **nonapeptidové repetic** bohaté na **glycin/aspartát** (AK 1000-1600): vazba vápníku, vazba k CD11b receptoru
4. **C-koncová oblast** (AK 1600-1706): sekreční signál



Obr. 1. Schématické znázornění struktury CyaA (upraveno podle Simsova et al., 2004).

Gen *cyaA* je exprimován ze samostatného promotoru a je součástí operonu, který kóduje 5 genů: *cyaABCDE* (Mock, 1993). Další promotor, ze kterého jsou exprimovány geny *cyaB*, *cyaD* a *cyaE*, a které jsou nezbytné pro sekreci adenylát cyklázového toxinu CyaA (Glaser et al., 1988), se nachází mezi geny *cyaA* a *cyaB*. Gen *cyaC* je transkribován v opačném směru. Jeho produkt je acyltransferáza, která zajišťuje posttranslační acylaci proteinu CyaA. CyaA je syntetizován jako inaktivní protoxin a teprve po kovalentní posttranslační palmitoylaci Lys-983 dojde k přeměně inaktivního prekursoru CyaA v aktivní toxin, který je schopný vazby k buněčnému povrchu, tvorby kanálů v membráně a průniku do cytosolu hostitelských buněk (Hackett et al., 1994). Bylo zjištěno, že posttranslační acylace CyaA protoxinů produkovaných v *B. pertusis* a v *E. Coli* jsou odlišné (Hackett et al., 1995). CyaA pocházející z *B. pertusis* je výhradně palmitoylován a to pouze na Lys-983. Protoxin produkovaný v *E. coli* je na Lys-983 z části palmitoylován a z části myristilován a navíc je ještě acylován na Lys-860. Tato dvojí acylace způsobuje sníženou schopnost hemolýzy rekombinantního proteinu, AC aktivita není ovlivněna (Hackett et al., 1995), (Basar et al., 2001).

Před časem bylo zjištěno, že CyaA se váže na $\alpha_M\beta_2$ integrinový receptor CD11b/CD18 (komplementový receptor typu 3 - CR3, MAC-1) (Guermónprez et al., 2001), který je exprimován na myeloidních buňkách: makrofázích, neutrofilech, subpopulaci dendritických buněk a na NK buňkách. Hlavním biologickým významem této interakce je zřejmě imunoprese v důsledku intoxikace cílových buněk, sloužící jako únikový mechanismus *Bordetelly* před časnou nespecifickou imunitní odpovědí. CyaA je ale schopen pronikat také do širokého spektra eukaryotických buněk postrádajících receptor CD11b/CD18, s různou účinností je intoxikovat a má dokonce schopnost pronikat i do umělých membrán připravených z fosfolipidů (Masin et al., 2004). V případě buněk nehematopoetického původu však intoxikace neovlivňuje jejich životaschopnost, což pravděpodobně souvisí právě s nepřítomností specifického receptoru CD11b/CD18 na jejich povrchu (Guermónprez et al., 2001). Je pravděpodobné, že vazbou na receptor se v membráně stabilizuje správná konformace toxinu. Molekulu CD11b/CD18 rovněž neexprimují savčí erytrocyty, které byly ještě v nedávné minulosti široce používány pro výzkum interakcí CyaA s cílovou membránou.

Důležitým cílem účinku CyaA jsou tedy buňky exprimující receptor

CD11b/CD18. Pro vazbu k tomuto receptoru není potřebná katalytická doména toxinu. Hlavní vazebná oblast pro receptor se nachází mezi aminokyselinami 1166 a 1281, tedy v oblasti bohaté na glycin/aspartát (El-Azami-El-Idrissi et al., 2003). Tato oblast (AK 1000-1600) se skládá z 5 bloků nonapeptidových opakování, které řadí CyaA do rodiny tzv. RTX proteinů (Repeats in ToXin). Bloky repetice, na které se může navázat až 45 iontů vápníku se skládají ze 17 opakování sekvence X-(L/I/V)-X-G-G-X-G-X-D a z až 33 dalších degenerovaných repetice (Osicka et al., 2000), (El-Azami-El-Idrissi et al., 2003). Po vazbě CyaA na povrch eukaryotických buněk a navázání iontů Ca^{2+} do oblasti repetice dochází ke konformačním změnám v molekule toxinu a k následné translokaci adenylát cyklázy do buněk (Hewlett et al., 1991), která zde po aktivaci endogenním kalmodulem katalyzuje konverzi ATP v cAMP. Velmi rychle (v řádu sekund) se začne syntetizovat cAMP, přičemž nejvyšší syntéza probíhá mezi 10-40 minutou. Hladina cAMP se v buňce zvýší až 1000x a v nefyziologické koncentraci je pro buňky toxická. Výsledkem buněčné intoxikace neutrofilů a makrofágů, která proběhla v závislosti na vazbě k receptoru CD11b/CD18 je neschopnost fagocytózy, inhibice chemotaxe a oxidativního vzplanutí (Confer and Eaton, 1982) a indukce apoptózy makrofágů (Khelef and Guiso, 1995). CyaA také dokáže modulovat aktivaci a maturaci dendritických buněk (Boyd et al., 2005).

Přesný mechanismus translokace AC domény CyaA přes buněčnou membránu není doposud znám. Jisté je, že translokace je závislá na přítomnosti Ca^{2+} iontů a na teplotě, neboť probíhá pouze při teplotě nad 20°C. Samotná inzerce toxinu do membrány probíhá již při 4°C (Rogel and Hanski, 1992). Pro translokaci je dále důležitý elektrostatický náboj centrální oblasti katalytické domény (AK 224-242) polypeptidového řetězce, což má význam při konstrukci rekombinantních CyaA. Pro internalizaci a intoxikaci je důležitý též potenciál plazmatické membrány (Otero et al., 1995).

Kromě adenylát cyklázové aktivity má acylovaný CyaA ještě aktivitu hemolytickou. Tato aktivita je závislá na přítomnosti Ca^{2+} iontů, stejně jako vazba, translokace AC toxinu přes buněčnou membránu a intoxikace (Gray et al., 1998), (Rose et al., 1995). Za hemolytickou aktivitu je zodpovědná tzv. hemolytická doména CyaA, která se nachází v oblasti C-koncových 1306 aminokyselin toxinu. Pro tvorbu pórů v membráně je důležitá hydrofobní oblast mezi aminokyselinami 500-700. Vytvořené póry mají malý průměr (asi 0,6-0,8 nm) a jsou selektivní pro malé kationty (Benz et al., 1994). Dříve se předpokládalo, že právě těmito póry prostupuje

katalytická doména CyaA do cytoplazmy, což je ale z důvodu jejich malé velikosti vyloučeno.

Zdá se, že intoxikace a hemolytická aktivita CyaA jsou dva nezávislé procesy (Gray et al., 1998) a předpokládá se, že souvisí s různou konformací CyaA vloženého do buněčné membrány. Pro tvorbu hemolytických kanálů je nutné, aby CyaA byl zakotven v membráně jako tzv. kanálový prekursor, s adenylát cyklázovou doménou umístěnou na vnější straně membrány (Osickova et al., 1999). Tvorba kanálů je rovněž závislá na oligomerizaci CyaA monomerů (Gray et al., 1998). Translokace AC domény do buňky vyžaduje jinou konformaci CyaA v membráně, tzv. translokační prekursor a nevyžaduje oligomerizaci. Prakticky okamžitě po styku s toxinem dochází k intoxikaci a odplavení K^+ z buňky. Naopak hemolytická aktivita je cca prvních 90 minut zanedbatelná a vyžaduje vyšší koncentraci toxinu (Gray et al., 1998).

V C-koncové oblasti molekuly je obsažen sekreční signál. Na rozdíl od většiny RTX proteinů však po sekreci z *B. pertusis* zůstává většina CyaA asociována s bakteriálním povrchem, zřejmě v komplexu s vláknitým hemaglutininem (FHA) (Zaretzky et al., 2002) a jen malá část je sekretována do supernatantu. Bylo zjištěno, že stejně jako CyaA i FHA interaguje s receptorem CD11b/CD18 (Relman et al., 1990). Asociace CyaA a FHA v souvislosti s vazbou k CD11b/CD18 by mohla mít význam při účinnější likvidaci leukocytů *Bordetellou*, protože bylo zjištěno, že intaktní bakterie je schopna intoxikovat cílové buňky účinněji než volný toxin pocházející z bakterie s mutovaným FHA (Zaretzky et al., 2002).

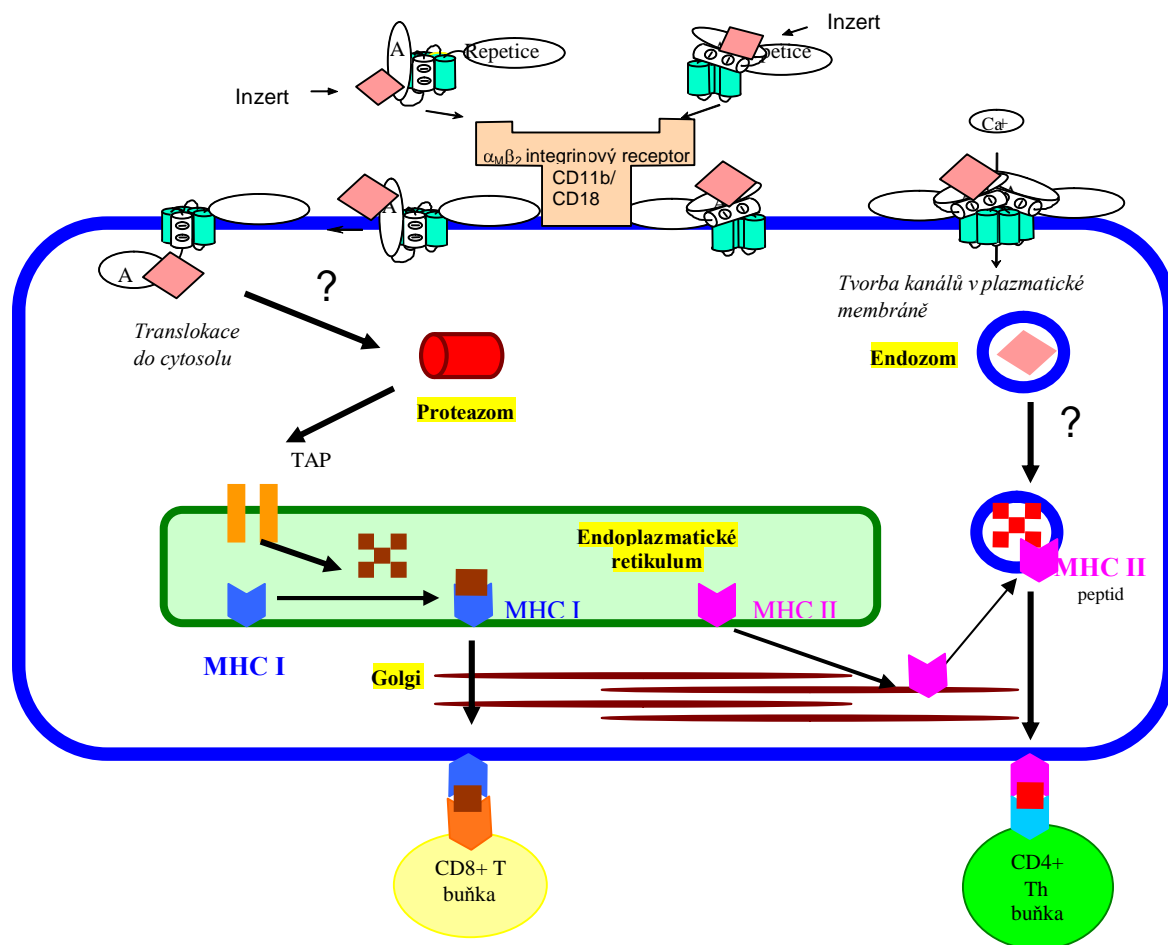
1.3.2. Použití rekombinantního proteinu CyaA jako vakcíny

Detoxifikovaná varianta CyaA může být použita jako nereplikativní proteinový vektor v imunoterapii. Epitop pocházející z patogena nebo nádorové buňky, který byl vložen do katalytické části molekuly CyaA je dopraven do cytoplazmy buněk prezentujících antigen a následně je prezentován prostřednictvím MHC-I i MHC-II molekul na jejich povrchu. Samotná inserce cizorodého fragmentu do molekuly CyaA může vést ke zrušení enzymatické adenylát cyklázové (AC) aktivity, avšak není to pravidlem. Z toho důvodu je bezpečnější používat ke konstrukcím geneticky detoxifikovanou variantu CyaA, kdy je mezi Asp188 a Ile189 vložen dipeptid GlySer (Fayolle et al., 2001) nebo LeuGln (Ladant et al., 1992). Insercí dipeptidu do této oblasti dojde k přerušení vazebného místa pro ATP a tím ke

zrušení cAMP syntetické aktivity (Ladant et al., 1992).

K přenosu peptidů do buněčného cytosolu je zapotřebí zachování invazivní aktivity toxinu, která však může být po vložení insertu porušena. Uvnitř katalytické domény bylo proto identifikováno několik míst, do kterých lze vložit insert bez porušení invazivity toxinu (Ladant et al., 1992), (Osicka et al., 2000). Schopnost translokace záleží ale i na velikosti vkládaného fragmentu. Bylo zjištěno, že CyaA je tolerantní k inzerci fragmentů až o velikosti 187 AK (Gmira et al., 2001). Pro internalizaci má význam rovněž elektrostatický náboj katalytické domény v oblasti AK 224-242. Internalizace domény s negativně nabitým insertem vkládaným do této oblasti je snížena nebo zcela blokována (Karimova et al., 1998).

Jak již bylo zmíněno, přesný mechanismus translokace AC domény CyaA přes buněčnou membránu není znám. Současný model pro dopravu antigenu do cytosolu a jeho následnou prezentaci na buněčném povrchu předpokládá interakci CyaA s CD11b/CD18 receptorem a buď následnou translokaci AC domény přes buněčnou membránu nezávisle na endocytóze nebo dojde ke klathrinem zprostředkované endocytóze (Schlecht et al., 2004), (Simsa et al., 2004) (Obr. 2). Po vstupu CyaA do buňky dvěma různými cestami je AC doména zpracována dvěma různými způsoby (Schlecht et al., 2004). Pro prezentaci antigenu v komplexu s MHC-I je AC doména nesoucí antigen po translokaci v cytosolu zpracována proteazomy, peptidy jsou prostřednictvím TAP transportéru dopraveny do endoplazmatického retikula, kde se váží na nově syntetizované molekuly MHC-I, které jsou následně dopraveny na buněčný povrch a prezentovány CD8⁺ buňkám (Guermonprez et al., 1999). Dráha zpracovávající antigeny pro MHC-II prezentaci nepotřebuje aktivitu proteazomů ani TAP transportéru, ale je závislá na okyselení vesikulů aktivujícím proteázy, na „de novo“ syntéze MHC-II a dopravě přes Golgiho aparát (Schlecht et al., 2004). Je iniciována klathrinem zprostředkovanou endocytózou, po níž jsou peptidy proteolyticky zpracované v endozómech a následně prezentované CD4⁺ lymfocytům na povrchu buňky v komplexu s MHC-II (Loucka et al., 2002). Je však třeba připomenout, že CyaA je schopen pronikat do některých typů buněk způsobem nezávislým na přítomnosti CD11b/CD18 receptoru a endocytóze, jako je tomu v případě erytrocytů (Guermonprez et al., 2001).



Obr. 2. Model zpracování antigenů pro prezentaci CD8⁺ a CD4⁺ lymfocytům (upraveno podle Simsova et al., 2004).

Pro vývoj vakcín je důležité, že CyaA je schopen dopravit antigeny do cytosolu buněk prezentujících antigen, které je prezentují na svém povrchu a stimulují specifické CD4⁺ i CD8⁺ T-buněčné odpovědi *in vitro* a zejména že dokáže vyvolávat účinnou protektivní a/nebo terapeutickou odpověď *in vivo* na zvířecím modelu po čelení nádorovými buňkami nebo virem. Modelovým antigenem pro indukci CD4⁺ T-buněčné odpovědi je epitop proteinu vázajícího maltózu MalE₁₀₀₋₁₁₄ z *E.coli* (Loucka et al., 2002). Specifická CD8⁺ T-buněčná odpověď byla detekována např. po podání rekombinantního CyaA nesoucího modelový epitop z kuřecího ovalbuminu OVA₂₅₇₋₂₆₄ (Fayolle et al., 1999), epitop viru lymfocytární choriomeningitidy LCMV (AK 118-132) (Saron et al., 1997), epitop z V3 oblasti gp120 (AK 316-327) viru HIV-1 (Fayolle et al., 1996), Tat viru HIV-1 (Mascarell et al., 2005), E7 protein

lidského papillomaviru 16 (Mackova et al., 2006), (Preville et al., 2005) nebo epitopy exprimované na melanomových buňkách odvozené od tyrozinázy Tyr (AK 369-377) a z intronu genu kódujícího *N*-acetylglucosaminyl transferázu V (GnT-V) (Dadaglio et al., 2003). Odpovědi jsou dlouhodobé, detekované až 5 měsíců po poslední injekci (Dadaglio et al., 2003) a lze je vyvolat i podáním jedné dávky CyaA bez adjuvans.

CyaA je také schopen dopravit do cytosolu různé epitopy vložené v různých pozicích toxinu a indukovat specifické CTL zároveň proti několika epitopům. Epitopy z LCMV (AK 118-132), V3 oblasti gp120 lidského HIV-1 (AK 316-327) a kuřecího ovalbuminu OVA (AK 257-264), které byly vloženy do CyaA jako jediný polyepitop, indukovaly jak specifické CTL proti jednotlivým epitopům, tak chránily myši před čelenží virem LCMV (Fayolle et al., 2001). Jednotlivé epitopy je možné vkládat do různých permisivních pozic v CyaA také současně a indukovat tak zároveň specifickou CD4⁺ i CD8⁺ T-buněčnou imunitní odpověď (Schlecht et al., 2004). Při výběru vhodného místa pro inserci epitopu do molekuly CyaA je však třeba mít na mysli, že pouze v některých z nich modelové epitopy účinně stimulují specifické T-lymfocyty (Osicka et al., 2000), (Fayolle et al., 2001), (Loucka et al., 2002).

Bylo pozorováno, že imunitní odpověď k antigenu, která je indukovaná prostřednictvím vektoru CyaA vnášejícího antigen ve své AC doméně je Th1 polarizovaná a CTL odpověď vůči antigenu není závislá na přítomnosti CD4⁺ Th lymfocytů a CD40 signalizaci (Guermonprez et al., 2002), (Schlecht et al., 2004), (Mascarell et al., 2005). Bylo zjištěno, že CD8 epitopy vložené do katalytické domény jsou *in vitro* i *in vivo* dopraveny do cytoplazmy CD11b⁺ dendritických buněk. Subpopulace těchto buněk má fenotyp: CD11c⁺CD8α⁻CD11b^{high} (Guermonprez et al., 2002). Je zajímavé, že CD4⁺ T-buněčná odpověď vyvolaná CyaA-MalE₁₀₀₋₁₁₄ je Th1 polarizovaná (Schlecht et al., 2004), ale tento typ cílové subpopulace DC by měl primárně podporovat Th2 polarizaci odpovědi (Moser and Murphy, 2000). CyaA tedy zřejmě způsobí přesměrování DC směrem k aktivaci Th1, nicméně mechanismus tohoto působení nebyl doposud prozkoumán. Také bylo zjištěno, že toxoid CyaA-HIV1-Tat indukuje Th1 polarizovanou odpověď, narozdíl od Th2 typu odpovědi, která vzniká po podání samotného Tat bez molekuly CyaA. Vložením Tat do molekuly CyaA byla také zrušena transaktivační aktivita Tat (Mascarell et al., 2005).

Zajímavou kapitolou je působení CyaA podaného současně s antigenem. Bylo

zjištěno, že CyaA v tomto případě působí adjuvantně a moduluje imunitní odpověď proti danému antigenu (MacDonald-Fyall et al., 2004), (Hormozi et al., 1999), (Ross et al., 2004), (Boyd et al., 2005). MacDonald-Fyall a kolegové pozorovali, že po podání toxinu CyaA současně s antigenem byl CyaA schopen navodit specifické zvýšení protilátkové imunitní odpovědi proti danému antigenu. Detoxifikovaná varianta vzniklá insercí dipeptidu LeuGln mezi kodony 188 a 189, fungovala jako lepší adjuvans než divoká forma CyaA (MacDonald-Fyall et al., 2004). Opačný výsledek získal Boyd a kolegové, totiž že CyaA s inaktivovanou AC aktivitou (CyaA byl vytvořen jiným způsobem - substitucí 3 AK H63A/K65A/S66G) má adjuvantní aktivitu sníženou a nemá schopnost aktivace dendritických buněk a makrofágů (Boyd et al., 2005). Mechanismus adjuvantního působení CyaA není doposud znám. Je známo, že cAMP působí imunomodulačně a právě AC aktivita toxinu je zřejmě pro jeho adjuvantní účinek důležitá. U detoxifikovaného konstruktů vzniklého insercí dipeptidu v molekule CyaA je AC aktivita podstatně redukována, je cca 100x nižší než u nedetoxifikovaného proteinu, ale v nepatrném zbytkovém množství existuje (MacDonald-Fyall et al., 2004). Je možné, že pro adjuvantní působení je klíčové množství vzniklého cAMP, které nesmí být příliš vysoké, aby nebylo pro buňku toxické. U dendritických buněk dojde vlivem zvýšení hladiny cAMP po inkubaci s toxinem CyaA *in vitro* k inhibici produkce prozánětlivých cytokinů IL-12 a TNF- α a dále k zesílení produkce IL-10 a IL-6 (Bagley et al., 2002), (Boyd et al., 2005), (Ross et al., 2004), což podporuje indukci CD4⁺ Th2 a Tr1 odpovědi (Ross et al., 2004), (Boyd et al., 2005). Další faktor důležitý pro adjuvantní působení toxinu je zřejmě přítomnost zbytkového množství lipopolysacharidu v preparacích CyaA, který je získáván produkcí v *E. coli*. Množství LPS se různí v jednotlivých preparacích CyaA, i v závislosti na metodě použité k purifikaci toxinu. Při standardní purifikaci zahrnující chromatografii na DEAE-Sepharose a phenyl-Sepharose (Guermonprez et al., 2000) se množství LPS pohybuje řádově mezi 15000-20000 EU/mg ACT (1 EU=83 pg LPS). Použitím dalších purifikačních kroků lze množství LPS minimalizovat až na <100 EU/mg toxinu (Tartz et al., 2006). Je známo, že LPS působí jako hlavní stimulant prozánětlivých cytokinů a podporuje dozrávání dendritických buněk. Kontrolní skupiny, ve kterých byl použit teplotně inaktivovaný CyaA a CyaA s přidaným LPS ale naznačují, že adjuvantní účinek nelze přisoudit pouze lipopolysacharidu, ale je za něj zřejmě zodpovědná i samotná molekula CyaA (MacDonald-Fyall et al., 2004), (Ross et al., 2004). Podle Rosse a kolegů CyaA

neovlivňuje produkci cytokinů dendritickými buňkami přímo, ale je schopen regulovat odpovědi vyvolané lipopolysacharidem, ligandem TLR-4 (synergie k indukci IL-10 a suprese IL-12, TNF α a MIP-1, které jsou indukované LPS) (Ross et al., 2004). CyaA je také schopen ovlivňovat produkci cytokinů vyvolanou CpG-ODN, tedy ligandem TLR-9. V myši defektní pro TLR-4, CyaA v kombinaci s CpG rovněž indukovalo produkci IL-10 a inhibovalo produkci TNF- α , IL-12p70 a CCL3 vyvolanou CpG-ODN (Boyd et al., 2005). Zdá se, že pro modulaci produkce cytokinů makrofágy je důležitá jeho interakce s receptorem CD11b/CD18 (Boyd et al., 2005). Signální dráha spuštěná molekulou CyaA v závislosti na vazbě k receptoru CD11b/CD18 však nebyla doposud zkoumána. Na výsledném imunomodulačním a adjuvantním efektu CyaA se tedy zřejmě podílí souhra různých signálních drah, zahrnujících vazbu k receptoru CD11b/CD18, signalizaci cAMP a Toll-like receptory (TLR). Přesné mechanismy jejich působení je však třeba ještě v budoucnu objasnit.

Při použití CyaA jako vakcíny je také nutné počítat se vznikem neutralizačních IgG protilátek proti CyaA. Tyto protilátky jsou zvýšeny cca 40-50x po podání 2. dávky CyaA (MacDonald-Fyall et al., 2004). Z dosavadních výsledků však vyplývá, že ani vznik relativně vysokých množství neutralizačních protilátek proti CyaA po opakovaném podání samotného vektoru před imunizací rekombinantním CyaA s antigenem nebrání vzniku specifické CTL odpovědi proti modelovým epitopům (Fayolle et al., 2001). Jednou z možností jak se přesto vyhnout vzniku většího množství protilátek proti vektoru by pak mohlo být použití různých typů vektorů pro dopravu antigenu, tzv. „prime-boost“ způsob imunizace.

Výsledky imunizací CyaA toxoidem získané z experimentů na zvířecích modelech jsou velmi slibné. Z toho důvodu by měla být v roce 2007 za účasti firmy BT PHARMA (Francie) zahájena klinická studie fáze I/II na lidských pacientech. Tato studie se bude týkat terapie preneoplastických lézí a terapie cervikálního karcinomu, indukovaných papilomaviry. Vakcína bude nazvaná **ProCervix** (<http://www.btpharma.com/>).

2. VÝSLEDKY

2.1. Vliv modifikací genetických vakcín na zvyšování buněčné imunitní odpovědi specifické pro antigen E7 viru HPV-16

Publikace 1:

Immune response to E7 protein of human papillomavirus type 16 anchored on the cell surface.

Nemeckova S, Stranska R, Subrtova J, Kutinova L, Otahal P, Hainz P, Maresova L, Sroller V, Hamsikova E, Vonka V.

Cancer Immunol Immunother. 2002 Apr;51(2):111-9

V této práci jsme poprvé testovali buněčnou imunitu u myší, která byla indukována třemi různými rekombinantními viry vakcínie. Jeden z nich exprimoval kompletní gen E7 viru HPV-16, další pak fúzní gen Sig/E7/LAMP (Lin et al., 1996), jehož produktem je protein E7 spojený se signální a transmembránovou doménou proteinu LAMP-1 a třetí exprimoval gen E7/HA, kde byl E7 fúzován s částmi genu pro hemaglutinin (HA) viru vakcínie. Fúzní geny zajistily rozdílnou buněčnou lokalizaci proteinu E7. Sig/E7/LAMP je směrován do endosomálního a lyzozomálního kompartmentu, což zlepšuje jeho prezentaci prostřednictvím MHC molekul II. třídy (Wu et al., 1995). E7/HA je lokalizován na buněčném povrchu.

Pro testování buněčné imunity jsme zavedli metody ELISPOT a fluorescenční značení MHC-I tetramerem. Metodou ELISPOT jsme testovali produkci IFN- γ , která je znakem Th-1 a CTL odpovědi a produkci IL-4, který značí Th-2 odpověď. Splenocyty jsme kultivovali 6 dní *in vitro* v přítomnosti nebo nepřítomnosti peptidů odvozených od proteinu E7. Použili jsme minimální CTL epitop E7₄₉₋₅₇ (RAHYNIVTF) a E7₄₄₋₆₂ (8Q, QAEPDRAHYNIVTF), který obsahuje epitopy pro T (CD8⁺ i CD4⁺) i B lymfocyty. MHC-I tetramer H-2D^b/E7₍₄₉₋₅₇₎ fluorescenčně značený phycoerythrinem jsme připravili podle J.D. Altmana (Altman et al., 1996) ve

spolupráci s NIH Tetramer Core Facility, Emory University v Atlantě (USA). Značili jsme jím rovněž splenocyty kultivované 6 dní v přítomnosti nebo nepřítomnosti E7 peptidů.

Zjistili jsme, že viry exprimující E7 a Sig/E7/LAMP indukovaly u myší CTL specifické pro E7 a produkci IFN- γ a rovněž jsme potvrdili zvýšení imunogenity E7 po fúzi s částmi genu LAMP-1. Naopak imunizace rVV-E7/HA nevyvolala odpověď CTL nebo Th-1 lymfocytů a vedla k indukci spíše Th-2 polarizované odpovědi.

Publikace 2:

Adjuvant effect of dendritic cells transduced with recombinant vaccinia virus expressing HPV16-E7 is inhibited by co-expression of IL12.

Mackova J, Kutinova L, Hainz P, Krystofova J, Sroller V, Otahal P, Gabriel P, Nemeckova S.

Int J Oncol. 2004 Jun;24(6):1581-8

V této práci jsme sledovali imunogenitu rekombinantních virů vakcínie kmene Praha nebo MVA, které exprimovaly antigen E7 viru HPV-16 nebo koexprimovaly E7 a Th-1 polarizační cytokin IL-12. Zjistili jsme, že replikující se rekombinantní virus vakcínie kmene Praha (klon P13) je imunogennější než vysoce atenuovaný a replikačně defektní virus MVA. Dále jsme zjistili, že exprese IL-12 ve dvojité rekombinantních virech inhibovala specifickou buněčnou imunitu namířenou proti antigenu E7. Obdobný efekt jsme pozorovali i při sledování růstu nádorů po „čelenži“ nádorovými buňkami TC-1 myší imunizovaných dendritickými buňkami odvozenými z kostní dřeně, které byly transdukovány dvojité rekombinantním virem vakcínie koexprimujícím Sig/E7/LAMP a IL-12. Exprese IL-12 zde zcela zrušila adjuvantní efekt dendritických buněk a ochranu před růstem nádorů.

Publikace 3:

Enhancement of immunogenicity of HPV16 E7 oncogene by fusion with *E. coli* beta-glucuronidase.

Smahel M, Pokorna D, Mackova J, Vlasak J.

J Gene Med. 2004 Oct;6(10):1092-101

Zde jsme testovali vliv fúze antigenu E7 s β -glukuronidázou *E. coli* (GUS) na buněčnou imunitní odpověď po vakcinaci DNA genovou pistolí. DNA vakcína obsahovala mutovaný gen E7 (E7GGG), ve kterém byly aminokyseliny D₂₁, C₂₄, E₂₆ nahrazeny glycinem (Smahel et al., 2001a). Zjistili jsme, že E7 fúzovaný s β -glukuronidázou (E7GGG/GUS) je imunogennější než E7GGG i než fúzní Sig/E7GGG/LAMP. Dále delece části genu GUS, která vedla k eliminaci enzymatické aktivity, neovlivnila imunogenitu E7GGG a rovněž trojnásobné zvýšení počtu kopií E7 v konstrukt E7GGG(3x)/GUS indukovanou specifickou CD8⁺ buněčnou imunitní odpověď nezvýšily.

Publikace 4:

Combined immunization with DNA and transduced tumor cells expressing mouse GM-CSF or IL-2.

Rittich S, Duskova M, Mackova J, Pokorna D, Jinoch P, Smahel M.

Oncol Rep. 2005 Feb;13(2):311-7

V této práci jsme zjišťovali vliv různých kombinací DNA vakcíny nesoucí gen Sig/E7GGG/LAMP podané prostřednictvím genové pistole a živých buněčných vakcín sekretujících GM-CSF (buňky B9) nebo IL-2 (buňky 181) na buněčnou imunitu. V porovnání s imunizací dvěma dávkami buněčné vakcíny zvýšilo použití „prime-boost“ schématu imunizace, kdy byla aplikována první dávka DNA vakcíny a druhá dávka buněčné vakcíny indukci specifické CD8⁺ T-buněčné imunitní odpovědi.

Publikace 5:

Combined immunization with fusion genes of mutated E7 gene of human papillomavirus type 16 did not enhance antitumor effect.

Pokorna D, Mackova J, Duskova M, Rittich S, Ludvikova V, Smahel M.

J Gene Med. 2005 Jun;7(6):696-707

Zde jsme porovnávali imunogenitu DNA vakcín nesoucích antigen E7 nebo E7GGG fúzovaný s proteinem teplotního šoku HSP70 (heat-shock protein 70), o kterém je známo, že je schopen zvýšit imunitní odpověď k antigenu se kterým je fúzován. Potvrdili jsme, že imunitní odpověď indukovaná geny E7 i E7GGG fúzovanými s HSP70 je vyšší, než po imunizaci jednoduchými geny E7 nebo E7GGG.

Publikace 6:

DNA vaccines based on chimeric potyvirus-like particles carrying HPV16 E7 peptide (aa 44-60).

Pokorna D, Cerovska N, Smahel M, Moravec T, Ludvikova V, Mackova J, Synkova H, Duskova M, Hozak P, Veleminsky J.

Oncol Rep. 2005 Oct;14(4):1045-53

V této práci jsme sledovali imunogenitu DNA vakcín nesoucích sekvenci kódující peptid E7₄₄₋₆₀ fúzovaný s C-koncovou oblastí genu kódujícího celý obalový protein (CP) rostlinného potyvirusu PVA (potato virus A) nebo jeho zkrácenou formu (CPdel), která postrádala 5 aminokyselin na C-konci. Protein CP je schopen vytvářet pseudopartikule (VLP), které by později mohly být použity pro produkci E7 v rostlinách a pro tvorbu rostlinných vakcín. Zjistili jsme, že imunizace myši fúzními geny CP-E7₍₄₄₋₆₀₎ a CPdel-E7₍₄₄₋₆₀₎ indukuje srovnatelnou CD8⁺ T-buněčnou imunitní odpověď, která je mírně vyšší než po podání samotného celého E7, avšak je nižší, než imunitní odpověď indukovaná DNA vakcínou nesoucí Sig/E7GGG/LAMP.

2.2. Konstrukce a testování vakcín na bázi CyaA

Publikace 7:

Prime/Boost Immunotherapy of HPV16-Induced Tumors With E7 Protein Delivered By *Bordetella* Adenylate Cyclase and Modified Vaccinia Virus Ankara.

Mackova J, Stasikova J, Kutinova L, Masin J, Hainz P, Simsova M, Gabriel P, Hamsikova E, Sebo P and Nemeckova S.

Cancer Immunol Immunother. 2006 Jan; 55(1):39-46

Toxin CyaA *Bordetelly pertusis* je schopen translokovat svou adenylát cyklázovou doménu přes membránu myeloidních leukocytů exprimujících CD11b/CD18 receptor (dendritické buňky) do cytoplazmy. V případě, že je do této domény vložena heterologní sekvence, je schopen ji dopravit do buněk prezentujících antigen a indukovat imunitní odpověď.

Vytvořili jsme několik rekombinantních toxoidů CyaA, které byly detoxifikovány zrušením cAMP syntetické aktivity po vložení dipeptidu mezi aminokyseliny 188 a 189 CyaA. Konstrukty nesly v různých pozicích kompletní sekvenci E7 viru HPV-16 nebo pouze cytotoxický epitop E7₄₉₋₅₇ (nepublikováno). Pro tuto publikaci jsme vybrali nejúčinnější konstrukt, který měl kompletní sekvenci E7 vloženou v aminokyselinové pozici 336 toxoidu CyaA (CyaA336/E7). Porovnávali jsme ho s konstruktem CyaA1334/E7, který nesl kompletní sekvenci E7 v pozici 1334, tedy v hemolytické doméně CyaA, která není translokována do buňky.

Zjistili jsme, že toxoid CyaA336/E7 je na rozdíl od CyaA1334/E7 schopen indukovat buněčnou imunitní odpověď, která je Th-1 polarizovaná a chránit myši před růstem TC-1 nádorů v preventivním i terapeutickém schématu uspořádání. Dalšího zlepšení imunizačních účinků bylo dosaženo po kombinovaném podání vakcíny („prime-boost“) CyaA336/E7 a viru vakcínie MVA-Sig/E7/LAMP. Kombinace první dávky CyaA336/E7 („prime“) a druhé dávky MVA-Sig/E7/LAMP („boost“) indukovala nejvyšší množství CTL a chránila 100% myši před růstem TC-1 nádorů.

3. SOUHRNNÁ DISKUSE

Disertační práce „Vývoj terapeutické vakcíny proti nádorům vyvolaným lidským papilomavirem 16 – vliv modifikace antigenu E7 na buněčnou imunitní odpověď“ byla vypracována na myším modelu C57BL/6. Tyto myši mají haplotyp H-2^b. Pro tento haplotyp byly v proteinu E7 viru HPV-16 identifikovány Th i CTL epitopy. Jako hlavní Th buněčný epitop byla popsána sekvence DRAHYNI (E7₄₈₋₅₄) (Tindle et al., 1991) a jako CTL epitop byla zjištěna sekvence RAHYNIVTF (E7₄₉₋₅₇) (Feltkamp et al., 1993). Pro testy buněčné imunity *in vitro* jsme pak používali jednak minimální CTL epitop E7₄₉₋₅₇ a jednak peptid 8Q (E7₄₄₋₆₂, QAEPDRAHYNIVTFCKCD), který kromě CTL epitopu obsahuje ještě Th a B buněčný epitop (Tindle et al., 1991).

V první fázi jsme na našem pracovišti zavedli metody pro testování buněčné imunity. Nejprve jsme v rámci 14-denní stáže v laboratoři Dr. J. Lippolise a Dr. J.D. Altmana (Tetramer Core Facility, Emory University, Atlanta, USA), která se specializuje na produkci MHC tetramerů, vyprodukovali biotinylované MHC-I monomery složené z molekul H-2D^b a peptidu E7₄₉₋₅₇. Tyto monomery jsme pak prostřednictvím vazby k fluorescenčně (R-phycoerythrin) značenému streptavidinu převedli do formy tetramerů H-2D^b/E7₄₉₋₅₇, které jsou schopny stabilní vazby k příslušnému specifickému CTL. Následně jsme tyto tetramery začali využívat pro *in vitro* detekci přítomnosti E7₄₉₋₅₇ specifických CTL v suspenzi splenocytů prostřednictvím průtokové cytometrie. Kromě nutné titrace tetrameru jsme museli zjistit nejvhodnější dobu pro odběr slezin, kterou jsme stanovili na 12-14 dní po imunizaci. Rovněž jsme zjistili, že množství CTL v čerstvě izolovaných splenocytech je příliš nízké a museli jsme proto kultivovat splenocyty *in vitro* v přítomnosti peptidu E7₄₉₋₅₇, přičemž se několikanásobně zvýšilo množství specifických CTL. Bylo nutné stanovit optimální podmínky kultivace. Ukázalo se, že množení specifických CTL je extrémně citlivé na koncentraci peptidu přítomného v médiu. Zjistili jsme, že příliš vysoké dávky peptidu inhibují množení CTL. Na rozdíl od literaturou obvykle doporučené dávky peptidu 1 µg/ml jsme toto množství museli v některých případech snížit až na 6,25 ng/ml. Optimální koncentrace pak závisela na dané šarži a čistotě peptidu a bylo ji nutné vždy znovu zjišťovat. Stejnou koncentraci peptidu jsme pak používali i pro test ELISPOT, kterým jsme zjišťovali produkci IFN-γ splenocyty.

Délka kultivace byla pro oba testy stejná, tedy 6 dní. Po stimulaci splenocytů peptidem 8Q jsme mohli sledovat produkci IFN- γ jak cytotoxickými T-lymfocyty, tak Th-1 lymfocyty. Po stimulaci tímto peptidem jsme rovněž mohli sledovat produkci IL-4, která je charakteristická pro Th-2 typ odpovědi. Test ELISPOT je citlivější než značení tetramerem neboť dokáže rozlišit jedinou buňku např. z 500 000 buněk, která produkuje daný cytokin. Proto jsme mohli tento test aplikovat i na čerstvě izolované splenocyty a zjišťovat tak frekvence specifických lymfocytů přítomných v danou dobu v myši. Získaný výsledek pak nebyl ovlivněn následnou 6-denní kultivací splenocytů *in vitro*. Obě uvedené metody jsme standardizovali a začali jsme je používat k vyhodnocování buněčné imunitní odpovědi proti různým způsobem modifikovanému antigenu E7 viru HPV-16 po jeho podání myším prostřednictvím různých typů vektorů. Velikost buněčné imunitní odpovědi k antigenu E7 se tak kromě hodnocení růstu modelových nádorů *in vivo* stala jedním z hlavních ukazatelů účinnosti dané vakcíny a důležitou součástí všech publikací, které tvoří tuto disertační práci. Na publikacích **1-6** jsem se podílela provedením a vyhodnocením testů buněčné imunity, v publikaci **7** jsem kromě toho také konstruovala vakcíny na bázi toxoidu CyaA.

Virus vakcínie

Výsledný efekt vakcinace je závislý na různých faktorech, zejména pak na typu vakcíny a způsobu imunizace, dále pak na množství exprimovaného antigenu a rovněž na jeho subcelulární lokalizaci. Bylo zjištěno, že cílené směrování antigenu do určitého buněčného kompartmentu může značně ovlivnit jeho imunizační schopnosti. Např. nasměrování antigenu E7 do endosomálního a lysosomálního kompartmentu po fúzi E7 se signální a transmembránovou sekvencí genu LAMP-1 podstatně zvyšuje specifickou odpověď k antigenu E7 (Ji et al., 1999).

V publikaci **1** jsme sledovali ovlivnění imunogenity E7 po **změně jeho buněčné lokalizace** z obvyklé jaderné na expresi na povrchu infikovaných buněk. Zjišťovali jsme buněčnou imunitu indukovanou rekombinantním virem vakcínie, ve kterém byla vnitřní část genu pro hemagglutinin (HA, mezi AK 64 a 275) nahrazena kompletní sekvencí antigenu E7. Produktem pak byl fúzní gen E7-HA, exprimovaný pod hemagglutininovým pozdním promotorem. E7-HA obsahoval transmembránovou sekvenci HA, která zajistila změnu buněčné lokalizace E7 antigenu. Zjistili jsme, že změnou lokalizace E7 došlo i ke změně typu indukované imunitní odpovědi. Zatímco virus vakcínie exprimující pouze antigen E7 vyvolal slabou odpověď typu Th-1, tedy

indukoval specifické CTL a produkci IFN- γ , virus nesoucí fúzní protein E7-HA tento typ odpovědi neindukoval a vyvolal spíše odpověď typu Th-2, charakterizovanou produkcí IL-4 a protilátek, které však v působení proti nádorovým buňkám nejsou účinné. Při nasměrování antigenu E7 na buněčný povrch byla tedy buněčná odpověď polarizována směrem k Th-2 a vznik protinádorové odpovědi typu Th-1 byl potlačen. Neúčinnost preventivní imunizace tímto virem proti růstu nádorů jsme pozorovali i *in vivo* na myším modelu, kdy jsme myši po vakcinaci čelenžovali modelovými nádorovými buňkami TC-1. Buňky TC-1, které po subkutánním podání vytvářejí hmatné nádory, nám poskytl T.-C. Wu (Baltimore, USA). Byly vytvořeny transformací primárních plicních buněk myši C57BL/6 onkogeny E6/E7 viru HPV-16 a aktivovaným *H-ras* (Lin et al., 1996).

Další faktor, který může ovlivnit protinádorovou odpověď a modifikovat tak imunizační schopnosti vakcíny jsou **cytokiny**. Jedním z nich by mohl být IL-12. IL-12 je znám jako Th-1 polarizační cytokin, který podporuje tvorbu CTL a Th-1 typu odpovědi, což současně potlačuje Th-2 odpověď. Podpora tohoto typu odpovědi je velmi důležitá pro protinádorovou odpověď. IL-12 také byl pro zvýšení protinádorové odpovědi v mnoha systémech použit. V publikaci 2 jsme podávali IL-12 prostřednictvím dvojité rekombinantního viru vakcínie, který koexprimoval IL-12 spolu se Sig/E7/LAMP a testovali jsme indukovanou cytotoxickou odpověď i *in vivo* ochranu před růstem nádorů za použití modelových nádorových buněk TC-1 u myší. V našem systému jsme však zjistili, že koexpresí IL-12 došlo k podstatnému snížení protinádorového efektu i E7 specifické CTL odpovědi, kterou vyvolává jednoduše rekombinantní virus vakcínie nesoucí jen Sig/E7/LAMP. Velmi důležitý je také výběr vhodného kmene rVV. Pracovali jsme se dvěma různými kmeny, jednak s klonem 13 kmene Praha a jednak s klonem 2 kmene MVA (**m**odified **v**accinia virus **A**nkara, originální kmen MVA poskytl Dr. W. Altenburger, Basilej). Oba tyto kmeny se liší svými vlastnostmi a rovněž i imunizačními schopnostmi. Kmen P13 je imunogennější, avšak také potenciálně nebezpečnější neboť se jedná o replikující se virus. Naproti tomu kmen MVA je vysoce oslabený díky delecím vedoucím ke ztrátě cca 15% původního genomu viru Ankara, není schopen replikace v lidských buňkách a je proto považován za bezpečný vektor. Je však také podstatně méně imunogenní. To jsme také potvrdili v této práci, kdy byla imunogenita Sig/E7/LAMP neseného oslabeným rVV kmene MVA, výrazně snížena a protinádorová odpověď prakticky nevznikala. V této publikaci jsme také pozorovali pozitivní vliv imunizace

dendritickými buňkami (DC) transdukovanými rVV. V porovnání s imunizací rVV exprimujícím Sig/E7/LAMP bylo po imunizaci DC infikovanými stejným rVV dosaženo lepšího protinádorového efektu, a to nejen u kmene P13, ale i u kmene MVA, kde samotný virus protinádorovou odpověď téměř neindukuje. Zajímavé je, že tento pozitivní vliv DC byl opět inhibován koexpresí IL-12 z rVV, a to i v případě podání DC infikovaných směsí rVV, kde byl podíl MVA-IL12-Sig/E7/LAMP:MVA-Sig/E7/LAMP=1:100. Určitým vysvětlením snížené imunogenity dvojitě rekombinantního rVV kmene P13 exprimujícího Sig/E7/LAMP a IL-12 by mohlo být snížení replikace tohoto viru *in vivo*. Rovněž vysoká produkce IL-12 z viru zřejmě vyvolává nespecifickou imunosupresi a je toxická. Protinádorový účinek IL-12 je pak spíše schopen se projevit, je-li podán v terapeutickém schématu imunizace, tedy až po čelení nádorovými buňkami. V našem případě, kdy jsme podávali nádorové buňky až za 2 týdny po podání vakcíny, však převládly imunosupresivní účinky IL-12 a projevila se omezená schopnost specifické imunizace virem se sníženou replikací.

DNA vakcíny

Dalším typem vakcín, které jsme testovali, byly DNA vakcíny. Jedná se o velmi slibný typ vektoru, který se vyznačuje snadnou přípravou, vysokou stabilitou, bezpečností a na rozdíl od virových vektorů možností podávání opakovaných dávek. Jejich nevýhodou je pak malá účinnost. Ta je zvyšována různými způsoby. Lze například zvýšit počet dávek vakcíny, modifikovat schéma imunizace nebo zvýšit dávku DNA vakcíny. Z důvodu zvýšení rizika možného vzniku vedlejších účinků a navýšení ceny takové léčby se však spíše hledají jiné způsoby. Velmi účinné je například podání kombinovaných vakcín, tzv. „prime-boost“ způsob imunizace, kdy je stejný antigen podán prostřednictvím různých vektorů. Dále jsou používány metody, které usnadňují vstup DNA do buněk. Nejméně účinný způsob podání je intramuskulární injekce nahé DNA. Byla proto vyvinuta řada fyzikálních, biochemických a biologických metod, pomocí kterých je DNA dopravena do buněk podstatně účinněji. Patří mezi ně např. elektroporace, ultrazvuk, laser, hydrodynamická metoda, použití genové pistole nebo doprava prostřednictvím mikroparticulí, lipozómů nebo virozómů. Další strategie jsou pak zaměřené na prodloužení nebo zvýšení exprese antigenu v cílových tkáních. Toho je dosahováno např. volbou vhodných regulačních elementů v expresní kazetě plazmidu nebo optimalizací kodónů pro zvýšení účinnosti translace. Dalším důležitým faktorem je

zvýšení imunogenosti vakcíny vedoucí k lepšímu zpracování antigenu a jeho účinnější prezentaci buňkami prezentujícími antigen. To lze ovlivnit modifikací antigenu (tvorba fúzních genů, přeskupených genů, přidání signální sekvence), úpravou plazmidu např. vnesením CpG motivů nebo použitím vhodného adjuvans.

V našich pokusech byla DNA imunizace prováděna prostřednictvím genové pistole. Při tomto způsobu podání je DNA vnášena do cílových buněk navázaná na částičky zlata, které jsou vstřelovány pod tlakem helia do kůže. Předpokládá se, že DNA je pak dopravena přímo do cytoplazmy nebo jádra buněk v epidermis, kde je exprimována. Zvyšování imunogenosti vakcíny bylo dosahováno prostřednictvím **fúze antigenu E7 s dalšími geny**. Vliv podání fúzních genů na buněčnou imunitu jsme testovali v publikacích **3, 5 a 6**. Jedním z testovaných genů byla β -glukuronidáza (GUS) *E.coli*. Výsledky jsme publikovali v publikaci **3**. β -glukuronidáza *E.coli* se obvykle používá jako reportérový gen v experimentech s transgenními rostlinami. Po jeho fúzi s mutovaným antigenem E7GGG, ve kterém byly kvůli snížení onkogenního potenciálu E7 a zrušení vazby k Rb proteinu aminokyseliny D₂₁, C₂₄, E₂₆ nahrazeny glycinem (Smahel et al., 2001a), byl fúzní gen E7GGG/GUS podán myším ve formě DNA vakcíny. Porovnávali jsme jeho imunogenitu s E7GGG a se Sig/E7GGG/LAMP, kde byl antigen E7GGG fúzován se signální a transmembránovou sekvencí genu LAMP-1. Zjistili jsme, že E7 fúzovaný s β -glukuronidázou (E7GGG/GUS) je imunogennější než E7GGG i než fúzní Sig/E7GGG/LAMP. Specifickou CD8⁺ T-buněčnou imunitní odpověď pak již dále nezvýšila přítomnost 3 kopií E7GGG v konstrukt E7GGG(3x)/GUS. Fúze E7GGG s GUS měla primárně za cíl zvýšit jeho stabilitu pro budoucí produkci v rostlinách. Ukázalo se však, že tato modifikace měla pozitivní vliv i na imunogenitu antigenu v živočišných buňkách. Zvýšená imunogenita nesouvisela s enzymatickou aktivitou GUS, protože konstrukt s delecí 77 AK v genu GUS (E7GGG.GUSdel), která vedla k eliminaci jeho enzymatické aktivity, neovlivnila imunogenitu E7GGG. Za zvýšenou imunogenitu pak nebyla zřejmě zodpovědná ani zvýšená míra exprese E7GGG.GUS, protože ta byla při nezměněné imunogenitě u konstrukt E7GGG.GUSdel snížena. Zvýšení imunogenity tak zřejmě zapříčinila změna buněčné lokalizace fúzního genu z převážně jaderné na cytoplazmatickou a/nebo přítomnost pomocných „helper“ epitopů v GUS.

Dalším genem, jehož vliv na zvýšení imunogenity antigenu E7 jsme testovali v publikaci 5, byl protein teplotního šoku HSP70 (heat-shock protein 70). Pozitivní vliv HSP70 proteinu z bakterie *Mycobacterium tuberculosis* na zvýšení CD8⁺ T-buněčné imunitní odpovědi k antigenu E7 viru HPV-16 se kterým byl fúzován a podán ve formě DNA vakcíny byl popsán v práci Chena a kolegů (Chen et al., 2000b). V publikaci 5 jsme porovnávali imunogenitu DNA vakcín nesoucích antigen E7 nebo E7GGG fúzovaný s myším HSP70.1. Zjistili jsme, že i fúze genů E7 nebo E7GGG s myším HSP70.1 podstatně zvyšuje E7 specifickou CD8⁺ T-buněčnou imunitní odpověď v porovnání s imunizací jednoduchými geny E7 nebo E7GGG. To znamená, že za zvýšení imunogenity nejsou zodpovědné bakteriální sekvence HSP. Také v tomto případě, stejně jako po fúzi E7GGG s GUS, došlo ke změně buněčné lokalizace E7 z převážně jaderné na cytoplazmatickou. Pro zvýšení imunogenity byla nutná imunizace fúzním genem E7-HSP, protože podání kombinované vakcíny obsahující HSP a E7 nebo E7GGG ji nezvyšovalo. Fúzí rovněž došlo ke zvýšení míry exprese a stability E7. Protein E7 je totiž sám o sobě velice nestabilní, jeho poločas života v eukaryotických buňkách je při 37°C kratší než 30 minut (Park et al., 1993).

Jako poslední fúzní gen jsme v publikaci 6 testovali CP-E7, což je krátký úsek genu E7 (E7₄₄₋₆₀) obsahující CTL i Th imunodominantní epitopy, spojený s C-koncovou oblastí genu kódujícího obalový protein (CP) rostlinného viru PVA (potato virus A). PVA je RNA virus patřící mezi Potyviry. Zajímavostí proteinu CP je jeho schopnost uspořádat se v buňkách do podoby virových pseudopartikulí (VLP). Tyto pseudopartikule by později mohly být použity pro produkci E7 v rostlinách a pro tvorbu rostlinných vakcín. Sekvence CP PVA byla použita celá nebo byla na C-konci zkrácena o 5 aminokyselin (CPdel), kvůli obavě z možného porušení tvorby VLP. To se však později nepotvrdilo a obě formy vytvářely VLP v prokaryotických i eukaryotických buňkách. Fúzní geny byly podávány ve formě DNA vakcíny prostřednictvím genové pistole. Zjistili jsme, že imunizace myši fúzními geny CP-E7₄₄₋₆₀ a CPdel-E7₄₄₋₆₀ indukovala srovnatelnou CD8⁺ T-buněčnou imunitní odpověď. Tato odpověď byla mírně vyšší než po podání DNA vakcíny se samotným celým antigenem E7, kde se navíc mohly uplatnit další imunostimulační sekvence. Byla však podstatně nižší než imunitní odpověď indukovaná DNA vakcínou nesoucí Sig/E7GGG/LAMP. Lokalizace CP antigenu v buňkách transfekovaných DNA nesoucí CP-E7₄₄₋₆₀ i CPdel-E7₄₄₋₆₀ byla cytoplazmatická.

Na závěr můžeme testované geny podávané ve formě DNA vakcín seřadit podle velikosti indukované CTL buněčné odpovědi následovně: E7 < E7GGG, CP-E7, Cpdel-E7 << Sig/E7/LAMP-1, Sig/E7GGG/LAMP-1 < E7HSP, E7GGGHSP < E7GGG.GUS, E7GGG(3x)GUS.

Buněčné vakcíny

V publikaci 4 jsme testovali buněčnou imunitu po kombinaci vakcinace DNA vakcínou nesoucí Sig/E7GGG/LAMP a živých buněčných vakcín produkujících imunostimulační cytokiny GM-CSF, který je nezbytný pro zrání a funkčnost dendritických buněk nebo IL-2, což je růstový faktor T-lymfocytů. Pro imunizaci byly použity živé buněčné vakcíny B9 a 181, které byly odvozené od myších buněk 123IA, což je sublinie nádorových buněk MK16/1/IIIABC, které byly odvozeny transformací onkogenu E6/E7 viru HPV-16 a aktivovaným H-ras ledvinných buněk z myši C57BL/6 (Smahel et al., 2001b). Buňky B9 exprimovaly myší GM-CSF a buňky 181 produkovaly IL-2. Linie B9 ani 181 nebyly v syngenních myších onkogenní. V této práci byla pro zvýšení imunitní odpovědi použita kombinovaná imunizace dvěma různými vakcínami. Kromě buněčných vakcín byly myši též imunizovány DNA vakcínou nesoucí Sig/E7GGG/LAMP za použití genové pistole. Co se týče hodnocení E7 cytotoxické imunitní odpovědi, v porovnání s jinými způsoby indukce specifické imunity (DNA vakcinace, rVV, CyaA), které jsou předmětem této disertační práce, však byla imunita indukovaná prostřednictvím buněčných vakcín poměrně nízká. Lze však říci, že o něco lepší výsledky byly dosaženy po podání buněk B9 než 181. V porovnání s imunizací dvěma dávkami buněčné vakcíny zvýšilo použití kombinovaného způsobu imunizace, kdy byla aplikována první dávka DNA vakcíny a druhá dávka buněčné vakcíny indukcí specifické CD8⁺ T-buněčné imunity. Tato imunita byla dále zvýšena zkombinováním buněčné vakcíny s 2. dávkou DNA vakcíny. Důležité je poznamenat, že používanými testy buněčné imunity jsme byli schopni detekovat pouze určitou část odpovědi, která je účinná proti nádorům. Je pravděpodobné, že se v boji proti nádorům uplatňují i jiné typy odpovědi vyvolané buněčnými vakcínami nebo odpovědi k jiným antigenům nebo k dalším epitopům. Rovněž odpověď u čerstvě izolovaných splenocytů, kdy detekujeme efektorovou imunitu se nemusí přesně shodovat s odpovědí splenocytů po kultivaci *in vitro*, kdy předpokládáme detekci paměťových buněk a nemůžeme vyloučit ani ovlivnění složení výsledné populace v důsledku kultivace.

CyaA

O toxinu CyaA *Bordetella pertussis* se před časem začalo uvažovat jako o možném vektoru při vývoji imunoterapeutických vakcín proti nádorům. K této myšlence vedla jeho zajímavá vlastnost, totiž schopnost translokovat část své molekuly přes membránu buněk prezentujících antigen. Spolu s částí rekombinantní molekuly toxinu tak může být dopraven do cytoplazmy i cizorodý polypeptid, například vhodný nádorový antigen, který je po zpracování uvnitř buňky vystaven ve formě peptidu na buněčném povrchu. Bylo zjištěno, že proti takto podanému antigenu vzniká CD4⁺ i CD8⁺ T-buněčná imunitní odpověď a dochází k regresi modelových nádorů. Byl vytvořen dokonce i konstrukt, ve kterém byly v různých pozicích toxinu vloženy různé epitopy. Do pozice 108 CyaA byl vložen CD4 epitop proteinu vázajícího maltózu MalE₁₀₀₋₁₁₄ z *E.coli* a do pozice 336 byl vložen CD8 epitop kuřecího ovalbuminu OVA₂₅₇₋₂₆₄. *In vitro* bylo zjištěno, že po vložení obou těchto epitopů do různých pozic v jedné molekule CyaA je tato CyaA molekula dopravena do obou drah MHC-I i MHC-II a to se stejnou účinností jako u jednoduchých konstruktů a dochází k indukci specifické CD4⁺ i CD8⁺ T-buněčné imunitní odpovědi (Schlecht et al., 2004).

Toxin CyaA je v laboratoři produkován expresním systémem v *E.coli* a pro účely tvorby vakcín bývá genetickou „detoxifikací“ zbaven své enzymatické adenylát cyklázové aktivity. Tento tzv. „toxoid“ CyaA již není pro buňky nebezpečný, avšak jeho transportní vlastnosti jsou zachovány. Rovněž inserce cizorodé sekvence do některých pozic CyaA vede ke ztrátě adenylát cyklázové aktivity. V publikaci 7 tomu tak bylo u konstruktu CyaA336/E7, který měl kompletní sekvenci antigenu E7 vloženou za glycin 335 v katalytické doméně CyaA. Imunizační schopnosti tohoto toxinu jsme porovnávali s CyaA1334/E7, u kterého byl E7 vložen za glycin 1333, tedy do hemolytické domény CyaA. Zjistili jsme, že po podání 2 dávek toxinu myším a následné čelení nádorovými TC-1 buňkami je účinný toxin CyaA336/E7, po kterém pouze 2/8 myší vytvořily nádor. Toxin CyaA1334/E7 byl stejně málo účinný jako divoký typ toxinu a nádor se vytvořil u 6/8 myší. Tento fakt podporuje i zjištění, že toxin CyaA1334/E7 není schopen pronikat do dendritických buněk a indukovat cytotoxickou odpověď proti antigenu E7, na rozdíl od CyaA336/E7. Dále jsme se rozhodli vyzkoušet terapeutické schéma imunizace. Zjistili jsme, že při podání 2 dávek vakcíny za 1 a 8 dní po injekci nádorových buněk TC-1, je vakcína CyaA336/E7 ještě účinnější, než v preventivním schématu imunizace. Možným

vysvětlením by mohla být aktivace dalších buněčných typů, které se mohou podílet na likvidaci nádorových buněk. K této aktivaci by mohlo docházet prostřednictvím vazby CyaA ke komplementovému receptoru typu 3 (CD11b/CD18), který se nachází také na NK buňkách nebo makrofázích. Opominout nelze ani možnou aktivaci makrofágů prostřednictvím LPS, který se ve zbytkovém množství nachází v preparacích CyaA používaných pro imunizace. Vyloučit nelze ani možné negativní ovlivnění buněčné odpovědi indukované druhou dávkou vakcíny prostřednictvím protilátek vzniklých po první imunizaci při preventivním podání.

Dále jsme se rozhodli zvýšit imunogenitu antigenu prostřednictvím podání kombinovaných vakcín. Toxin CyaA336/E7 jsme proto zkombinovali s virem vakcínie MVA-Sig/E7/LAMP, který je po samostatném podání v našem HPV modelu velmi málo účinný. Vylepšení specifické cytotoxické odpovědi *in vitro* i protinádorové odpovědi *in vivo* jsme zaznamenali po podání kombinované vakcíny v pořadí CyaA336/E7 (1. dávka) a MVA-Sig/E7/LAMP (2. dávka). Toto vylepšení vzhledem k účinku dvou dávek CyaA336/E7 se projevilo po podání vyšší dávky nádorových buněk, kdy po 2 dávkách CyaA336/E7 zůstaly 2/8 myši bez nádoru a po podání kombinace CyaA336/E7 + MVA-Sig/E7/LAMP zůstalo bez nádoru 100% myši. Tato práce, která je základem této disertační práce, je významná zejména tím, že v ní bylo poprvé popsáno použití CyaA jako vakcíny proti papilomavirům. Dále v ní bylo potvrzeno zvýšení imunogenity antigenu za použití přístupu, kdy je antigen podán prostřednictvím dvou různých typů vektorů. Tato práce tedy významně přispěla k získání poznatků důležitých pro budoucí praktické využití CyaA jako vektoru v protinádorové imunoterapii.

Vývoj protinádorových vakcín

Velkým problémem současných protinádorových vakcín používaných pro lidské pacienty je zejména jejich nízká účinnost. Zjištěné pozitivní účinky na zvířecím modelu se nemusejí projevit u lidského pacienta z mnoha důvodů. Imunitní systém pokusného zvířete je nedotčený faktory se kterými se člověk setkal v průběhu života a které mohly jeho imunitní systém různým způsobem ovlivnit. Terapeutická vakcína je zvířatům obvykle podávána v době, kdy je jejich imunitní systém schopen se s nádorovými buňkami vyrovnat, tedy v kratším časovém intervalu než v případě již rozvinutého nádorového onemocnění člověka. I v případě, kdy jsou již dosahovány jisté výsledky v klinických studiích je třeba mít na paměti, že lidská populace je

heterogenní v zastoupení alel MHC antigenů a tudíž vakcíny, které mohou být alespoň částečně účinné u lidí s určitým MHC profilem budou fungovat jinak u osob s odlišným typem MHC molekul. V tomto případě by bylo vhodné výzkum v budoucnu soustředit na optimalizaci antigenů vhodných pro jednotlivé MHC molekuly a vytvořit tak každému pacientovi vakcínu „na míru“. To samozřejmě předpokládá nejen používání levných metod pro analýzu MHC molekul pacienta v diagnostice, ale současně je třeba vyvinout řadu nových metod pro rychlou analýzu a vyhodnocení nejlepšího antigenu a nejvhodnějšího epitopu pro pacienta s daným MHC profilem. V současné době však tento přístup není možný a výzkum se tak soustředí spíše na podávání komplexních vakcín ve formě proteinů nebo buněk, které obsahují řady epitopů vhodných pro různé MHC alely.

Kromě vyvolání silné protinádorové imunity je dalším cílem imunoterapie zabránit rozvoji nádorové tolerance. Vlastní mechanismy protinádorové odpovědi jsou nesmírně komplexní a složitý proces a k úplnému rozluštění jeho fungování v lidském těle bude zapotřebí získat ještě velmi mnoho poznatků. Je třeba se zaměřit na odhalování regulačních mechanismů imunity, které nejsou dosud zcela objasněné, avšak pro správné fungování imunitního systému jsou nezbytné neboť každá výchylka z rovnováhy může vyvolat kaskádu reakcí, které mohou ústít v nesprávnou funkci imunity. Je třeba dopodrobna prozkoumat mechanismy obrany organismu před nádorovými buňkami a odhalit co tyto mechanismy ovlivňuje. Je velmi důležité poznat jakým způsobem unikají nádorové buňky imunitnímu dozoru a zda je možné tento imunitní dozor obnovit.

Je třeba říci, že i když dosavadní klinické výsledky dosažené při testování protinádorových vakcín zatím nebyly stoprocentně účinné a zázračná vakcína je prozatím v nedohlednu, naznačují výsledky preklinických studií na modelových zvířatech naději pro budoucí vývoj imunoterapie.

4. ZÁVĚR

1. Zkonstruovali jsme vakcíny proti antigenu E7 lidského papilomaviru 16 na bázi adenylát cyklázového toxinu CyaA z bakterie *Bordetella pertusis*.

Do různých pozic geneticky detoxifikované varianty toxoidu CyaA jsme vkládali kompletní sekvenci antigenu E7 viru HPV-16 nebo cytotoxický epitop E7₄₉₋₅₇.

2. Zavedli jsme metody pro testování buněčné imunitní odpovědi u myši.

Zjišťovali jsme množství buněk specifických pro antigen, které po restimulaci peptidem *in vitro* produkují IFN- γ (CTL, Th-1 odpověď) nebo IL-4 (Th-2 odpověď) metodou ELISPOT (Enzyme-Linked ImmunoSPOT assay). ELISPOT jsme prováděli z čerstvě izolovaných splenocytů stimulovaných peptidem 20 hodin nebo ze splenocytů kultivovaných a restimulovaných 6 dní *in vitro*.

Zjišťovali jsme množství CD8⁺ T-buněk specifických pro peptid E7₄₉₋₅₇ viru HPV-16 metodou fluorescenčního značení lymfocytů molekulou MHC-I tetrameru.

3. Testovali jsme buněčnou imunitní odpověď u myši po imunizaci různými typy vakcín proti antigenu E7 viru HPV-16.

Metodami ELISPOT a značení MHC-I tetramerem jsme testovali vakcíny založené na různých typech vektorů: virus vakcínie kmenů WR, P13 (publikace 1, 2) a MVA (publikace 2, 7), DNA (publikace 3, 4, 5, 6), buněčné vakcíny (publikace 4) a CyaA (publikace 7).

5. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Altman J. D., Moss P. A. H., Goulder P. J. R., Barouch D. H., McHeyzerWilliams M. G., Bell J. I., McMichael A. J. and Davis M. M. (1996) Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* **274**, 94-96.
- Ashrafi G. H., Haghshenas M., Marchetti B. and Campo M. S. (2006) E5 protein of human papillomavirus 16 downregulates HLA class I and interacts with the heavy chain via its first hydrophobic domain. *International Journal Of Cancer* **119**, 2105-2112.
- Bagley K. C., Abdelwahab S. F., Tuskan R. G., Fouts T. R. and Lewis G. K. (2002) Pertussis toxin and the adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* activate human monocyte-derived dendritic cells and dominantly inhibit cytokine production through a cAMP-dependent pathway. *Journal Of Leukocyte Biology* **72**, 962-969.
- Bakker A. H. and Schumacher T. N. M. (2005) MHC multimer technology: current status and future prospects. *Current Opinion In Immunology* **17**, 428-433.
- Baldwin P. J., van der Burg S. H., Boswell C. M., Offringa R., Hickling J. K., Dobson J., Roberts J. S. C., Latimer J. A., Moseley R. P., Coleman N., Stanley M. A. and Sterling J. C. (2003) Vaccinia-expressed human papillomavirus 16 and 18 E6 and E7 as a therapeutic vaccination for vulval and vaginal Intraepithelial neoplasia. *Clinical Cancer Research* **9**, 5205-5213.
- Barnard P., Payne E. and McMillan N. A. J. (2000) The human papillomavirus E7 protein is able to inhibit the antiviral and anti-growth functions of interferon-alpha. *Virology* **277**, 411-419.
- Basar T., Havlicek V., Bezouskova S., Hackett M. and Sebo P. (2001) Acylation of lysine 983 is sufficient for toxin activity of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase - Substitutions of alanine 140 modulate acylation site selectivity of the toxin acyltransferase CyaC. *Journal Of Biological Chemistry* **276**, 348-354.
- Benz R., Maier E., Ladant D., Ullmann A. and Sebo P. (1994) Adenylate-Cyclase Toxin (CyaA) Of *Bordetella-Pertussis* - Evidence For The Formation Of Small Ion-Permeable Channels And Comparison With HlyA Of *Escherichia-Coli*. *Journal Of Biological Chemistry* **269**, 27231-27239.
- Betts M. R., Brenchley J. M., Price D. A., De Rosa S. C., Douek D. C., Roederer M. and Koup R. A. (2003) Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *Journal Of Immunological Methods* **281**, 65-78.
- Bohmer R. M. (1979) Flow Cytometric Cell-Cycle Analysis Using The Quenching Of 33258 Hoechst Fluorescence By Bromodeoxyuridine Incorporation. *Cell And Tissue Kinetics* **12**, 101-110.
- Bouma G. J., Vandermeerprins P. M. W., Vanbree F., Vanrood J. J. and Claas F. H. J. (1992) Determination Of Cytotoxic Lymphocyte-T Precursor Frequencies Using Europium Labeling As A Nonradioactive Alternative To Labeling With Chromium-51. *Human Immunology* **35**, 85-92.
- Boyd A. P., Ross P. J., Conroy H., Mahon N., Lavelle E. C. and Mills K. H. G. (2005) *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin modulates innate and adaptive immune responses: Distinct roles for acylation and enzymatic activity in immunomodulation and cell death. *Journal Of Immunology* **175**, 730-738.

- Bravo I. G., Alonso, Angel., Auvinen, Eeva. (2004) Human papillomavirus type 16 E5 protein. *Papillomavirus Report* **15**, 1-6.
- Brun J. L., Bory, J.P., Leveque, J., Mathevet, P., Raulic, P., Baldauf, J.J., Scholl, S., Huynh, B., Douvier, S., Gay, C., Riethmuller, D., Dalstein, V., Clavel, Ch. (2006) Twelve-month follow-up data of the HPV16 CIN2/3 women having responded to transgene's therapeutic vaccine TG4001. In *23rd International Papillomavirus Conference & Clinical Workshop*, p. 66, Prague, Czech Republic.
- Brunner K. T., Mauel J., Cerottin.Jc and Chapuis B. (1968) Quantitative Assay Of Lytic Action Of Immune Lymphoid Cells On 51cr-Labelled Allogeneic Target Cells In Vitro - Inhibition By Isoantibody And By Drugs. *Immunology* **14**, 181-&.
- Carter J. J., Koutsky L. A., Hughes J. P., Lee S. K., Kuypers J., Kiviat N. and Galloway D. A. (2000) Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. *Journal Of Infectious Diseases* **181**, 1911-1919.
- Cassetti M. C., McElhiney S. P., Shahabi V., Pullen J. K., Le Poole I. C., Eiben G. L., Smith L. R. and Kast W. M. (2004) Antitumor efficacy of Venezuelan equine encephalitis virus replicon particles encoding mutated HPV16 E6 and E7 genes. *Vaccine* **22**, 520-527.
- Clay T. M., Hobeika A. C., Mosca P. J., Lyerly H. K. and Morse M. A. (2001) Assays for monitoring cellular immune responses to active immunotherapy of cancer. *Clinical Cancer Research* **7**, 1127-1135.
- Coleman N., Birley H. D. L., Renton A. M., Hanna N. F., Ryait B. K., Byrne M., Taylorrobinson D. and Stanley M. A. (1994) Immunological Events In Regressing Genital Warts. *American Journal Of Clinical Pathology* **102**, 768-774.
- Confer D. L. and Eaton J. W. (1982) Phagocyte Impotence Caused By An Invasive Bacterial Adenylate-Cyclase. *Science* **217**, 948-950.
- Corey M. J., Kinders R. J., Brown L. G. and Vessella R. L. (1997) A very sensitive coupled luminescent assay for cytotoxicity and complement-mediated lysis. *Journal Of Immunological Methods* **207**, 43-51.
- Da Silva D. M., Pastrana D. V., Schiller J. T. and Kast W. M. (2001) Effect of preexisting neutralizing antibodies on the anti-tumor immune response induced by chimeric human papillomavirus virus-like particle vaccines. *Virology* **290**, 350-360.
- Dadaglio G., Morel S., Bauche C., Moukrim Z., Lemonnier F. A., Van den Eynde B. J., Ladant D. and Leclerc C. (2003) Recombinant adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* induces cytotoxic T lymphocyte responses against HLA*0201-restricted melanoma epitopes. *International Immunology* **15**, 1423-1430.
- Daftarian P., Mansour M., Benoit A. C., Pohajdak B., Hoskin D. W., Brown R. G. and Kast W. M. (2006) Eradication of established HPV 16-expressing tumors by a single administration of a vaccine composed of a liposome-encapsulated CTL-T helper fusion peptide in a water-in-oil emulsion. *Vaccine* **24**, 5235-5244.
- Daftarian P. M., Mansour, M., Pohajdak, B., Korets-Smith, E., Fuentes-Ortega, A., Brown, R.G., Kast, W.M. (2006) Eradication of large HPV-16-expressing established tumors (ca 1000 mm³) by a single administration of a vaccine composed of liposome-encapsulated CTL-T helper peptides in a water-in-oil

- emulsion. In *23rd International Papillomavirus Conference & Clinical Workshop*, p. 7, Prague, Czech Republic.
- de Jong A., van Poelgeest M. I. E., van der Hulst J. M., Drijfhout J. W., Fleuren G. J., Melief C. J. M., Kenter G., Offringa R. and van der Burg S. H. (2004) Human papillomavirus type 16-positive cervical cancer is associated with impaired CD4+T-cell immunity against early antigens E2 and E6. *Cancer Research* **64**, 5449-5455.
- Decker T. and Lohmannmatthes M. L. (1988) A Quick And Simple Method For The Quantitation Of Lactate-Dehydrogenase Release In Measurements Of Cellular Cyto-Toxicity And Tumor Necrosis Factor (Tnf) Activity. *Journal Of Immunological Methods* **115**, 61-69.
- Douek D. C., Betts M. R., Brenchley J. M., Hill B. J., Ambrozak D. R., Ngai K. L., Karandikar N. J., Casazza J. P. and Koup R. A. (2002) A novel approach to the analysis of specificity, clonality, and frequency of HIV-specific T cell responses reveals a potential mechanism for control of viral escape. *Journal Of Immunology* **168**, 3099-3104.
- El-Azami-El-Idrissi M., Bauche C., Loucka J., Osicka R., Sebo P., Ladant D. and Leclerc C. (2003) Interaction of Bordetella pertussis adenylate cyclase with CD11b/CD18 - Role of toxin acylation and identification of the main integrin interaction domain. *Journal Of Biological Chemistry* **278**, 38514-38521.
- Fayolle C., Ladant D., Karimova G., Ullmann A. and Leclerc C. (1999) Therapy of murine tumors with recombinant Bordetella pertussis adenylate cyclase carrying a cytotoxic T cell epitope. *Journal Of Immunology* **162**, 4157-4162.
- Fayolle C., Osickova A., Osicka R., Henry T., Rojas M. J., Saron M. F., Sebo P. and Leclerc C. (2001) Delivery of multiple epitopes by recombinant detoxified adenylate cyclase of Bordetella pertussis induces protective antiviral immunity. *Journal Of Virology* **75**, 7330-7338.
- Fayolle C., Sebo P., Ladant D., Ullmann A. and Leclerc C. (1996) In vivo induction of CTL responses by recombinant adenylate cyclase of Bordetella pertussis carrying viral CD8(+)T cell epitopes. *Journal Of Immunology* **156**, 4697-4706.
- Feltkamp M. C. W., Smits H. L., Vierboom M. P. M., Minnaar R. P., Dejongh B. M., Drijfhout J. W., Terschegget J., Melief C. J. M. and Kast W. M. (1993) Vaccination With Cytotoxic T-Lymphocyte Epitope-Containing Peptide Protects Against A Tumor-Induced By Human Papillomavirus Type-16-Transformed Cells. *European Journal Of Immunology* **23**, 2242-2249.
- Ferrara A., Nonn M., Sehr P., Schreckenberger C., Pawlita M., Durst M., Schneider A. and Kaufmann A. M. (2003) Dendritic cell-based tumor vaccine for cervical cancer II: results of a clinical pilot study in 15 individual patients. *Journal Of Cancer Research And Clinical Oncology* **129**, 521-530.
- Fiander A. N., Tristram A. J., Davidson E. J., Tomlinson A. E., Man S., Baldwin P. J., Sterling J. C. and Kitchener H. C. (2006) Prime-boost vaccination strategy in women with high-grade, noncervical anogenital intraepithelial neoplasia: clinical results from a multicenter phase II trial. *International Journal Of Gynecological Cancer* **16**, 1075-1081.
- Franconi R., Massa S., Illiano E., Muller A., Cirillp A., Accard L., Di Bonito P., Giorg C. and Venuti A. (2006) Exploiting the plant secretory pathway to improve the anticancer activity of a plant-derived HPV16 E7 vaccine. *International Journal Of Immunopathology And Pharmacology* **19**, 187-197.
- Frazer I. H., Quinn M., Nicklin J. L., Tan J., Perrin L. C., Ng P., O'Connor V. M., White O., Wendt N., Martin J., Crowley J. M., Edwards S. J., McKenzie A.

- W., Mitchell S. V., Maher D. W., Pearse M. J. and Basser R. L. (2004) Phase 1 study of HPV16-specific immunotherapy with E6E7 fusion protein and ISCOMATRIX (TM) adjuvant in women with cervical intraepithelial neoplasia. *Vaccine* **23**, 172-181.
- Garcia-Hernandez E., Gonzalez-Sanchez J. L., Andrade-Manzano A., Contreras M. L., Padilla S., Guzman C. C., Jimenez R., Reyes L., Morosoli G., Kerde M. L. and Rosales R. (2006) Regression of papilloma high-grade lesions (CIN 2 and CIN 3) is stimulated by therapeutic vaccination with MVA E2 recombinant vaccine. *Cancer Gene Therapy* **13**, 592-597.
- Garcia F., Petry K. U., Muderspach L., Gold M. A., Braly P., Crum C. P., Magill M., Silverman M., Urban R. G., Hedley M. L. and Beach K. J. (2004) ZYC101a for treatment of high-grade cervical intraepithelial neoplasia: A randomized controlled trial. *Obstetrics And Gynecology* **103**, 317-326.
- Gentile F., Knipling L. G., Sackett D. L. and Wolff J. (1990) Invasive Adenylyl Cyclase Of Bordetella-Pertussis - Physical, Catalytic, And Toxic Properties. *Journal Of Biological Chemistry* **265**, 10686-10692.
- Georgopoulos N. T., Proffitt J. L. and Blair G. E. (2000) Transcriptional regulation of the major histocompatibility complex (MHC) class I heavy chain, TAP1 and LMP2 genes by the human papillomavirus (HPV) type 6b, 16 and 18 E7 oncoproteins. *Oncogene* **19**, 4930-4935.
- Glaser P., Sakamoto H., Bellalou J., Ullmann A. and Danchin A. (1988) Secretion Of Cyclolysin, The Calmodulin-Sensitive Adenylate-Cyclase Hemolysin Bifunctional Protein Of Bordetella-Pertussis. *Embo Journal* **7**, 3997-4004.
- Gmira S., Karimova G. and Ladant D. (2001) Characterization of recombinant Bordetella pertussis adenylate cyclase toxins carrying passenger proteins. *Research In Microbiology* **152**, 889-900.
- Goepfert P. A., Bansal A., Edwards B. H., Ritter G. D., Tellez I., McPherson S. A., Sabbaj S. and Mulligan M. J. (2000) A significant number of human immunodeficiency virus epitope-specific cytotoxic T lymphocytes detected by tetramer binding do not produce gamma interferon. *Journal Of Virology* **74**, 10249-10255.
- Gratzner H. G. (1982) Monoclonal-Antibody To 5-Bromodeoxyuridine And 5-Iododeoxyuridine - A New Reagent For Detection Of Dna-Replication. *Science* **218**, 474-475.
- Gray M., Szabo G., Otero A. S., Gray L. and Hewlett E. (1998) Distinct mechanisms for K⁺ efflux, intoxication, and hemolysis by Bordetella pertussis AC toxin. *Journal Of Biological Chemistry* **273**, 18260-18267.
- Greenstone H. L., Nieland J. D., de Visser K. E., De Bruijn M. L. H., Kirnbauer R., Roden R. B. S., Lowy D. R., Kast W. M. and Schiller J. T. (1998) Chimeric papillomavirus virus-like particles elicit antitumor immunity against the E7 oncoprotein in an HPV16 tumor model. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **95**, 1800-1805.
- Guermontprez P., Fayolle C., Karimova G., Ullmann A., Leclerc C. and Ladant D. (2000) Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin: A vehicle to deliver CD8-positive T-cell epitopes into antigen-presenting cells. In *Applications Of Chimeric Genes And Hybrid Proteins, Pt A*, Vol. 326, p. 527-542.
- Guermontprez P., Fayolle C., Rojas M. J., Rescigno M., Ladant D. and Leclerc C. (2002) In vivo receptor-mediated delivery of a recombinant invasive bacterial toxoid to CD11c(+)CD8 alpha(-)CD11b(high) dendritic cells. *European Journal Of Immunology* **32**, 3071-3081.

- Guermouprez P., Khelef N., Blouin E., Rieu P., Ricciardi-Castagnoli P., Guiso N., Ladant D. and Leclerc C. (2001) The adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* binds to target cells via the alpha(M)beta(2) integrin (CD11b/CD18). *Journal Of Experimental Medicine* **193**, 1035-1044.
- Guermouprez P., Ladant D., Karimova G., Ullmann A. and Leclerc C. (1999) Direct delivery of the *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin to the MHC class I antigen presentation pathway. *Journal Of Immunology* **162**, 1910-1916.
- Hackett M., Guo L., Shabanowitz J., Hunt D. F. and Hewlett E. L. (1994) Internal Lysine Palmitoylation In Adenylate-Cyclase Toxin From *Bordetella-Pertussis*. *Science* **266**, 433-435.
- Hackett M., Walker C. B., Guo L., Gray M. C., Vancuyk S., Ullmann A., Shabanowitz J., Hunt D. F., Hewlett E. L. and Sebo P. (1995) Hemolytic, But Not Cell-Invasive Activity, Of Adenylate-Cyclase Toxin Is Selectively Affected By Differential Fatty-Acylation In *Escherichia-Coli*. *Journal Of Biological Chemistry* **270**, 20250-20253.
- Hasan U. A., Bouvard, V., Accardi, R., Mansour, M., Takeshita, F., Stubenrauch, F., Iftner, T., Sideri, M., Gissmann, L., Tommasino, M. (2006) HPV high-risk types suppress the transcriptional activity of TLR9 in human primary epithelial cells: a new mechanism for viruses to escape innate immune recognition? In *23rd International Papillomavirus Conference & Clinical Workshop*, p. 48, Prague, Czech Republic.
- Hawes S. E., Critchlow C. W., Sow P. S., Toure P., N'Doye I., Diop A., Kuypers J. M., Kasse A. A. and Kiviat N. B. (2006) Incident high-grade squamous intraepithelial lesions in Senegalese women with and without human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and HIV-2. *Journal Of The National Cancer Institute* **98**, 100-109.
- He Z., Wlazlo A. P., Kowalczyk D. W., Cheng J., Xiang Z. Q., Giles-Davis W. and Ertl H. C. J. (2000) Viral recombinant vaccines to the E6 and E7 antigens of HPV-16. *Virology* **270**, 146-161.
- Heckelsmiller K., Rall K., Beck S., Schlamp A., Seiderer J., Jahrsdorfer B., Krug A., Rothenfusser S., Endres S. and Hartmann G. (2002) Peritumoral CpG DNA elicits a coordinated response of CD8 T cells and innate effectors to cure established tumors in a murine colon carcinoma model. *Journal Of Immunology* **169**, 3892-3899.
- Hewlett E. and Wolff J. (1976) Soluble Adenylate-Cyclase From Culture Medium Of *Bordetella-Pertussis* - Purification And Characterization. *Journal Of Bacteriology* **127**, 890-898.
- Hewlett E. L., Gray L., Allietta M., Ehrmann I., Gordon V. M. and Gray M. C. (1991) Adenylate-Cyclase Toxin From *Bordetella-Pertussis* - Conformational Change Associated With Toxin Activity. *Journal Of Biological Chemistry* **266**, 17503-17508.
- Hitzeroth I. I., Stewart, D., Shephard, E., Passmore, J.A.S., Pereira, R., Kast, W.M., Mueller, M., Williamson, A.L., Rybicki, E.P. (2006) HPV 16 L1 but not L2 DNA vaccine induces humoral and cellular systemic immunity and protects mice against HPV-specific tumour challenge. In *23rd International Papillomavirus Conference & Clinical Workshop*, p. 206, Prague, Czech Republic.
- Hormozi K., Parton R. and Coote J. (1999) Adjuvant and protective properties of native and recombinant *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin

- preparations in mice. *Fems Immunology And Medical Microbiology* **23**, 273-282.
- Hsieh C. J., Kim T. W., Hung C. F., Juang J., Moniz M., Boyd D. A. K., He L. M., Chen P. J., Chen C. H. and Wu T. C. (2004) Enhancement of vaccinia vaccine potency by linkage of tumor antigen gene to gene encoding calreticulin. *Vaccine* **22**, 3993-4001.
- Hung C. F., Cheng W. F., He L. M., Ling M., Juang J., Lin C. T. and Wu T. C. (2003) Enhancing major histocompatibility complex class I antigen presentation by targeting antigen to centrosomes. *Cancer Research* **63**, 2393-2398.
- Chang E. Y., Chen C. H., Ji H. X., Wang T. L., Hung K., Lee B. P., Huang A. Y. C., Kurman R. J., Pardoll D. M. and Wu T. C. (2000) Antigen-specific cancer immunotherapy using a GM-CSF secreting allogeneic tumor cell-based vaccine. *International Journal Of Cancer* **86**, 725-730.
- Chen C. H., Wang T. L., Hung C. F., Pardoll D. M. and Wu T. C. (2000a) Boosting with recombinant vaccinia increases HPV-16 E7-specific T cell precursor frequencies of HPV-16 E7-expressing DNA vaccines. *Vaccine* **18**, 2015-2022.
- Chen C. H., Wang T. L., Hung C. F., Yang Y. Q., Young R. A., Pardoll D. M. and Wu T. C. (2000b) Enhancement of DNA vaccine potency by linkage of antigen gene to an HSP70 gene. *Cancer Research* **60**, 1035-1042.
- Cheng W. F., Hung C. F., Hsu K. F., Chai C. Y., He L. M., Polo J. M., Slater L. A., Ling M. and Wu T. C. (2002) Cancer immunotherapy using Sindbis virus replicon particles encoding a VP22-antigen fusion. *Human Gene Therapy* **13**, 553-568.
- Cheng W. F., Hung C. F., Chen C. A., Lee C. N., Su Y. N., Chai C. Y., Boyd D. A. K., Hsieh C. Y. and Wu T. C. (2005) Characterization of DNA vaccines encoding the domains of calreticulin for their ability to elicit tumor-specific immunity and antiangiogenesis. *Vaccine* **23**, 3864-3874.
- Indrova M., Bubenik J., Mikyskova R., Vonka V., Smahel M., Zak R., Simova J., Bieblova J., Mendoza L. and Jandlova T. (2002) Tumour-inhibitory and antimetastatic effects of IL-2 in mice carrying MHC class I- tumours of HPV16 origin. *International Journal Of Oncology* **20**, 643-646.
- Ji H. X., Wang T. L., Chen C. H., Pai S. I., Hung C. F., Lin K. Y., Kurman R. J., Pardoll D. M. and Wu T. C. (1999) Targeting human papillomavirus type 16 E7 to the endosomal/lysosomal compartment enhances the antitumor immunity of DNA vaccines against murine human papillomavirus type 16 E7-expressing tumors. *Human Gene Therapy* **10**, 2727-2740.
- Jochmus-Kudielka I., Schneider A., Braun R., Kimmig R., Koldovsky U., Schneeweis K. E., Seedorf K. and Gissmann L. (1989) Antibodies Against The Human Papillomavirus Type-16 Early Proteins In Human-Sera - Correlation Of Anti-E7 Reactivity With Cervical-Cancer. *Journal Of The National Cancer Institute* **81**, 1698-1704.
- Karimova G., Fayolle C., Gmira S., Ullmann A., Leclerc C. and Ladant D. (1998) Charge-dependent translocation of Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin into eukaryotic cells: Implication for the in vivo delivery of CD8(+) T cell epitopes into antigen-presenting cells. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **95**, 12532-12537.
- Kaufmann A. M., Stern P. L., Rankin E. M., Sommer H., Nuessler V., Schneider A., Adams M., Onon T. S., Bauknecht T., Wagner U., Kroon K., Hickling J., Boswell C. M., Stacey S. N., Kitchener H. C., Gillard J., Wanders J., Roberts J. S. C. and Zwierzina H. (2002) Safety and immunogenicity of TA-HPV, a

- recombinant vaccinia virus expressing modified human papillomavirus (HPV)-16 and HPV-18 E6 and E7 genes, in women with progressive cervical cancer. *Clinical Cancer Research* **8**, 3676-3685.
- Kenter G. G., Welters, M., Lowik, M., Vloon, A., Drijhout, J.W., Valentijn, R., Wafelman, A., Offringa, R., Van De Burg, S., Melief, K. (2006) Preliminary results of HPV16 long peptide vaccination in patients with HPV induced genital lesion: safety, immunogenicity and clinical effect. In *23rd International Papillomavirus Conference & Clinical Workshop*, p. 7, Prague, Czech Republic.
- Khelef N. and Guiso N. (1995) Induction Of Macrophage Apoptosis By Bordetella-Pertussis Adenylate Cyclase-Hemolysin. *Fems Microbiology Letters* **134**, 27-32.
- Kim T. W., Hung C. F., Ling M., Juang J., He L. M., Hardwick J. M., Kumar S. and Wu T. C. (2003) Enhancing DNA vaccine potency by coadministration of DNA encoding antiapoptotic proteins. *Journal Of Clinical Investigation* **112**, 109-117.
- Kim T. W., Lee J. H., He L. M., Boyd D. A. K., Hardwick J. M., Hung C. F. and Wu T. C. (2005) Modification of professional antigen-presenting cells with small interfering RNA in vivo to enhance cancer vaccine potency. *Cancer Research* **65**, 309-316.
- Koopman L. A., Corver W. E., van der Slik A. R., Giphart M. J. and Fleuren G. J. (2000) Multiple genetic alterations cause frequent and heterogeneous human histocompatibility leukocyte antigen class I loss in cervical cancer. *Journal Of Experimental Medicine* **191**, 961-975.
- Ladant D., Glaser P. and Ullmann A. (1992) Insertional Mutagenesis Of Bordetella-Pertussis Adenylate-Cyclase. *Journal Of Biological Chemistry* **267**, 2244-2250.
- Lecoeur H., Fevrier M., Garcia S., Riviere Y. and Gougeon M. L. (2001) A novel flow cytometric assay for quantitation and multiparametric characterization of cell-mediated cytotoxicity. *Journal Of Immunological Methods* **253**, 177-187.
- Lin C. T., Hung C. F., Juang J., He L. M., Lin K. Y., Kim T. W. and Wu T. C. (2003) Boosting with recombinant vaccinia increases HPV-16 E7-specific T cell precursor frequencies and antitumor effects of HPV-16 E7-expressing Sindbis virus replicon particles. *Molecular Therapy* **8**, 559-566.
- Lin C. T., Tsai Y. C., He L. M., Calizo R., Chou H. H., Chang T. C., Soong Y. K., Hung C. F. and Lai C. H. (2006) A DNA vaccine encoding a codon-optimized human papillomavirus type 16 E6 gene enhances CTL response and anti-tumor activity. *Journal Of Biomedical Science* **13**, 481-488.
- Lin K. Y., Guarnieri F. G., StaveleyOcarroll K. F., Levitsky H. I., August J. T., Pardoll D. M. and Wu T. C. (1996) Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Cancer Research* **56**, 21-26.
- Liu D. W., Tsao Y. P., Kung J. T., Ding Y. A., Sytwu H. K., Xiao X. and Chen S. L. (2000) Recombinant adeno-associated virus expressing human papillomavirus type 16 E7 peptide DNA fused with heat shock protein DNA as a potential vaccine for cervical cancer. *Journal Of Virology* **74**, 2888-2894.
- Liu L. Z., Chahroudi A., Silvestri G., Wernett M. E., Kaiser W. J., Safrit J. T., Komoriya A., Altman J. D., Packard B. Z. and Feinberg M. B. (2002) Visualization and quantification of T cell-mediated cytotoxicity using cell-permeable fluorogenic caspase substrates. *Nature Medicine* **8**, 185-189.

- Longworth M. S. and Laimins L. A. (2004) Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiology And Molecular Biology Reviews* **68**, 362-+.
- Lorenz M. G. O., Cortes L. M., Lorenz J. J. and Liu E. T. (2003) Strategy for the design of custom cDNA microarrays. *Biotechniques* **34**, 1264-+.
- Loucka J., Schlecht G., Vodolanova J., Leclerc C. and Sebo P. (2002) Delivery of a MalE CD4(+)-T-cell epitope into the major histocompatibility complex class II antigen presentation pathway by Bordetella pertussis adenylate cyclase. *Infection And Immunity* **70**, 1002-1005.
- Lyons A. B. (2000) Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *Journal Of Immunological Methods* **243**, 147-154.
- Lyons A. B. and Parish C. R. (1994) Determination Of Lymphocyte Division By Flow-Cytometry. *Journal Of Immunological Methods* **171**, 131-137.
- MacDonald-Fyall J., Xing D., Corbel M., Baillie S., Parton R. and Coote J. (2004) Adjuvanticity of native and detoxified adenylate cyclase toxin of Bordetella pertussis towards co-administered antigens. *Vaccine* **22**, 4270-4281.
- Mackova J., Stasikova J., Kutinova L., Masin J., Hainz P., Simsova M., Gabriel P., Sebo P. and Nemeckova S. (2006) Prime/boost immunotherapy of HPV16-induced tumors with E7 protein delivered by Bordetella adenylate cyclase and modified vaccinia virus Ankara. *Cancer Immunology Immunotherapy* **55**, 39-46.
- Mannhardt B., Weinzimer S. A., Wagner M., Fiedler M., Cohen P., Jansen-Durr P. and Zwerschke W. (2000) Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein binds and inactivates growth-inhibitory insulin-like growth factor binding protein 3. *Molecular And Cellular Biology* **20**, 6483-6495.
- Mascarell L., Fayolle C., Bauche C., Ladant D. and Leclerc C. (2005) Induction of neutralizing antibodies and Th1-polarized and CD4-independent CD8(+) T-Cell responses following delivery of human immunodeficiency virus type 1 Tat protein by recombinant adenylate cyclase of Bordetella pertussis. *Journal Of Virology* **79**, 9872-9884.
- Masin J., Konopasek I., Svobodova J. and Sebo P. (2004) Different structural requirements for adenylate cyclase toxin interactions with erythrocyte and liposome membranes. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1660**, 144-154.
- Mikyšková I., Dvořák, V., Michal, M. (2003) Lidské papilomaviry jako příčina vzniku gynekologických onemocnění. *Praktická gynekologie* **4**, 33-36.
- Mock M., Ullmann, A. (1993) Calmodulin-activated bacterial adenylate cyclases as virulence factors. *Trends in microbiology* **1**, 187-192.
- Morice W. G., Kimlinger T., Katzmann J. A., Lust J. A., Heimgartner P. J., Halling K. C. and Hanson C. A. (2004) Flow cytometric assessment of TCR-V-beta expression in the evaluation of peripheral blood involvement by T-cell lymphoproliferative disorders - A comparison with conventional T-cell immunophenotyping and molecular genetic techniques. *American Journal Of Clinical Pathology* **121**, 373-383.
- Moser M. and Murphy K. M. (2000) Dendritic cell regulation of T(H)1-T(H)2 development. *Nature Immunology* **1**, 199-205.
- Munoz N., Bosch F. X., Castellsague X., Diaz M., De Sanjose S., Hammouda D., Shah K. V. and Meijer C. (2004) Against which human papillomavirus types

- shall we vaccinate and screen? The international perspective. *International Journal Of Cancer* **111**, 278-285.
- Nikula T., West A., Katajamaa M., Lonnberg T., Sara R., Aittokallio T., Nevalainen O. S. and Lahesmaa R. (2005) A human ImmunoChip cDNA microarray provides a comprehensive tool to study immune responses. *Journal Of Immunological Methods* **303**, 122-134.
- Ogbomo H., Hahn A., Geiler J., Michaelis M., Doerr H. W. and Cinatl J. (2006) NK sensitivity of neuroblastoma cells determined by a highly sensitive coupled luminescent method. *Biochemical And Biophysical Research Communications* **339**, 375-379.
- Oh S. T., Kyo S. and Laimins L. A. (2001) Telomerase activation by human papillomavirus type 16 E6 protein: Induction of human telomerase reverse transcriptase expression through Myc and GC-rich Sp1 binding sites. *Journal Of Virology* **75**, 5559-5566.
- Ohlschlager P., Osen W., Dell K., Faath S., Garcea R. L., Jochmus I., Muller M., Pawlita M., Schafer K., Sehr P., Staib C., Sutter G. and Gissmann L. (2003) Human papillomavirus type 16 L1 capsomeres induce L1-specific cytotoxic T lymphocytes and tumor regression in C57BL/6 mice. *Journal Of Virology* **77**, 4635-4645.
- Opalka D., Lachman C. E., MacMullen S. A., Jansen K. U., Smith J. F., Chirmule N. and Esser M. T. (2003) Simultaneous quantitation of antibodies to neutralizing epitopes on virus-like particles for human papillomavirus types 6, 11, 16, and 18 by a multiplexed luminex assay 2. *Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology* **10**, 108-115.
- Osicka R., Osickova A., Basar T., Guernonprez P., Rojas M., Leclerc C. and Sebo P. (2000) Delivery of CD8(+) T-cell epitopes into major histocompatibility complex class I antigen presentation pathway by Bordetella pertussis adenylate cyclase: Delineation of cell invasive structures and permissive insertion sites. *Infection And Immunity* **68**, 247-256.
- Osickova A., Osicka R., Maier E., Benz R. and Sebo P. (1999) An amphipathic alpha-helix including glutamates 509 and 516 is crucial for membrane translocation of adenylate cyclase toxin and modulates formation and cation selectivity of its membrane channels. *Journal Of Biological Chemistry* **274**, 37644-37650.
- Otahal P., Hutchinson S. C., Mylin L. M., Tevethia M. J., Tevethia S. S. and Schell T. D. (2005) Inefficient cross-presentation limits the CD8(+) T cell response to a subdominant tumor antigen epitope. *Journal Of Immunology* **175**, 700-712.
- Otero A. S., Yi X. B., Gray M. C., Szabo G. and Hewlett E. L. (1995) Membrane Depolarization Prevents Cell Invasion By Bordetella-Pertussis Adenylate-Cyclase Toxin. *Journal Of Biological Chemistry* **270**, 9695-9697.
- Pannetier C., Even J. and Kourilsky P. (1995) T-Cell Repertoire Diversity And Clonal Expansions In Normal And Clinical-Samples. *Immunology Today* **16**, 176-181.
- Park D. S., Selvey L. A., Kelsall S. R. and Frazer I. H. (1993) Human Papillomavirus Type-16 E6, E7 And L1 And Type-18 E7 Proteins Produced By Recombinant Baculoviruses. *Journal Of Virological Methods* **45**, 303-318.
- Park J. S., Kim E. J., Kwon H. J., Hwang E. S., Namkoong S. E. and Um S. J. (2000) Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by HPV E7 oncoprotein - Implication for the E7-mediated immune evasion mechanism in cervical carcinogenesis. *Journal Of Biological Chemistry* **275**, 6764-6769.

- Parkin D. M., Bray F., Ferlay J. and Pisani P. (2005) Global cancer statistics, 2002. *Ca-A Cancer Journal For Clinicians* **55**, 74-108.
- Pastrana D. V., Buck C. B., Pang Y. Y. S., Thompson C. D., Castle P. E., FitzGerald P. C., Kjaer S. K., Lowy D. R. and Schiller J. T. (2004) Reactivity of human sera in a sensitive, high-throughput pseudovirus-based papillomavirus neutralization assay for HPV16 and HPV18. *Virology* **321**, 205-216.
- Pastrana D. V., Gambhira R., Buck C. B., Pang Y. Y. S., Thompson C. D., Culp T. D., Christensen N. D., Lowy D. R., Schiller J. T. and Roden R. B. S. (2005) Cross-neutralization of cutaneous and mucosal Papillomavirus types with antisera to the amino terminus of L2. *Virology* **337**, 365-372.
- Perfetto S. P., Chattopadhyay P. K. and Roederer M. (2004) Innovation - Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. *Nature Reviews Immunology* **4**, 648-U5.
- Pokorna D., Mackova J., Duskova M., Rittich S., Ludvikova V. and Smahel M. (2005) Combined immunization with fusion genes of mutated E-7 gene of human papillomavirus type 16 did not enhance antitumor effect. *Journal Of Gene Medicine* **7**, 696-707.
- Preville X., Ladant D., Timmerman B. and Leclerc C. (2005) Eradication of established tumors by vaccination with recombinant Bordetella pertussis adenylate cyclase carrying the human papillomavirus 16 E7 oncoprotein. *Cancer Research* **65**, 641-649.
- Relman D., Tuomanen E., Falkow S., Golenbock D. T., Saukkonen K. and Wright S. D. (1990) Recognition Of A Bacterial Adhesin By An Integrin - Macrophage Cr3 (Alpha-M-Beta-2, Cd11b Cd18) Binds Filamentous Hemagglutinin Of Bordetella-Pertussis. *Cell* **61**, 1375-1382.
- Riezebos-Brilman A., Regts J., Freyschmidt E. J., Dontje B., Wilschut J. and Daemen T. (2005) Induction of human papilloma virus E6/E7-specific cytotoxic T-lymphocyte activity in immune-tolerant, E6/E7-transgenic mic. *Gene Therapy* **12**, 1410-1414.
- Rogel A. and Hanski E. (1992) Distinct Steps In The Penetration Of Adenylate-Cyclase Toxin Of Bordetella-Pertussis Into Sheep Erythrocytes - Translocation Of The Toxin Across The Membrane. *Journal Of Biological Chemistry* **267**, 22599-22605.
- Ronco L. V., Karpova A. Y., Vidal M. and Howley P. M. (1998) Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes & Development* **12**, 2061-2072.
- Rose T., Sebo P., Bellalou J. and Ladant D. (1995) Interaction Of Calcium With Bordetella-Pertussis Adenylate-Cyclase Toxin. *Journal Of Biological Chemistry* **270**, 26370-26376.
- Ross P. J., Lavelle E. C., Mills K. H. G. and Boyd A. P. (2004) Adenylate cyclase toxin from Bordetella pertussis synergizes with lipopolysaccharide to promote innate interleukin-10 production and enhances the induction of Th2 and regulatory T cells. *Infection And Immunity* **72**, 1568-1579.
- Sahin U., Tureci O., Schmitt H., Cochlovius B., Johannes T., Schmits R., Stenner F., Luo G. R., Schobert I. and Pfreundschuh M. (1995) Human Neoplasms Elicit Multiple Specific Immune-Responses In The Autologous Host. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **92**, 11810-11813.
- Saron M. F., Fayolle C., Sebo P., Ladant D., Ullmann A. and Leclerc C. (1997) Anti-viral protection conferred by recombinant adenylate cyclase toxins from

- Bordetella pertussis carrying a CD8(+) T cell epitope from lymphocytic choriomeningitis virus. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **94**, 3314-3319.
- Shafer-Weaver K., Sayers, T., Strobl, S., Derby, E., Ulderich, T., Baseler, M., Malyguine, A. (2003) The Granzyme B ELISPOT assay: an alternative to the ⁵¹Cr-release assay for monitoring cell-mediated cytotoxicity. *Journal of Translational Medicine* **1**, 14.
- Sheehy M. E., McDermott A. B., Furlan S. N., Klenerman P. and Nixon D. F. (2001) A novel technique for the fluorometric assessment of T lymphocyte antigen specific lysis. *Journal Of Immunological Methods* **249**, 99-110.
- Scheffold A., Assenmacher M., Reiners-Schramm L., Lauster R. and Radbruch A. (2000) High-sensitivity immunofluorescence for detection of the pro- and anti-inflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-10 on the surface of cytokine-secreting cells. *Nature Medicine* **6**, 107-110.
- Schlecht G., Loucka J., Najar H., Sebo P. and Leclerc C. (2004) Antigen targeting to CD11b allows efficient presentation of CD4(+) and CD8(+) T cell epitopes and in vivo Th1-polarized T cell priming. *Journal Of Immunology* **173**, 6089-6097.
- Simsova M., Sebo P. and Leclerc C. (2004) The adenylate cyclase toxin from Bordetella pertussis - a novel promising vehicle for antigen delivery to dendritic cells. *International Journal Of Medical Microbiology* **293**, 571-576.
- Smahel M., Pokorna D., Mackova J. and Vlasak J. (2004) Enhancement of immunogenicity of HPV16 E7 oncogene by fusion with E-coli beta-glucuronidase. *Journal Of Gene Medicine* **6**, 1092-1101.
- Smahel M., Sima P., Ludvikova V. and Vonka V. (2001a) Modified HPV16 E7 genes as DNA vaccine against E7-containing oncogenic cells. *Virology* **281**, 231-238.
- Smahel M., Sobotkova E., Bubenik J., Simova J., Zak R., Ludvikova V., Hajkova R., Kovarik J., Jelinek F., Povysil C., Marinov J. and Vonka V. (2001b) Metastatic MHC class I-negative mouse cells derived by transformation with human papillomavirus type 16. *British Journal Of Cancer* **84**, 374-380.
- Smith A. M., Guzman C. A. and Walker M. J. (2001) The virulence factors of Bordetella pertussis: a matter of control. *Fems Microbiology Reviews* **25**, 309-333.
- Tartz S., Kamanova J., Simsova M., Sebo P., Bolte S., Heussler V., Fleischer B. and Jacobs T. (2006) Immunization with a circumsporozoite epitope fused to Bordetella pertussis adenylate cyclase in conjunction with cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 blockade confers protection against Plasmodium berghei liver-stage malaria. *Infection And Immunity* **74**, 2277-2285.
- Thiel A., Radbruch, A. (1999) Antigen-specific cytometry. *Arthritis Research* **1**, 25-29.
- Thor Straten P., Schrama, D., Andersen, M.H., Becker, J.C. (2004) T-cell clonotypes in cancer. *Journal of Translational Medicine* **2**, 11.
- Tindle R. W., Fernando G. J. P., Sterling J. C. and Frazer I. H. (1991) A Public T-Helper Epitope Of The E7 Transforming Protein Of Human Papillomavirus-16 Provides Cognate Help For Several E7 B-Cell Epitopes From Cervical Cancer-Associated Human Papillomavirus Genotypes. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **88**, 5887-5891.

- Tomaru U., Yamano Y., Nagai M., Maric D., Kaumaya P. T. P., Biddison W. and Jacobson S. (2003) Detection of virus-specific T cells and CD8(+) T-cell epitopes by acquisition of peptide-HLA-GFP complexes: analysis of T-cell phenotype and function in chronic viral infections. *Nature Medicine* **9**, 469-475.
- Torrens I., Mendoza O., Batte A., Reyes O., Fernandez L. E., Mesa C. and Guillen G. (2005) Immunotherapy with CTL peptide and VSSP eradicated established human papillomavirus (HPV) type 16 E7-expressing tumors. *Vaccine* **23**, 5768-5774.
- Valdespino V., Gorodezky C., Ortiz V., Kaufmann A. M., Roman-Basaure E., Vazquez A. and Berumen J. (2005) HPV16-specific cytotoxic T lymphocyte responses are detected in all HPV16-positive cervical cancer patients. *Gynecologic Oncology* **96**, 92-102.
- Vambutas A., DeVoti J., Nouri M., Drijfhout J. W., Lipford G. B., Bonagura V. R., van der Burg S. H. and Melief C. J. M. (2005) Therapeutic vaccination with papillomavirus E6 and E7 long peptides results in the control of both established virus-induced lesions and latently infected sites in a pre-clinical cottontail rabbit papillomavirus model. *Vaccine* **23**, 5271-5280.
- van Hall T., Wolpert E. Z., van Veelen P., Laban S., van der Veer M., Roseboom M., Bres S., Grufman P., de Ru A., Meiring H., de Jong A., Franken K., Teixeira A., Valentijn R., Drijfhout J. W., Koning F., Camps M., Ossendorp F., Karre K., Ljunggren H. G., Melief C. J. M. and Offringa R. (2006) Selective cytotoxic T-lymphocyte targeting of tumor immune escape variants. *Nature Medicine* **12**, 417-424.
- van Poelgeest M. I. E., Nijhuis E. R., Kwappenberg K. M. C., Hamming I. E., Drijfhout J. W., Fleuren G. J., van der Zee A. G. J., Melief C. J. M., Kenter G. G., Nijman H. W., Offringa R. and van der Burg S. H. (2006) Distinct regulation and impact of type 1 T-cell immunity against HPV16 L1, E2 and E6 antigens during HPV16-induced cervical infection and neoplasia. *International Journal Of Cancer* **118**, 675-683.
- Wadler S., Levy D., Frederickson H. L., Falkson C. I., Wang Y. X., Weller E., Burk R., Ho G. and Kadish A. S. (2004) A phase II trial of interleukin-12 in patients with advanced cervical cancer: clinical and immunologic correlates Eastern Cooperative Oncology Group study E1E96. *Gynecologic Oncology* **92**, 957-964.
- Welters M. J. P., van der Logt P., van den Eeden S. J. F., Kwappenberg K. M. C., Drijfhout J. W., Fleuren G. J., Kenter G. G., Melief C. J. M., van der Burg S. H. and Offringa R. (2006) Detection of human papillomavirus type 18 E6 and E7-specific CD4+T-helper 1 immunity in relation to health versus disease. *International Journal Of Cancer* **118**, 950-956.
- Weston S. A. and Parish C. R. (1990) New Fluorescent Dyes For Lymphocyte Migration Studies - Analysis By Flow-Cytometry And Fluorescence Microscopy. *Journal Of Immunological Methods* **133**, 87-97.
- Wiethe C., Dittmar K., Doan T., Lindenmaier W. and Tindle R. (2003) Enhanced effector and memory CTL responses generated by incorporation of receptor activator of NF-kappa B(RANK)/RANK ligand costimulatory molecules into dendritic cell immunogens expressing a human tumor-specific antigen. *Journal Of Immunology* **171**, 4121-4130.
- Wu T. C., Guarnieri F. G., Staveleyocarrroll K. F., Viscidi R. P., Levitsky H. I., Hedrick L., Cho K. R., August J. T. and Pardoll D. M. (1995) Engineering An

- Intracellular Pathway For Major Histocompatibility Complex Class-II Presentation Of Antigens. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **92**, 11671-11675.
- Xu Q., Wang S. X., Xi L., Wu S. F., Chen G., Zhao Y., Wu Y. and Ma D. (2006) Effects of human papillomavirus type 16 E7 protein on the growth of cervical carcinoma cells and immuno-escape through the TGF-beta 1 signaling pathway. *Gynecologic Oncology* **101**, 132-139.
- Zaretzky F. R., Gray M. C. and Hewlett E. L. (2002) Mechanism of association of adenylate cyclase toxin with the surface of Bordetella pertussis: a role for toxin-filamentous haemagglutinin interaction. *Molecular Microbiology* **45**, 1589-1598.
- Zuber B., Levitsky V., Jonsson G., Paulie S., Samarina A., Grundstrom S., Metkar S., Norell H., Callender G. G., Froelich C. and Ahlborg N. (2005) Detection of human perforin by ELISpot and ELISA: Ex vivo identification of virus-specific cells. *Journal Of Immunological Methods* **302**, 13-25.
- Zwaveling S., Mota S. C. F., Nouta J., Johnson M., Lipford G. B., Offringa R., van der Burg S. H. and Melief C. J. M. (2002) Established human papillomavirus type 16-expressing tumors are effectively eradicated following vaccination with long peptides. *Journal Of Immunology* **169**, 350-358.