

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERSITY KARLOVY V PRAZE

KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Cross-prezentace a její vliv na imunitní odpovědi
vyvolané umělými virovými kapsidami**

Lucie Klímová

Školitel: Doc. RNDr Jitka Forstová

2005 / 2006

Obsah:

1. Úvod	1
2. Cross – prezentace	1
2.1. Klasická cesta prezentace antigenních peptidů v komplexu s MHCgpI	1
2.2. Mechanizmy cross-prezentace	2
2.2.1. Dráha fagozom (endozom)-cytosol a cross-prezentace	2
2.2.2. Vakuolární dráha cross-prezentace	4
2.3. Zdroje cross-prezentovaných antigenů a jejich příjem	6
2.3.1. Exozomy a jejich příjem	7
2.3.2. „Heat shock“ proteiny a jejich příjem	7
2.3.3. Apoptické buňky a jejich příjem	9
2.3.4. Virům podobné částice (VLP) a jejich příjem	10
2.3.5. Příjem prostřednictvím mezibuněčných spojů, „gap junctions“	11
2.3.6. Příjem „nibbling“ procesem	11
3. Vliv cross-prezentace na imunitní odpověď vyvolanou VLP	13
3.1. Aktivace dendritických buněk	13
3.2. Částice odvozené od viru hepatitidy B	16
3.3. Částice odvozené od parvovirů	18
3.4. Částice odvozené od papillomavirů	19
3.5. Částice odvozené od dalších virů	20
3.6. Využití VLP v terapii	21
4. Závěr	23
5. Seznam použité literatury	24

1. Úvod

Pro zahájení efektivní imunitní reakce proti intracelulárním parazitům jako jsou například viry je nutná aktivace adaptivní složky imunitního systému, zahrnující $CD8^+$ a $CD4^+$ T-lymfocyty. Tuto, v organismu ojedinělou schopnost, mají pouze profesionální antigen prezentující buňky (APC). Za nejvíce potentní APC jsou obecně považovány buňky dendritické (DC). Nacházejí se téměř ve všech tkáních, kde sbírají vzorky antigenů a prezentují je $CD8^+$ a $CD4^+$ T-lymfocytům. $CD4^+$ T-lymfocyty (prekurzory pomocných T-lymfocytů) rozpoznávají na povrchu APC antigenní peptidy, pocházející z exogenních zdrojů, v komplexu s molekulami MHCgpII. Oproti tomu $CD8^+$ T-lymfocyty (prekurzory cytotoxických T-lymfocytů) rozpoznávají peptidy, pocházející z vnitrobuněčně syntetizovaných proteinů, v komplexu s molekulami MHCgpI. Nicméně Bevan (1987) popsal cestu, kterou může být i exogenní antigen prezentován $CD8^+$ T-lymfocytům v komplexu s molekulami MHCgpI. Tato cesta se nazývá cross-prezentace a proces, ve kterém jsou touto cestou aktivovány cytotoxické T-lymfocyty (CTL) se nazývá „cross-priming“. Tato cesta má velký význam především při obraně proti virům, které buď DC vůbec neinfikují nebo omezují jejich funkce vedoucí k aktivaci T-lymfocytů (Ploegh *et al.*, 1998). Pro indukci CTL proti virem infikovaným buňkám je tedy nutné, aby sama DC byla virem infikována nebo aby internalizovala a cross-prezentovala antigeny pocházející z jejího okolí. Ačkoliv byla schopnost cross-prezentace zaznamenána u B-lymfocytů (Ke a Kapp, 1996), endoteliálních buněk (Savinov *et al.*, 2003) a makrofágů, jsou za nejintenzivněji cross-prezentující buňky považovány DC.

2. Cross-prezentace

2.1. Klasická cesta prezentace antigenních peptidů v komplexu s MHCgpI

Většina buněk má schopnost prezentovat peptidy na MHC molekulách I třídy. Jde o schopnost důležitou zejména pro identifikaci virem infikovaných a nádorově pozměněných buněk $CD8^+$ cytotoxickými T-lymfocyty (CTL). Tato vlastnost je omezena pouze na prezentaci peptidů syntetizovaných uvnitř buňky, což umožňuje buňkám imunitního systému cílit svou odpověď pouze na tyto infikované nebo pozměněné buňky.

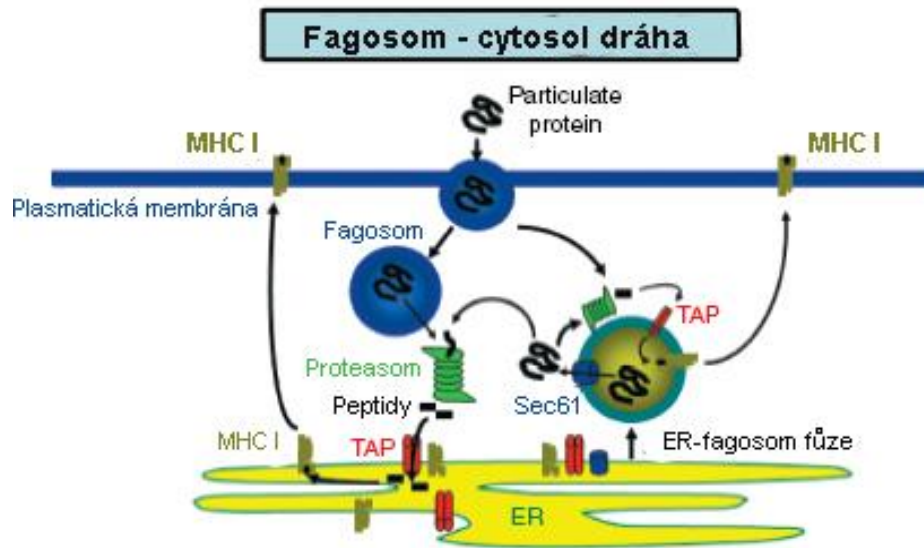
Těžké řetězce MHCgp I jsou transmembránové glykoproteiny o velikosti 44 kDa. V průběhu své syntézy na membráně endoplasmatického retikula (ER) se váží na chaperon calnexin (CNX) asociovaný s vnitřní stranou ER membrány. CNX vytváří v rámci molekuly těžkého řetězce disulfidové vazby a napomáhá jejímu uspořádání do vhodné konformace. V průběhu disociace CNX váže těžký řetězec molekulu β_2 mikroglobulinu (β_2m) a je inkorporován do peptid-nakládajícího komplexu. Nejdůležitějšími komponentami tohoto komplexu jsou: dvoupodjednotkový transportér asociovaný s antigenními úpravami (TAP1, TAP2), transmembránový glykoprotein tapasin, chaperon endoplazmatického retikula calreticulin (CRT) a oxidoreduktáza Erp57. Peptidy nakládané na molekuly MHCgpI jsou nejprve v cytosolu upraveny ER-asociovanou aminopeptidázou (ERAAP nebo ERAP1) na peptidy o velikosti 8-10 aminokyselin a poté jsou transportovány do ER prostřednictvím TAP transportéru. Pokud má peptid vhodnou aminokyselinovou sekvenci, je navázán na MHC I - β_2m heterodimer, který může být uvolněn z peptid-nakládajícího komplexu. Správně sestavené molekuly MHCgpI v komplexu s antigenními peptidy opouští ER a putují sekreční dráhou skrz Golgiho aparát na buněčný povrch kde jsou vystaveny $CD8^+$ T-lymfocytům. Shrnutí v review Cresswell *et al.* (2005).

2.2. Mechanizmy cross-prezentace

2.2.1. Dráha fagozom (endozom)-cytosol a cross-prezentace (TAP závislá)

Po internalizaci do fagozomů (endozomů) nebo makropinozomů jsou antigeny transportovány do cytosolu. Tomu, že se tento transport uskutečňuje, napovídá pozorování Kovacsovics-Bankowski a Rocka (1995), kteří ve své studii použili částice obsahující toxin gelonin. Ten prostřednictvím enzymatické modifikace ribozomů blokuje syntézu proteinů v cytosolu. Inhibice syntézy byla pozorována krátce poté, co APC tyto částice internalizovaly. To, jakým způsobem se transport do cytosolu uskutečňuje, je zatím předmětem zkoumání, ale předpokládá se, že zahrnuje Sec 61 komplex (multimolekulární kanál sloužící k transportu nesprávně sbalených proteinů z ER do cytosolu) jehož

komponenty byly pozorovány ve spojení s purifikovanými fagozomy dendritických buněk (Guermónprez *et al.*, 2003).



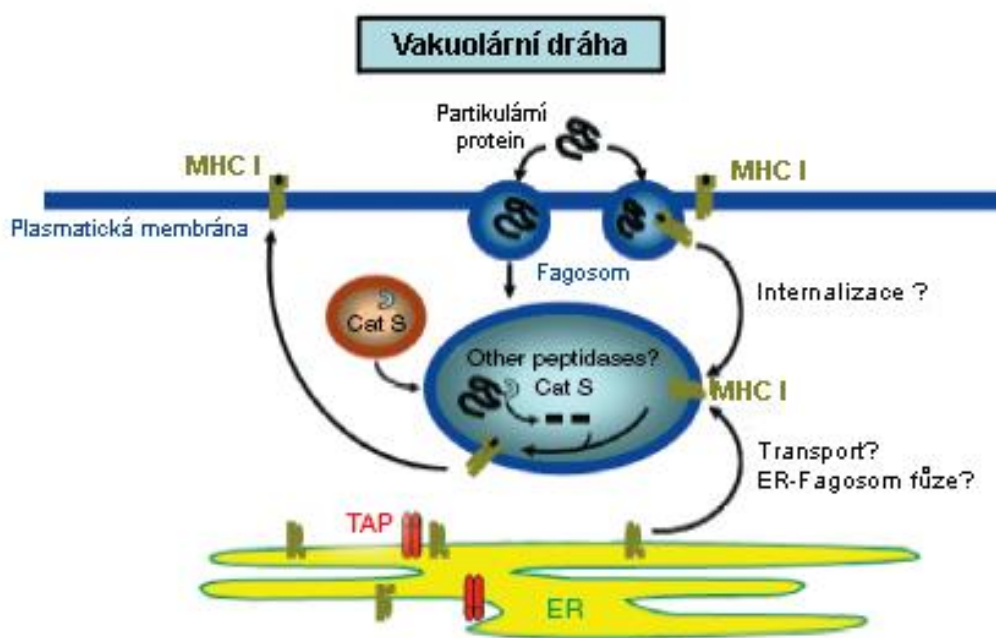
Obr.1: Schéma cross-prezentace dráhou fagozom (endozom)-cytosol. Po internalizaci je antigenní materiál transportován do cytosolu, degradován proteazomy a transportován zpět do fagozomu nebo ER odvozené fagozomální organely prostřednictvím TAP transportéru. Antigenní peptidy se poté váží na nově syntetizované molekuly MHCgPI buď v ER nebo ER-fagozomální organely a vzniklé komplexy jsou transportovány k buněčnému povrchu. Převzato z Rock a Shen (2005).

V cytosolu je internalizovaný materiál hydrolyzován proteazomy na oligopeptidy, což bylo potvrzeno inhibičním vlivem proteazomálních inhibitorů na efektivitu cross-prezentace (Kovacsóvics-Bankowski a Rock, 1995; Huang *et al.*, 1996). Vzniklé oligopeptidy jsou poté transportovány do ER (York a Rock, 1996) nebo od ER odvozeného fagozomálního vesiklu. TAP transportér se zdá být v tomto procesu esenciální, protože makrofágy a dendritické buňky deficientní na TAP jsou neschopné prezentovat antigeny na svých MHCgPI molekulách (Kovacsóvics-Bankowski a Rock, 1995). Nedávno byla prokázána možnost fúze fagozomů s měchýřky odvozenými od ER. Takový „ER-fagozomální“ hybridní endozom obsahuje nově syntetizované molekuly MHCgPI a všechny další molekuly potřebné k naložení peptidů na MHCgPI molekuly (TAP, tapasin, caretulin a Erp57) (Ackerman *et al.*, 2003; Guermónprez *et al.*, 2003; Houde *et al.*, 2003). Znázorněno na obrázku 1.

2.2.2. Vakuolární dráha cross-prezentace (TAP nezávislá)

Některé antigeny, například PLGA (poly lactic-co-glycolic acid), virové proteiny a virům podobné částice (VLP) jsou cross-prezentovány mechanismem, který je nezávislý na TAP transportéru a necitlivý k proteazomálním inhibitorům (Schirmbeck *et al.*, 1994; Bachmann *et al.*, 1995; Ruedl *et al.*, 2002; Shen *et al.*, 2004). Nezávislost na TAP a proteazomech ukazuje na to, že prezentované peptidy nejsou vytvářeny v cytosolu, ale v nějaké endolytické organelle. S použitím leupeptinu, inhibitoru endozomálních proteáz, bylo zjištěno, že cathepsinové proteázy, především cathepsin S, jsou odpovědné za generování prezentovaných peptidů (Shen *et al.*, 2004). Jedná se o cysteinové proteázy, které generují peptidy pro prezentaci na MHCgpII molekulách (Hsieh *et al.*, 2002). Cathepsin S je produkován především v APCs, vyznačuje se vysokou specifitou a na rozdíl od ostatních cysteinových proteáz, aktivovaných kyselým pH, je funkční i v pH neutrálním (Shi *et al.*, 1992). To má význam zejména z toho hlediska, že v kyselém pH jsou MHCgpI molekuly nestabilní a váží peptidy velmi neefektivně. Je tedy možné, že vakuolární dráha se uskutečňuje i v endozomech s neutrálním pH, např. v časných endozomech (Ackerman *et al.*, 2003), kde je cathepsin S jedinou funkční proteázou. Ve vakuolární dráze je tedy antigen internalizován do fagozomu, kde je cathepsinem S a možná i jinými endozomálními proteázami degradován na oligopeptidy, které jsou následně naloženy na molekuly MHCgpI. Jakým způsobem se MHCgpI molekuly dostávají do vakuoly nebylo zatím dostatečně objasněno. Existuje několik diskutovaných variant: internalizací z plazmatické membrány během fagocytózy (endocytózy) (Grommé *et al.*, 1999), transportem nově syntetizovaných MHCgpI molekul z ER a nebo fúzí ER s fagozomy (Gagnon *et al.*, 2002). Znázorněno na obrázku 2. Zatím není přesně známo, co rozhoduje o tom, která z cest cross-prezentace bude použita, ale předpokládá se, že to může být předurčeno fyzikální formou antigenu (Shen *et al.*, 2004). Obecně lze říci, že z buněk derivované antigeny jsou cross-prezentovány prostřednictvím TAP závislé dráhy (Kovacsovic-Bankowski a Rock, 1995; Huang *et al.*, 1996), zatímco cross-prezentace virových a bakteriálních antigenů se ubírá dráhou nezávislou na TAP (Bachmann *et al.*, 1995; Schirmbeck *et al.*, 1995). Obě cesty mohou operovat v téže buňce současně, přičemž dráhu nezávislou na TAP umí efektivně využívat jak makrofágy tak dendritické buňky, zatímco na TAP závislá dráha je více méně omezena na dendritické buňky (Rudel *et al.*,

2002). Vakuolární dráha může mít velký význam v případech, kdy jsou APC infikovány viry, které blokují cytosolickou dráhu, například inhibicí TAP transportéru (Ploegh, 1998). Navíc, protivirové cytokiny (např. IFN γ) uvolňované během virové infekce indukují expresi cathepsinu S (Chapman *et al.*, 1997), což podporuje význam této cesty v protivirové imunitě.



Obr.2: Schéma cross-prezentace vakuolární dráhou. Internalizovaný antigenní materiál je degradován cathepsinem, popřípadě i jinými peptidázami uvnitř fagosomu nebo v ER-fagosomální organele a takto vzniklé antigenní peptidy se váží na MHCgpI. MHCgpI mohou pocházet z buněčného povrchu, z ER a nebo jsou přítomny přímo v ER-fagosomální organele. Komplexy MHCgpI/peptid jsou poté transportovány k plazmatické membráně. Převzato z Rock a Shen (2005).

2.3. Zdroje cross-prezentovaných antigenů a jejich příjem

Jednou z nejdůležitějších otázek, která nebyla dosud dostatečně zodpovězena, je jak jsou antigeny z vnějšího prostředí přijímány antigen prezentujícími buňkami (APC) a jak vstupují do dráhy cross-prezentace. Jedním z nejlépe prostudovaných způsobů příjmu antigenů je fagocytóza (Ackerman *et al.*, 2003; Guermonprez *et al.*, 2003; Houde *et al.* 2003), ale byly popsány i další způsoby zahrnující makropinocytózu, příjem exozomů (Wolfers *et al.*, 2001), apoptotických tělísek (Albert *et al.*, 1998), „heat shock“ proteinů (HSP) (Srivastava, 2002), příjem virům podobných částic (VLP-„virus-like particles“) (Böhm *et al.*, 1995; Schirmbeck *et al.*, 1996; Ruedl *et al.*, 2002; Fausch *et al.*, 2003; Moron *et al.*, 2003) a v nedávné době popsáný příjem antigenů prostřednictvím „gap junctions“, mezibuněčných spojů (Neijssen *et al.*, 2005). Překvapením se stalo pozorování Harshyne a jeho kolegů (2001), že APC mohou přijímat antigen z žijících buněk v procesu zvaném „nibbling“. Původně se totiž předpokládalo, že apoptóza buňky nesoucí antigen je pro příjem esenciální a že apoptotická tělíska jsou hlavním zdrojem cross-prezentovaných antigenů (Albert *et al.*, 1998).

Příjem antigenů prostřednictvím fagocytózy je v poslední době velmi diskutovaným tématem a to z toho důvodu, že zatím nebyl jednoznačně určen původ fagozomální membrány. Dlouhou dobu se předpokládalo, že fagozomální membrána je odvozena od plazmatické membrány, ale v nedávné době byl navržen alternativní model: Model fagocytózy zprostředkované ER (Gagnon *et al.*, 2002; Desjardins, 2003), který předpokládá že během fagocytózy se ER dostává do těsné blízkosti plazmatické membrány a fúzí s ní se podílí na formování nově vznikajícího fagozomu. Tento koncept napomáhá vysvětlit schopnost fagocytů internalizovat obrovské částice, aniž by byl výrazně snížen povrch plazmatické membrány. Navíc možnost fúze membrány ER s membránou plazmatickou má obrovský význam pro vysvětlení procesu cross-prezentace. Vysvětluje totiž pozorování přítomnosti protein-nakládajícího („loading“) komplexu složeného z plně funkčních proteinů ER (MHCgpI molekul, β_2m , TAP, calretikulinu, calnexinu, tapasinu a Erp57 proteinu) již v časných fagozomech (Ackerman *et al.*, 2003; Gagnon *et al.*, 2002). Jestliže je ER donorem fagozomální membrány, obsahuje stávající fagozom veškeré proteiny potřebné pro naložení antigenů na MHCgpI molekuly a stává se tak unikátní organelou, schopnou cross-prezentovat antigeny i bez další účasti ER (Houde *et al.*, 2003). Nicméně

poslední studie (Touret *et al.*, 2005) tuto teorii vyvracejí. V Touretových experimentech nebyla prokázána účast membrány ER na formování a maturaci fagozomů, naopak podporují teorii vzniku fagozomální membrány jako derivátu membrány plazmatické.

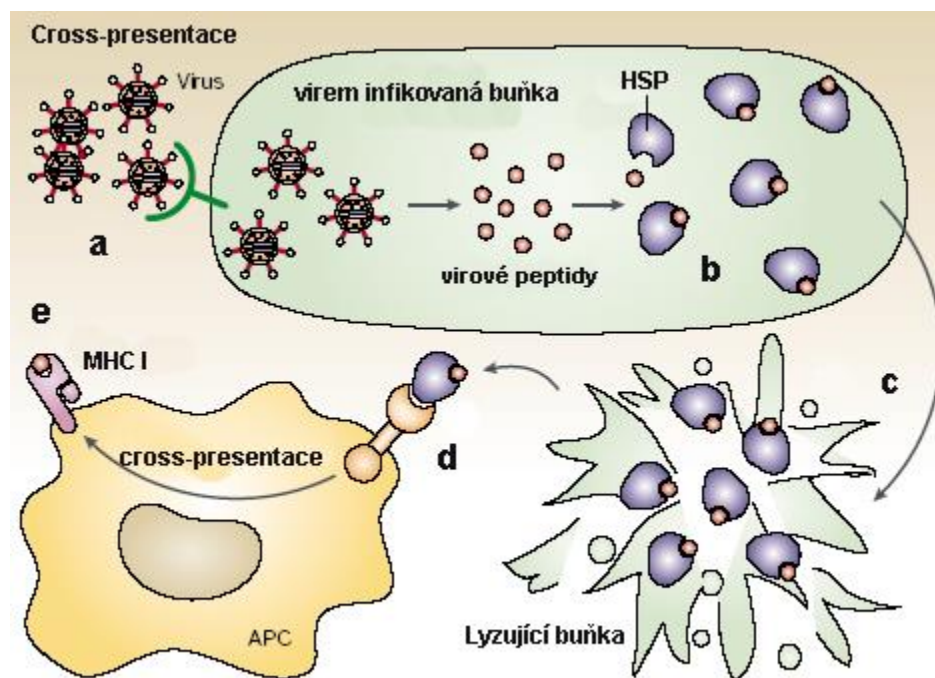
2.3.1. Exozomy a jejich příjem

Exozomy, malé membránové váčky, jsou odvozeny od endozomů a jsou sekretovány celou řadou buněk, například B-lymfocyty (Raposo *et al.*, 1996), dendritickými buňkami (Zitvogel *et al.*, 1998) nebo nádorovými buňkami (Wolfers *et al.*, 2001). Exozomy obsahují proteiny účastníci se antigenní prezentace a bývají selektivně obohaceny molekulami, které se účastní jejich zacílení k efektorové buňce (APC). Wolfers a spolupracovníci (2001) prokázali, že myši i lidské nádorové buňky konstitutivně uvolňují takové membránové měchýřky. Ty jsou přijímány dendritickými buňkami a v nich obsažené nádorové antigeny jsou cross-prezentovány CD8⁺ T-lymfocytům. Tímto způsobem generované CTL se pak podílí na protinádorové imunitě a chrání myš před rozvojem novotvarů (Wolfers *et al.*, 2001).

2.3.2. „Heat shock“ proteiny a jejich příjem

„Heat shock“ proteiny (HSP) jsou přítomny ve všech buňkách a jsou zahrnuty v procesech skládání a rozbalování proteinů, degradaci proteinů a ve skládání vícepodjednotkových proteinových komplexů. Mimoto, pokud jsou izolovány z buněk, mohou posloužit jako zdroj antigenu pro APC. HSP jsou velmi imunogenní, což je způsobeno jejich schopností nekovalentně asociovat s antigenními peptidy generovanými degradační dráhou. Bylo zjištěno, že HSP izolované z nádorově pozměněných buněk iniciují specifickou CTL odpověď zaměřenou proti nádorovým buňkám, zatímco HSP izolované ze zdravých buněk ne. Vazba HSP (gp96, Hsp70, Hsp90 a calretikulinu) k APC je zprostředkována receptorem CD91. Po interakci s ním jsou HSP internalizovány do endozomu, dostávají se na fagozom-cytosol dráhu cross-prezentace a jsou vystaveny CD8⁺ T-lymfocytům. (V některých případech, v závislosti na charakteru antigenního peptidu, může dojít k naložení na molekuly MHCgpI již v endozomu.) HSP mohou být *in vitro* „naloženy“ syntetickými

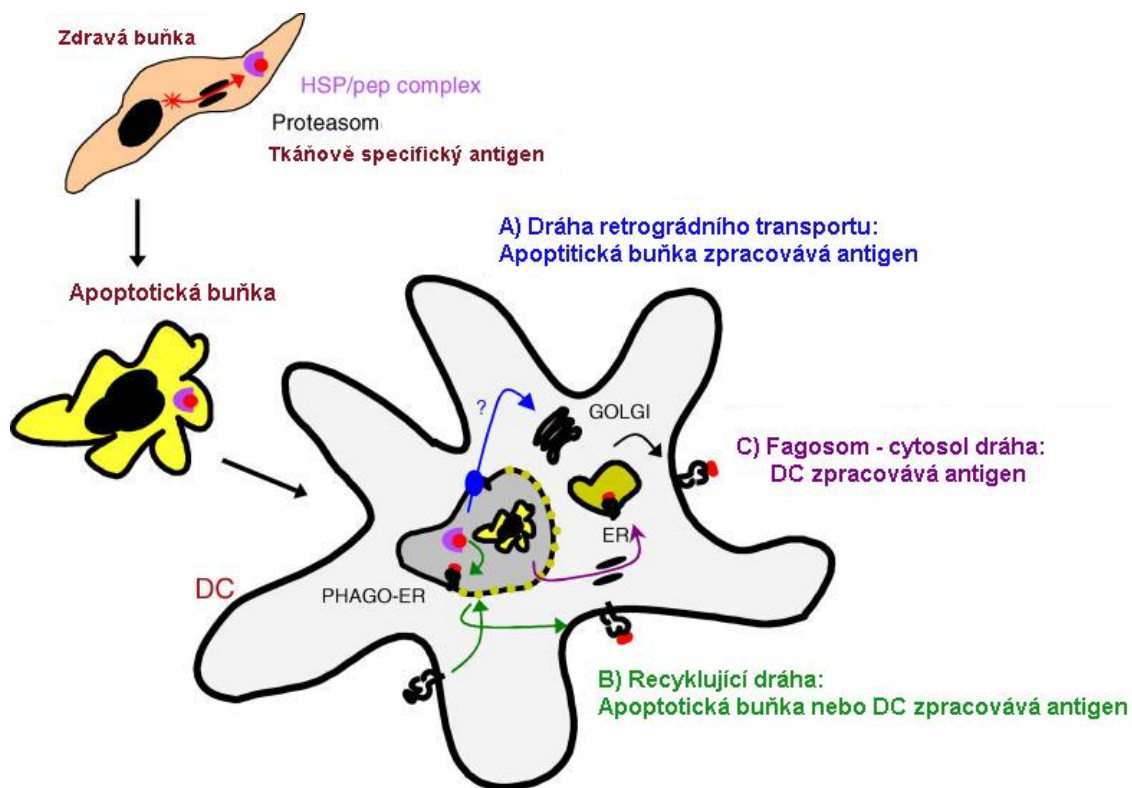
peptidy a využity k imunizaci zvířat proti celé řadě virových a nádorových antigenů. Například komplexy gp96 nebo Hsp70 se specifickými virovými epitopy (z SV40, viru influenza, viru vesikulární stomatitidy, herpetických virů a dalších) aktivují touto cestou virově specifickou CTL imunitu. Velmi malá frakce HSP komplexů internalizovaných prostřednictvím CD91 vstupuje do kyselého kompartmentu kde je antigenní peptid naložen na molekuly MHCgpII a vystaven CD4⁺ T-lymfocytům. Antigenní peptidy asociované s HSP mohou tedy aktivovat jak CD8⁺ tak CD4⁺ T-lymfocyty. Shrnuto v review Srivastava (2002).



Obr.3: Role HSP v přenosu virových antigenů. a) vstup viru do buňky prostřednictvím specifického receptoru. b) vazba virových peptidů na HSP. c) lyze infikované buňky. d) vazba komplexu HSP/peptid na CD91 receptor APC. e) cross-prezentace virového peptidu v komplexu s MHCgpI molekulou. Převzato ze Srivastava (2002).

2.3.3. Apoptotické buňky a jejich příjem:

Apoptotické buňky mohou posloužit jako bohatý zdroj antigenního materiálu zahrnující virové proteiny, produkty mutovaných genů, HSP proteiny v komplexu s antigenními peptidy, nukleové kyseliny aj. Lidské dendritické buňky mají schopnost tento zdroj využít, efektivně jej cross-prezentovat a stimulovat tak CD8⁺ CTL (Albert *et al.*, 1998b). Albert a kolegové (1998b) popisují apoptotické buňky jako preferovaný zdroj antigenů pro cross-prezentaci. To z toho důvodu, že inhibitor kaspázové aktivity (Z-VAD-CHO), který blokuje apoptózu, výrazně negativně ovlivňuje schopnost cross-prezentace. Fagocytóza apoptotických buněk je omezena na nematurované DC a je zprostředkována molekulami integrinového receptoru $\alpha_v\beta_5$ (Albert *et al.*, 1998a). Makrofágy, které efektivně pohlcují apoptotické buňky, selhávají v cross-prezentaci v nich obsaženého materiálu. Sice exprimují celou řadu receptorů pro tento způsob příjmu, ale postrádají $\alpha_v\beta_5$, který pravděpodobně hraje roli v propojení příjmu antigenu a jeho prezentaci (Albert *et al.*, 1998a). Z toho lze usuzovat, že funkcí makrofágů je spíše degradovat antigenní materiál než jej prezentovat T lymfocytům. Během maturace DC ztrácí příslušné receptory a její schopnost fagocytózy je potlačena. Blanchère a kolegové (2005) prokázali, že sama apoptotická buňka se může podílet na prezentaci antigenů v tom smyslu, že předá DC již upravené antigenní peptidy. Cross-prezentace je poté nezávislá na zpracování antigenu (prostřednictvím TAP a proteazomů) dendritickou buňkou. Byly navrženy tři způsoby, jakými DC zpracovává materiál pocházející z apoptotické buňky (demonstrováno na zpracování komplexu HSP/peptid): A) Již apoptotickou buňkou zpracované antigeny odvozené od komplexu HSP/peptid, obsahující KDEL sekvenci (Lys-Asp-Glu-Leu), mohou následovat cestu retrográdního transportu do ER prostřednictvím vazby na KDEL receptory. B) Fúze ER s fagozomy nabízí možnost interakce antigenu s nově syntetizovanými MHCgpI v ER-fagozomální organelle. Alternativně může docházet k vazbě antigenního peptidu na molekuly MHCgpI internalizované z buněčného povrchu. Na zpracování antigenu se v tomto případě podílí buď DC nebo apoptotická buňka. C) DC zpracovává komplex HSP/peptid sama, bez přičinění apoptotické buňky, pravděpodobně dráhou fagozom-cytosol (Blanchère *et al.*, 2005). Znázorněno na obrázku 4.



Obr.4: Cross-prezentace antigenního materiálu pocházejícího z apoptotické buňky. A) Apototickou buňkou zpracovaný antigenní peptid prochází cestou retrográdního transportu a váže se na MHCgpI v ER-fagozomální organele. B) Vazba antigenního peptidu na nově syntetizované MHCgpI molekuly v ER-fagozomální organele nebo na MHCgpI molekuly internalizované z buněčného povrchu. C) Klasická dráha cross-prezentace fagozom-cytosol. Převzato z Blanchère *et al.* (2005).

2.3.4. Virům podobné částice (VLP) a jejich příjem

VLP jsou virům podobné částice, které vznikají samouspořádáním kapsidových proteinů. Postrádají genetickou informaci a jsou tudíž neinfekční. Schopnost VLP dosáhnout dráhy cross-prezentace a iniciovat silnou CTL odpověď je více méně úměrná efektivitě jejich vstupu do APC. Například částice odvozené od prasečího (porcine) parvoviru (PPV-VLP) jsou po intravenózním podání schopné vstoupit nejméně do 50% všech dendritických buněk (Morón *et al.*, 2002). Celá řada studií ukazuje, že různé VLP využívají odlišné

strategie vstupu do buňky, zahrnující makropinocytózu (Böhm *et al.*, 1995; Fausch *et al.*, 2003; Moron *et al.*, 2003), endocytózu závislou na clathrinu (Fausch *et al.*, 2003) a endocytózu nezávislou na clathrinu nebo caveolinu (Fausch *et al.*, 2003). VLP pro cross-prezentaci svých antigenů využívají jak dráhu fagozom-cytosol (Moron *et al.*, 2003), tak vakuolární dráhu (Schirmbeck *et al.*, 1996; Ruedl *et al.*, 2002).

2.3.5. Příjem prostřednictvím mezibuněčných spojů, „gap junctions“

Příjem antigenů prostřednictvím „gap junctions“ je zprostředkován molekulami connexinu. Spojením šesti connexinových molekul vzniká hemikanál a asociací dvou hemikanálů sousedících buněk vzniká funkční „gap junction“, nespecifický kanál, který umožňuje pasivní difuzi molekul o relativní molekulové hmotnosti do 1000 Da. Connexin 43 (Cx43) je exprimován v celé řadě buněk včetně hematopoetických buněk zahrnujících folikulární dendritické buňky, B-lymfocyty, monocyty a aktivované lymfocyty (Oviedo-Orta a Evans, 2004). Ve tkáních infikovaných virem jsou produkovány tzv. signály nebezpečí ve formě TNF- α a INF- γ , které zvyšují expresi Cx43 (Eugenin *et al.*, 2003) a zajišťují stimulaci monocytů nutnou pro efektivní cross-prezentaci virových antigenů. Neijseen a spolupracovníci (2005) prokázali, že Langerhansovy buňky (podtyp dendritických buněk) mohou vytvářet „gap junction“ s okolními keratinocyty, získávat od nich antigeny a cross-prezentovat je v lymfatických uzlinách naivním T-lymfocytům. Tento způsob přenosu antigenu nabízí možnost, jak rozšířit likvidaci infikovaných tkání i na další, zatím neinfikované buňky a tak efektivně omezit šíření viru.

2.3.6. Příjem „nibbling“ procesem

Harshine a spolupracovníci (2001) ve svých experimentech prokázali, že některé APC jsou schopné získávat antigeny ze zdravých buněk v procesu zvaném „nibbling“. Příjem antigenu je závislý na fyzickém kontaktu buněk a je zprostředkován „scavenger“ receptory (SR), zejména pak SR-A receptorem (Harshine *et al.*, 2003). Tímto způsobem jsou internalizovány části plazmatické membrány a v menší míře i intracelulární proteiny (Harshine *et al.*, 2003). Makrofágy, které účinně fagocytyují mrtvé buňky tuto schopnost postrádají, kdežto nematurované DC jsou schopné touto cestou získávat antigeny z širokého spektra hematopoetických buněk zahrnující makrofágy, B-lymfocyty a aktivované T-

lymfocyty (Harshine *et al.*, 2001). Tento rozdíl koreluje s rozdílnou intenzitou exprese SR-A v makrofágách a DC. Harshine a spolupracovníci (2003) také prokázali, že dendritické buňky efektivně internalizují tumorový antigen plazmatické membrány živých adenokarcinomových buněk, gp100, a cross-prezentují ho CD8⁺ T-lymfocytům. To poukazuje na důležitost tohoto procesu v indukci CTL odpovědi proti nádorově pozměněným buňkám. To, zda „nibbling“ hraje roli i v indukci protivirové imunity, nebylo zatím prokázáno.

3. Vliv cross-prezentace na imunitní odpověď vyvolanou VLP

Virům podobné partikule (VLP)

Celá řada kapsidových proteinů má jedinečnou schopnost se samouspořádat do virům podobných struktur (VLP). Ty mohou být izolovány buď přímo po expresi kapsidových proteinů v eukaryotických buňkách, nebo mohou být složeny *in vitro* z podjednotek kapsidových proteinů po jejich purifikaci z rekombinantních bakteriálních hostitelů. VLP velmi věrohodně napodobují své přirozené protějšky a často jsou od nich téměř neodlišitelné. Pro tuto svou vlastnost jsou široce využívány při studiu interakcí virů s jejich hostitelskými buňkami a buňkami imunitního systému. Navíc mají schopnost nést ve svém nitru nukleové kyseliny a malé molekuly. To z nich činí účinné nástroje genové terapie a imunoterapie jakožto prostředky pro dopravu např. terapeutických genů, léčiv, antigenů aj. do cílových buněk.

Pro studium interakcí virů s buňkami imunitního systému byly pro přípravu VLP využity proteiny členů mnoha virových skupin zahrnující papillomaviry (Lenz *et al.*, 2001; Greenstone *et al.*, 1998; Rudolf *et al.*, 2001; Fausch *et al.*, 2003), parvoviry (Sedlik *et al.*, 1997; Morón *et al.*, 2002; Morón *et al.*, 2003), flaviviry (Warfield *et al.*, 2003; Bosio *et al.*, 2004; Barth *et al.*, 2005), hepadnaviry (Reimann a Schirmbeck, 1999; Schirmbeck *et al.*, 1995; Böhm *et al.*, 1995), polyomaviry (Vlastos *et al.*, 2003; Caparrós-Wanderley *et al.*, 2004; Bouřa *et al.*, 2005) aj.

VLP jsou vysoce imunogenní, což je způsobeno charakterem jejich interakcí s DC. Jsou schopné velmi efektivně dopravit antigeny jak do dráhy MHCgPI tak do dráhy MHCgPII molekul v APC a aktivovat tak CD8⁺ a CD4⁺ T-lymfocyty (Sedlik *et al.*, 1997; Lenz *et al.*, 2001; Warfield *et al.*, 2003; Barth *et al.*, 2005). Navíc některé dokáží APC aktivovat (Lenz *et al.*, 2001; Rudolf *et al.*, 2001; Fausch *et al.*, 2002; Storni *et al.* 2002; Bosio *et al.*, 2004), což je nepostradatelný krok pro aktivaci specifických T-lymfocytů a zahájení efektivní imunitní reakce.

3.1. Aktivace dendritických buněk

Samotné rozpoznání komplexů MHCgPI/peptid CD8⁺ T-lymfocyty na povrchu APC není dostatečné pro iniciaci efektivní CTL odpovědi. K tomu aby CD8⁺ T-lymfocyt (prekurzor

CTL) dostal plný aktivační signál ke konečné diferenciaci v efektorový CTL, je zapotřebí spolupráce receptoru kostimulačního signálu (CD28), který rozpoznává CD80 a CD86 molekuly na povrchu APC. Ale nematurované DC, které jsou specializované především k příjmu antigenního materiálu, tyto kostimulační molekuly postrádají. K tomu aby byly kostimulační molekuly exprimovány je nutná aktivace APC. Ta může být zajištěna interakcí s pomocnými T-lymfocyty (spojením CD40 ligandu na T-lymfocytu s CD40 receptorem na DC), mikrobiálními produkty (např. LPS nebo bakteriálními oligonukleotidy obsahujícími nemetylované CpG motivy), virovými produkty (např. dsRNA), nebo zánět podporujícími cytokiny (TNF α , IL-1 β). Schopnost aktivovat DC mají i některé VLP, což jim umožňuje vyvolat CTL odpověď i v nepřítomnosti pomocných T_H buněk. Kontakt s VLP může u DC vyvolat celou řadu fenotypových a funkčních změn: zvýšení exprese molekul MHCgp (Bosio *et al.*, 2004) a kostimulačních molekul (CD40, CD80, CD86 a CD83) (Rudolf *et al.*, 2001; Bosio *et al.*, 2005; Barth *et al.*, 2005), zvýšení exprese receptorů pro chemokiny (CCR7) (Bosio *et al.*, 2004) a produkci cytokinů (IL-12, IL-6, IL-8 a TNF- α) (Lenz *et al.*, 2001; Rudolf *et al.*, 2001; Bosio *et al.*, 2004; Lenz *et al.*, 2002). Aktivací se nematurovaná, antigen přijímající DC, mění v maturovanou, antigen prezentující buňku.

Mechanismus aktivace dendritických buněk

Po setkání s patogenem zahajují APC celou řadu drah signální transdukce. Jejich výsledkem je exprese genů, jejichž produkty se podílí na formování imunitní odpovědi (Ardešna *et al.*, 2000). Dochází k aktivaci řady členů MAP-kinázové rodiny (mitogen activated protein kinase), aktivaci NF κ -B kaskády a/nebo fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3-K) (Ardešna *et al.*, 2000). Spektrum nově exprimovaných genů je charakteristické pro daný antigen a vyvolaná reakce je pro tento antigen specifická. Fausch a spoluautoři (2005b) a Yan a kolegové (2004) prokázali, že výše uvedené signální dráhy se uplatňují při aktivaci dendritických buněk po jejich kontaktu s HPV16-VLP (VLP odvozené od lidského papillomaviu typu 16).

Cílovými proteiny MAP-kinázové kaskády jsou v tomto případě transkripční faktory ATF a CREB1 (Fausch *et al.*, 2005b). Ty jsou fosforylací aktivovány, nasedají do promotorů řady genů a umožňují tak jejich transkripci. DNA vazebná místa pro ATF a CREB1 byla

identifikována v promotorech genů kódujících povrchové aktivační markery APC, CD80 a CD86 (Ardeshna *et al.*, 2000). Krátce po kontaktu dendritické buňky s VLP dochází ke zvýšení hladiny jak aktivovaných kináz MAP-kinázové kaskády, tak aktivovaných transkripčních faktorů ATF a CREB1 (Fausch *et al.*, 2005b). Navíc použití MAP-kinázového inhibitoru (SB203580) vede ke ztrátě schopnosti exprese některých povrchových aktivačních markerů (MHC gp I, CD80 a CD86), což je důkazem toho, že se MAP-kinázová dráha na aktivaci HPV-VLP stimulovaných DC podílí.

Další signální molekulou aktivovanou při styku patogenu s DC je NF- κ B (May a Gosh, 1998). NF- κ B je dimer složený ze dvou podjednotek (p50 a p65). Za normálních okolností je prostřednictvím svého inhibitoru (I κ B α) držen v cytoplazmě v neaktivní formě. Během buněčné aktivace je I κ B α fosforylován, ubiquitinylován a následně směřován k degradaci v proteazomech, čímž dochází k odkrytí jaderného lokalizačního signálu na NF- κ B a je umožněna jeho translokace do jádra. Zde NF- κ B napomáhá zahájení transkripce mnoha genů (May a Gosh, 1998). Kontakt DC s HPV-VLP vede k rychlému snížení hladiny I κ B α . Navíc inkubace DC s inhibitorem translokace NF- κ B do jádra (BAY11-7082) se projevuje výrazným omezením exprese povrchových aktivačních markerů (MHCgpI, CD80 a CD86) po kontaktu s VLP (Fausch *et al.*, 2005b). To naznačuje, že i NF- κ B hraje roli v aktivaci DC zprostředkované HPV-VLP. Regulace exprese povrchových aktivačních markerů APC není zdaleka jediný proces, který spadá pod kontrolu NF- κ B signální dráhy. Ossendorp a kolegové (2005) prokázali, že NF- κ B signalizace reguluje formování proteasomů. Během aktivace DC totiž dochází ke zvýšení exprese proteasomového aktivátoru PA28 $\alpha\beta$ (Macagno *et al.*, 1999). Ten je tvořen dvěma podjednotkami (PA28 α a PA28 β), přičemž exprese PA28 β je zahajována s pomocí transkripčního faktoru NF- κ B (Ossendorp *et al.*, 2005). Koncentrace PA28 β se tedy mění v závislosti na stupni maturace DC, zatímco koncentrace PA28 α zůstává konstantní (Ossendorp *et al.*, 2005). Během maturace se zvyšuje hladina funkčních komplexů PA28 $\alpha\beta$, které se podílejí na formování proteasomů. To dokazuje, že aktivace nezvyšuje pouze kostimulační schopnosti DC, ale také zvyšuje schopnost zpracování antigenů a tím i schopnost maturovaných DC cross-prezentovat antigeny CD8⁺ T-lymfocytům a indukovat CTL odpověď (Ossendorp *et al.*, 2005). Tato

hypotéza je v souladu s modelem „license to kill model“, ve kterém je maturace kritickým krokem pro iniciaci efektivní CTL odpovědi.

A konečně třetí zmiňovanou dráhou zahrnutou v aktivaci APC je dráha zprostředkovaná IP3-K (Ardeshna *et al.*, 2000). Jde o lipidovou kinázu, která hraje roli v regulaci celé řady buněčných procesů (Katso *et al.*, 2001). IP3-K aktivuje protein-kinázu C (PKC), která kromě aktivace mnoha dějů také moduluje aktivitu MAPK a NF- κ B kaskády (Vivanco *et al.*, 2002). Role IP3-K byla prokázána, stejně jako v předchozích dvou případech, i v aktivaci DC prostřednictvím HPV-VLP (Fausch *et al.*, 2005).

I přesto, že byly charakterizovány tyto tři základní signalizační dráhy jako součást aktivace DC, stále chybí řada informací potřebných pro pochopení tohoto procesu. Vzhledem k tomu, že v případě velké části VLP nebyl zatím dostatečně objasněn mechanismus jejich interakce s APC, je velmi obtížné charakterizovat mechanismus, kterým je signál z povrchu předáván do těchto tří drah.

3.2. Částice odvozené od viru hepatitidy B

Jedny z nejúčinnější VLP s ohledem na schopnost iniciovat efektivní CTL jsou partikule tvořené malým povrchovým antigenem viru hepatitidy B (HBsAg). 100 až 150 jednotek tohoto antigenu se samouspořádává do stabilních VLP o velikosti 20-30nm (Reimann a Schirmbeck, 1999). Dosud nebyl dostatečně objasněn mechanismus jejich vstupu do APC, ale předpokládá se, že by se mohlo jednat buď o receptorem zprostředkovanou endocytózu nezávislou na clathrinu nebo makropinocytózu (Reimann a Schirmbeck., 1999). Zpracování částic HBsAg APC je blokováno bafilomycinem, inhibitorem vakuolární H⁺ ATPázy, a zvýšením endozomálního pH (Schirmbeck *et al.*, 1995). Navíc je blokováno také leupeptinem, inhibitorem serin/cysteinových proteáz, což ukazuje na závislost zpracování HBsAg na kyselé proteolýze (Schirmbeck *et al.*, 1995). Necitlivost vůči inhibitorům proteazomů a fakt, že tato dráha efektivně probíhá i v TAP-deficientních buňkách ukazuje, že antigenní peptidy nejsou generovány v cytosolu za účasti proteazomů ale v endolysozomálních organele (Schirmbeck *et al.*, 1995). Jde tedy o TAP nezávislou dráhu prezentace. To, zda se jedná o cross-prezentaci je otázkou definice tohoto procesu. Jde sice o příjem a prezentaci exogenního antigenu v kontextu s molekulami MHCgpI, ale schopnost prezentovat částice HBsAg mají nejen DC a makrofágy ale i fibroblasty,

mastocyty, T-lymfocyty a B-lymfocyty. To ukazuje, že tyto partikule nenásledují cestu, která je specifická výhradně pro cross-prezentující buňky (DC a makrofágy) (Böhm *et al.*, 1995; Schirmbeck *et al.*, 1995).

Schirmbeck a kolegové (1996) se domnívají, že prezentace antigenů odvozených od HBsAg se účastní především prázdné molekuly MHCgpI (L^d molekuly). Ty jsou asociovány s buněčným povrchem a od klasických komplexů MHCgpI/peptid se liší především tím, že nejsou asociovány ani s antigenním peptidem, ani s β_2m (Lie *et al.*, 1990). Prázdné L^d molekuly jsou z povrchu spolu-internalizovány s HBsAg částicemi, naloženy antigenními peptidy generovanými lysozomální degradací HBsAg a recyklovány zpět na buněčný povrch pro antigenní prezentaci. Původ prázdných L^d molekul není zcela přesně znám, ale předpokládá se, že mohou vznikat disociací β_2m a antigenních peptidů z MHCgpI komplexů a to buď na povrchu buňky nebo během jejich transportu z ER přes post-Golgi k cytoplazmatické membráně (Day *et al.*, 1995). Reimann a Schirmbeck (1999) se domnívají, že prázdné L^d jsou asociovány s molekulami chaperonového typu, které jim zajišťují stabilitu v nepřítomnosti β_2m a antigenních peptidů, ale zatím se to nepodařilo prokázat.

Jak dendritické buňky tak makrofágy touto cestou efektivně aktivují antigen specifické CD8⁺ CTL *in vivo*. Böhm a kolegové (1995) prokázali, že APC efektivně adsorbují na svůj povrch a internalizují částice HBsAg. Pokud jsou DC nebo makrofágy nesoucí HBsAg čerstvě purifikovány z kožní tkáně a přeneseny do naivního syngenního hostitele, efektivně vyvolávají CTL odpověď namířenou proti HBsAg. Ačkoliv je tato schopnost pozorovatelná jak u DC, tak makrofágů, titrační pokusy prokázaly, že DC jsou v tomto procesu asi 100 krát efektivnější. Mimo stimulace specifických CTL, vede injekce VLP k vyvolání dlouhotrvající specifické protilátkové odpovědi detegovatelné minimálně 12 měsíců (Reimann a Schirmbeck, 1999).

Dalším proteinem kódovaným virem hepatitidy B využívaným ke konstrukci VLP je core protein HBcAg (Ruedl *et al.*, 2002; Storni *et al.*, 2002). Chimerické HBcAg částice nesoucí imunodominantní epitop LCMV (viru lymfocytární choriomeningitidy) p33 (p33VLP) jsou také efektivně zpracovávány pro prezentaci na MHCgpI molekulách, ale indukují jen velmi slabou CTL odpověď (Storni *et al.*, 2002). Dráha antigenní prezentace pro tyto VLP se zdá být jako v předchozím případě TAP nezávislá, ale jen do určité míry (Ruedl *et al.*, 2002).

TAP deficientní DC sice zprostředkovávají efektivní cross-prezentaci p33VLP *in vivo* a *in vitro*, ale ta je v porovnání s divokým typem DC redukována. To ukazuje, že ve zpracování p33VLP dendritickými buňkami jsou zahrnuty jak TAP závislá, tak TAP nezávislá dráha cross-prezentace. Na rozdíl od DC, TAP deficientní makrofágy prezentují p33VLP stejně efektivně jako divoký typ DC. To je důkazem toho, že mechanismus cross-prezentace závisí nejen na charakteru zpracovávaného antigenu, ale i typu buňky, která jej vykonává (Ruedl *et al.*, 2002). Neschopnost APC indukovat touto cestou efektivní CTL odpověď může být překonána dodáním anti-CD40 protilátek nebo inkorporací 20-30bp dlouhých oligonukleotidů obsahujících nemetylované CpG motivy. Takové stimuly poté zajišťují potřebnou aktivaci APC a cross-prezentace vede k velmi efektivní antigen specifické CTL odpovědi (Storni *et al.*, 2002; Storni *et al.*, 2004).

3.3. Částice odvozené od parvovirů

Další dopravní systém založený na nereplikujících se, virům podobných částicích představují VLP odvozené od prasečího (porcine) parvoviru (PPV) (Sedlik *et al.*, 1997; Morón *et al.*, 2002; Morón *et al.*, 2003). Molekuly hlavního kapsidového proteinu VP2 PPV nesoucí cizí CD8⁺ CTL epitopy se po expresi v hmyzích buňkách samouspořádávají do 25nm VLP (Sedlik *et al.*, 1997). Cizí epitop může pocházet z genových produktů odlišných virů, například z nukleoproteinu LCMV (Sedlik *et al.*, 1997; Morón *et al.*, 2002). PPV-VLP jsou přijímány výhradně DC a to s vysokou efektivitou. *In vivo* jsou internalizovány až polovinu buněk celé studované populace (Morón *et al.*, 2002). Jejich příjem je zprostředkován pravděpodobně makropinocytózou nebo endocytózou nezávislou na clathrinu (Morón *et al.*, 2003). Krátce po internalizaci jsou VLP lokalizovány v pozdním endozomu, jehož kyselé prostředí je esenciální pro zahájení zpracování VLP (Morón *et al.*, 2003). Napomáhá totiž aktivaci endolysosomálních proteolytických enzymů a pravděpodobně má pozitivní vliv na transport antigenního materiálu do cytosolu (Pillay *et al.*, 2002). Citlivost prezentace PPV-VLP k inhibitorům proteazomů (Morón *et al.*, 2003) a neschopnost jejich prezentace v TAP-deficientních buňkách (Morón *et al.*, 2002) prokazuje, že antigenní peptidy jsou generovány v cytosolu za účasti proteazomů. Jde tedy

o endozom-cytosol dráhu cross-prezentace, při níž v cytosolu vznikají peptidy vázané na nově syntetizované MHCgpI molekuly v ER (Morón *et al.*, 2003).

Imunizace myši PPV-VLP nesoucí CD8⁺ CTL epitop nukleoproteinu viru lymfocytární choriomeningitidy (LCMV) vyvolává silnou CTL odpověď namířenou jak proti kapsidovému proteinu VP2, tak proti epitopu LCMV a to i bez účasti pomocných T-lymfocytů (Sedlik *et al.*, 1997). Takto generované CTL jsou schopné zabíjet buňky infikované LCMV a imunizace *in vivo* kompletně chrání myš před onemocněním LCMV po dobu delší než 9 měsíců (Sedlik *et al.*, 1997).

3.4. Částice odvozené od papillomavirů

Nejintenzivněji zkoumané VLP papillomavirů jsou odvozeny od lidského papillomaviru typu 16 (HPV16-VLP), který je spojován se vznikem karcinomu děložního čípku. HPV16-VLP vyvolávající specifickou imunitní odpověď jsou tvořeny buď pouze L1, majoritním kapsidovým proteinem (Koutsky *et al.*, 2002), nebo jeho kombinací s minoritním kapsidovým proteinem L2 (Lenz *et al.*, 2001). L1 nebo L2 může být fúzován s nestrukturními papillomavirovými proteiny jako jsou například E2 a E7 (Greenstone *et al.*, 1998; Rudolf *et al.*, 2001; Fausch *et al.*, 2003). Příjem a prezentace HPV-VLP jsou nejvíce studovány u DC a Langerhansových buněk (LC) a to z toho důvodu, že charakter odpovědi na HPV-VLP se u těchto dvou typů APC výrazně liší (Fausch *et al.*, 2002; Fausch *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2004; Fausch *et al.*, 2005a). Zatímco DC přijímají HPV-VLP buď mechanismem makropinocytózy nebo clathrinem zprostředkované endocytózy, internalizace VLP LC je nezávislá na caveolinu nebo clathrinu (Fausch *et al.*, 2003). Navzdory odlišnému způsobu příjmu, jsou jak DC tak LC schopné antigeny odvozené od HPV-VLP cross-prezentovat na svém povrchu (Fausch *et al.*, 2003). Nicméně, LC naprosto selhávají v indukci specifické CTL odpovědi. To může být způsobeno buď odlišnou cross-prezentací a nebo odlišností v aktivaci těchto buněk po kontaktu s HPV-VLP (Fausch *et al.*, 2003). Zatímco nematurované DC jsou interakcí s HPV-VLP aktivovány, LC nikoliv (Rudolf *et al.*, 2001 Fausch *et al.*, 2002). Výsledkem aktivace DC je zvýšení exprese povrchových aktivačních markerů (CD80, CD83, CD86, CD40, MHCgpI), sekrece IL-12 a následná migrace DC do míst kontaktu s T-lymfocyty (Lenz *et al.*, 2001 Rudolf *et al.*, 2001). To, že LC tuto schopnost postrádají má za následek cross-prezentaci v nepřítomnosti

kostimulace vedoucí po kontaktu s T-lymfocyty spíše k imunosupresi a indukci tolerance vůči prezentovaným antigenům (Fausch *et al.*, 2003). Neschopnost HPV-VLP vyvolat aktivaci LC spočívá pravděpodobně v charakteru interakcí signálních kaskád aktivovaných po setkání s HPV-VLP (Fausch *et al.*, 2005b). Zatímco v DC jsou aktivovány NF- κ B a MAP-kinázové kaskády, v LC jsou tyto dráhy potlačeny. Navíc v LC jsou prostřednictvím zvýšené aktivace IP3-K kaskády negativně regulovány aktivace signálních kaskád vedoucích ke zvýšení exprese aktivačních markerů (Fausch *et al.*, 2005b). Jde s největší pravděpodobností o mechanismus úniku HPV před imunitním rozpoznáním (Fausch *et al.*, 2005b). K primární infekci HPV totiž dochází ve stratum basale, kde jsou LC jedinými APC. Nemožnost aktivace LC a potažmo jejich neschopnost migrovat z místa infekce (Fausch *et al.*, 2003) a aktivovat T-lymfocyty vysvětluje, proč je infekce tímto virem i po dobu několika let perzistentní. Fausch a kolegové (2005a) navrhli způsob, jakým by tento problém mohl být překonán. Zjistili, že jiné VLP odvozené taktéž od papillomavirů jsou přijímány DC a LC shodným způsobem, vedoucím u obou buněčných typů k aktivaci. Jde o bovine papillomavirus (BPV) VLP, cotton-tail rabbit papillomavirus (CRPV) VLP a HPV16-VLP-imunokomplexy. Poslední z jmenovaných VLP jsou tvořeny L1, L2 a E7 proteiny HPV16 v asociaci se specifickými protilátkami proti L1 proteinu. To umožňuje jejich vazbu a internalizaci oběma typy buněk shodným způsobem prostřednictvím Fc receptorů. CTL odpověď vyvolaná těmito částicemi je zaměřena jak proti epitopům kapsidových proteinů, tak proti epitopům E7 onkoproteinu.

Ačkoliv je vliv HPV-VLP na APC velmi intenzivně studován, nebyl zatím přesně definován mechanismus cross-prezentace. Otevřenou otázkou také nadále zůstává to, jakým způsobem se odehrává interakce HPV-VLP s povrchem APC. Některé experimenty naznačují, že by se mohlo jednat o interakci zprostředkovanou C-typem lektinů zahrnujících heparan sulfáty, CD16 (Fc γ RIII) a DC-SIGN (Da Silva *et al.*, 2001 Yan *et al.*, 2004; García-Piñeres *et al.*, 2006).

3.5. Částice odvozené od dalších virů

VLP odvozené od parvovirů, papillomavirů a viru hepatitidy B nejsou zdaleka jedinými částicemi se schopností dopravit antigenní peptidy do MHCgpI dráhy (cross-prezentace). Schopnost stimulovat touto cestou CTL byla zaznamenána i u VLP odvozených od viru

hepatitidy C (HCV-VLP) (Barth *et al.*, 2005), VLP odvozených od viru HIV (Tsunetsugu-Yokota *et al.*, 2003) a VLP odvozených od Ebola viru (Warfield *et al.*, 2003).

HCV-VLP tvořené strukturními proteiny HCV viru vstupují do APC neznámým způsobem. Zatím je známo pouze to, že HCV-VLP nevyužívají k vazbě povrchové lektiny C-typu, jako je tomu v případě HPV-VLP (Barth *et al.*, 2005). Internalizované VLP jsou směřovány pravděpodobně do lyzozomů. Ty později opouštějí a následují endozom-cytosol dráhu cross-prezentace (Barth *et al.*, 2005). Stejně tak jako celá řada VLP mají i HCV-VLP schopnost aktivovat DC (Barth *et al.*, 2005).

P55^{gag}VLP odvozené od gag proteinu HIV typu 1 (HIV-1p55^{gag} VLP) jsou antigen prezentujícími buňkami přijímány makropinocytózou nebo endocytózou a to pravděpodobně za účasti DC-SIGN (mannózu rozpoznávajícího receptoru) (Tsunetsugu-Yokota *et al.*, 2003). Doposud nebyl popsán mechanismus, kterým jsou HIV-1p55^{gag} VLP cross-prezentovány, ale je jisté, že k cross-prezentaci dochází. Ta vede k aktivaci gag specifických CD8⁺ T-lymfocytů. Tsunetsugu-Yokota a spolupracovníci (2003) pozorovali, že jedna třetina tímto způsobem generovaných CTL je pozitivní na perforin. Piliard a kolegové (2000) navíc prokázali, že HIV-1p55^{gag} VLP vyvolávají u makaků velmi silnou dlouhotrvající odpověď CTL proti HIV-1p55^{gag} epitopům.

VLP odvozené od polyomavirů (PyV), které se svou strukturou velmi podobají papillomavirům, jsou také velmi efektivně vázány a internalizovány dendritickými buňkami (Lenz *et al.*, 2001; Bouřa *et al.*, 2005), ale řada studií prokázala, že nejsou schopné DC aktivovat a indukovat jejich maturaci *in vitro* (Lenz *et al.*, 2001; Bouřa *et al.*, 2005). Nicméně *in vivo* experimenty ukazují, že intranasální podání VLP tvořených hlavním kapsidovým proteinem (VP1) myšího polyomaviru vyvolávají silnou humorální i buněčně zprostředkovanou imunitní odpověď, které chrání myš proti polyomavirové infekci (Heidari *et al.*, 2002; Caparrós-Wanderley *et al.*, 2004; Vlastos *et al.*, 2003). Mechanismus ochrany nebyl zatím dostatečně objasněn a bohužel se nepodařilo prokázat ani (cross) prezentaci antigenů odvozených od těchto VLP CD8⁺ T-lymfocytům.

3.6. Využití VLP v terapii

VLP celé řady virů se vyznačují výraznou schopností vyvolat jak buněčně tak protilátkově zprostředkovanou imunitní odpověď. To z nich činí slibné kandidáty pro vývoj ochranných a terapeutických vakcín proti virovým i nádorovým onemocněním.

Například imunizace mladých zdravých žen HPV16-VLP tvořených hlavním strukturním proteinem L1 indukuje produkci velkého množství neutralizačních protilátek a ochraňuje pacienty před infekcí HPV a karcinomem děložního čípku (Koutsky *et al.*, 2002). V druhé fázi pokusů, kdy 220 zdravých žen obdrželo 3 krát 50 μ g HPV16L1-VLP, Pinto a spolupracovníci (2003) testovali charakter imunitní odpovědi. Byl zaznamenán jak vzestup proliferace CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocytů, tak vzestup produkce cytokinů. Ačkoliv bylo prokázáno, že HPV-VLP tvořené pouze L1 nebo oběma strukturními proteiny L1 a L2 ochrání experimentální zvířata před vysokou dávkou HPV (Kirnbauer *et al.*, 1996), je nepravděpodobné, že by mohly být využity při léčbě karcinomu děložního čípku. L1 a L2 jsou totiž produkovány pouze maturovanými keratinocyty během aktivní infekce, nikoliv již nádorově pozměněnými buňkami. Možnost terapie poskytují spíše VLP nesoucí epitopy virových onkoproteinů E6 nebo E7, protože právě tyto epitopy jsou produkovány jak infikovanými, tak nádorovými buňkami a mohou se stát cílem buněčně zprostředkované odpovědi. Greenstone a kolegové (1998) prokázali, že injekce HPV16-E7 VLP může u myši indukovat protinádorovou imunitu zprostředkovanou CTL specifickými pro MHCgp I epitop. Navíc E7 specifická a L1 specifická cytotoxická aktivita proti HPV16 pozitivním buňkám byla pozorována i při *in vitro* experimentech s lidskými buněčnými liniemi (Kaufmann *et al.*, 2001). Tyto experimenty představují další krok kupředu, k možnosti léčení pacientů pozitivních na HPV16.

Existuje také velká potřeba vytvořit vakcínu proti Ebola viru (EBOV). Warfield a kolegové (2003) zkonstruovali EBOV-VLP tvořené povrchovým glykoproteinem (GP) a matrixovým proteinem VP40. Imunizace myši těmito částicemi vedla k aktivaci CD8⁺ a CD4⁺ T-lymfocytů a k produkci Ebola specifických neutralizačních protilátek. Myš byla 100% chráněna před letálním onemocněním EBOV (Warfield *et al.*, 2003). Přesto, že je známo, že EBOV-VLP indukují plnou aktivaci DC (zvýšením exprese povrchových molekul CD40, CD80, CD83, CD86, CCR7 a sekrecí zánět podporujících cytokinů), nebyl

mechanismus ochrany zatím dostatečně objasněn (Bosio *et al.*, 2004). Nicméně jde o velmi slibný systém, který by mohl přinést úspěch i v případě vakcinace lidí proti onemocnění tímto virem.

Storni a kolegové (2004) připravili VLP tvořené HBcAg (core proteinem viru hepatitidy B) s inkorporovanými oligonukleotidy obsahujícími nemetylované CpG motivy. Imunizace myši těmito částicemi, které navíc obsahovaly epitop p33 LCMV (buď jako fúzní protein nebo chemicky připojený) vede k efektivní aktivaci CD8⁺ T-lymfocytů, ochraňuje myš před onemocněním LCMV a omezuje rozvoj p33 pozitivních nádorů. To poskytuje možnost využití HBcAg, ale i dalších typů VLP, pro dopravu nádorově specifických epitopů do dráhy MHCgpI prezentace a vyvolání nádorově specifické CTL odpovědi.

Zde uváděné příklady nejsou zdaleka jedinými. Celá řada VLP, díky charakteru svých interakcí s DC, nabízí do budoucna velmi atraktivní možnosti pro léčení a prevenci mnoha virových onemocnění a s nimi spojených nádorů.

4. Závěr

Dnes je více než jisté, že mechanismus „cross-priming“ (cross-prezentace) má pro organismus velký význam jak v obraně proti intracelulárním parazitům jako jsou viry tak v boji proti zhoubným nádorům. Bez schopnosti APC touto cestou zahájit imunitní odpověď, by imunitnímu rozpoznání unikla celá řada virem infikovaných a nádorově pozměněných buněk. Podrobné studium mechanismu cross-prezentace nám nabízí možnosti, jak tohoto procesu využít v prevenci a v boji proti mnoha onemocněním. V tomto směru hrají důležitou roli uměle vytvořené virům podobné částice (VLP). Jejich význam spočívá především v unikátním charakteru jejich interakcí s APC. To, že byla s použitím VLP vyvinuta účinná vakcína pro prevenci karcinomu děložního čípku, je obrovským krokem kupředu. V budoucnu, možná právě vakcíny založené na VLP, budou představovat účinný způsob boje proti celosvětově nejobávanějším chorobám, jako je HIV nebo Ebola.

5. Seznam použité literatury

Ackerman, A.L., Kyritsis, C., Tampé, R., Cesswell, P. (2003): Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:12889-12894.

Albert, M.L., Pearce, S.F.A., Francisco, L.M., Sauter, B., Roy, P., Silverstein, R.L., Bhardwaj, N. (1998a): Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via $\alpha_v\beta_v$ and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 188:1359-1368.

Albert, M.L., Sauter, B., Bhardwaj, N. (1998b): Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392:86-89

Ardeshna, K.M., Pizzey, A.R., Devereux, S., Khwaja, A. (2000): The IP3 kinase, p28 SAP kinase, and NF- κ B signal transduction pathways are involved in survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 96:1039-1046.

Bachmann, M.F., Oxenius, A., Pircker, H., Harngartver, H., Ashton-Richardt, P.A., Tonegawa, S., Zinkernagel, R.M. (1995): TAP1-independent loading of class I molecules by exogenous viral proteins. *Eur J Immunol* 25; 1739-1743.

Bachmann, M.F., Lutz, M.B., Layton, G.T., Harris, S.J., Fehr, T., Rescigno, M., Ricciardi-Castagnoli, P. (1996): Dendritic cells process exogenous viral proteins and virus-like particles for class I presentation to CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes. *Eur J Immunol* 26:2595-2600.

Barth, H., Ulsenheimer, A., Pape, G.R., Diepolder, H.M., Hoffmann, M., Neumann-Haefelin, C., Thimme, R., Henneke, P., Klein, R., Paranhos-Baccalà, G., Depla, E., Liang, J.T., Blum, H.E., Baumert, T.F. (2005): Uptake and presentation of hepatitis C virus-like particles by human dendritic cells. *Blood* 105:3605-3614.

Bevan, M.J. (1987): Class discrimination in the world of immunology. *Nature* 325:192-194.

Blanchère, N.E., Darnell, B.R., Albert, M.L. (2005): Apoptotic cells deliver processed antigen to dendritic cells for cross-presentation. *PLoS Biol* 3:e185.

Böhm, W., Schirmbeck, R., Elbe, A., Melber, K., Diminky, D., Kraal, G., Rooijen, N., Barenholz, Y., Reimann, J. (1995): Exogenous hepatitis B surface antigen particles processed by dendritic cells or macrophages prime murine MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes in vivo. *J Immunol* 155:3313-3321.

Bosio, C.M., Moore, B.D., Warfield, K.L., Ruthel, G., Mohamad-zadeh, M., Aman, J.M., Bavari, S. (2004): Ebola and Marburg virus-like particles activate human myeloid dendritic cells. *Virology* 326:280-287.

Bouřa, E., Liebl, D., Spířek, R., Frič, J., Marek, M., Štokrová, J., Holáň, V., Forstová, J. (2005): Polyomavirus EGFP-pseudocapsids: Analysis of model particles for introduction of proteins and peptides into mammalian cells. *FEBS Letters* 579:6549-6558.

Caparrós-Wanderley, W., Clark, B., Griffin, B.E. (2004): Effect of dose and long-term storage on the immunogenicity of murine polyomavirus VP1 virus-like particles. *Vaccine* 22:352-361.

Chapman, H.A., Riese, R.J., Shi, G.P. (1997): Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu Rev Physiol* 59:63-88.

Cresswell, P., Ackerman, A.L., Giodini, A., Wearsch, P.A., Peaper, D.R. (2005): Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation. *Immunol Rev* 207:145-157.

Da Silva, D.M., Velders, M.P., Nieland, D.J., Schiller, J.T., Nickoloff, B.J., Kast M.W. (2001): Physical interaction of human papillomavirus virus-like particles with immune cells. *Int Immunol* 13:633-641.

Day, P.M., Esquivel, F., Lukszo, J., Bennink, J.R., Yewdell, J.W. (1995): Effect of TAP on the generation and intracellular trafficking of peptide receptive major histocompatibility complex class I molecules. *Immunity* 2:137-147.

Desjardins, M. (2003): ER-mediated phagocytosis: a new membrane for new functions. *Nat Rev Immunol* 3:280-291.

Eugenin, E.A., Branes, M.C., Berman, J.W., Saez, J.C. (2003): TNF-alpha plus INF-gamma induce connexin 43 expression and formation of gap junctions between human monocytes/macrophages that enhance physiological responses. *J Immunol* 170:1320-1328.

Fausch, S.C., Da Silva, M.D., Rudolf, M.P., Kast, M.W. (2002): Human papillomavirus virus-like particles do not activate Langerhans cells: a possible immune escape mechanism used by human papillomaviruses. *J Immunol* 169:3242-3249.

Fausch, S.C., Da Silva, M.D., Kast, M.W. (2003): Differential uptake and cross-presentation of human papillomavirus virus-like particles by dendritic cells and Langerhans cells. *Cancer Research* 63:3478-3482.

Fausch, S.C., Da Silva, M.D., Kast, M.W. (2005a): Heterologous papillomavirus virus-like particles immune complexes activate human Langerhans cells. *Vaccine* 23:1720-1727.

Fausch, S.C., Fahey, L.M., Da Silva, M.D., Kast, M.W. (2005b): Human papillomavirus can escape immune recognition through Langerhans cell phosphoinositide 3-kinase activation. *J Immunol* 174:7172-7178.

Gagnon, E., Duclos, S., Rondeau, C., Chevet, E., Cameron, P.H., Steele-Mortimer, O., Paiement, J., Bergeron, J.J., Desjardins, M. (2002): Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into phagosomes. *Cell* 110:119-131.

García-Piñeres, A.J., Hildesheim, A., Trivett, M., Williams, M., Wu, L., KewalRamani, N.V., Pinto A.L. (2006): Role of DC-SIGN in the activation of dendritic cells by HPV-16 L1 virus-like particle vaccine. *Eur J Immunol* 36:437-445.

Greenstone, H.L., Nieland, J.D., Visser, K.E., Bruijn, M.L.H., Kirnbauer, R., Roden, R.B.S., Lowy, D.R., Kast, M.W., Schiller, T.J. (1998): Chimeric papillomavirus-like particles elicit antitumor immunity against the E7 oncoprotein in an HPV16 tumor model. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:1800-1805.

Grommé, M., Uytdehaag, F.G.C.M., Janssen, H., Calafat, J., van Binnendijk, R.S., Kenter, M.J.H., Tulp, A., Verwoerd, D., Neefjes, J. (1999): Recycling MHC class I molecules and endosomal peptide loading. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:10326-10331.

Guermónprez, P., Saveanu, L., Kleijmeer, M., Davoust, J., Van Endert, P., Amigorena, S. (2003): ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation in dendritic cells. *Nature* 425:397-402.

Harshyne, L.A., Watkins, S.C., Gambotto, A., Barratt-Boyes, S.M. (2001): Dendritic cells acquire antigens from live cells for cross-presentation to CTL. *J Immunol* 166:3717-3723.

Harshyne, L.A., Zimmer, M.I., Watkins, S.C., Barratt-Boyes, S.M. (2003): A role for class A scavenger receptor in dendritic cell nibbling from live cells. *J Immunol* 170:2302-2309.

Heidari, S., Vlastos, A., Ramqvist, T., Clark, B., Griffin, B.E., Garcia, M.I., Perez, M., Amati, P., Dalianis, T. (2002): Immunization of T-cell deficient mice against polyomavirus infection using viral pseudocapsids or temperature sensitive mutants. *Vaccine* 20:1571-1578.

Houde, M., Bertholet, S., Gagnon, E., Brunet, S., Goyette, G., Laplante, A., Princiotta, M.F., Thibault, P., Sacks, D., Desjardins, M. (2003): Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* 425:402-406.

Hsieh, C.S., deRoos, P., Honey, K., Beers, C., Rudensky, A.Y. (2002): A role for cathepsin L and cathepsin S in peptide generation for MHC class II presentation. *J Immunol* 168:2618-2625.

Huang, A.Y.C., Bruce A.T., Pardoll, D.M., Levitsky, H.I. (1996): In vivo cross-priming of MHC class I-restricted antigens requires the TAP transporter. *Immunity* 4:349-355.

Katso, R., Okkenhaug, K., Ahmadi, K., White, S., Timms, J., Waterfield, M.D. (2001): Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:615-675.

- Kaufmann, A.M., Nieland, J., Schinz, M., Nonn, M., Gabelsberger, J., Meissner, H., Müller, R.T., Jochmus, I., Gissmann, L., Schneider, A., Dürst, M. (2001): HPV16 L1E7 chimeric virus-like particles induce specific HLA-restricted T cells in humans after *in vitro* vaccination. *Int J Cancer* 92:285-293.
- Ke, Y., Kapp, J.A. (1996): Exogenous antigens gain access to major histocompatibility complex class I processing pathway in B cells by receptor-mediated uptake. *J Exp Med* 184:1179-1184.
- Kirnbauer, R., Chandrachud, L., O'Neil, B., Wagner, E., Grindlay, G., Armstrong, A., McGarvie, G., Schiller, J., Lowy, D., Champo, M. (1996): Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Virology* 219:37-43.
- Koutsky, L.A., Ault, K.A., Wheeler, C.M., Brown, D.R., Barr, E., Alvarez, F.B., Chiacchierini, L.M., Jansen, K.U. (2002): A controlled trial of human papillomavirus type 16 vaccine. *N Engl J Med* 347:1645-1651.
- Kovacsovics-Bankowski, M., Rock, K.L. (1995): A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* 267: 243-246.
- Lie, W.R., Myers, N.B., Gorka, J., Rubocki, R.J., Connolly, J.M., Hansen, T.H. (1990): Peptide ligand-induced conformation and surface expression of the Ld class I MHC molecule. *Nature* 344:439-441.
- Lenz, P., Day, P.M., Pang, Y.Y., Frye, S.A., Jensen, N.P., Lowy, R.D., Schiller, T.J. (2001): Papillomavirus-like particles induce acute activation of dendritic cells. *J Immunol* 166:5346.
- Macagno, A., Kuehl, L., de Guili, R., Groettrup, M. (2001): Pronounced up-regulation of the PA28 α/β proteasome regulator but little increase in the steady-state content of immunoproteasome during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* 31:3271-3280.
- May, M.J. and Gosh, S. (1998): Signal transduction through NF- κ B. *Immunol Today* 19:80-88.
- Morón, G.V., Rueda, P., Casal, I., Leclerc, C. (2002): CD8 α ⁻CD11b⁺ dendritic cells present exogenous virus-like particles to CD8⁺ T cells and subsequently express CD α and CD205 molecules. *J Exp Med* 195:1233-1245.
- Morón, G.V., Rueda, P., Sedlik, C., Leclerc, C. (2003): In vivo, dendritic cells can cross-present virus-like particles using an endosome-to-cytosol pathway. *J Immunol* 171:2242-2250.
- Neijssen, J., Herberts, C., Drijfhout, W.J., Reits, E., Janssen, L., Neefjes, J. (2005): Cross-presentation by intracellular peptide transfer through gap junctions. *Nature* 434:83-88.

- Ossendorp, F., Fu, N., Camps, M., Granucci, F., Gobin, S.J.P., van den Elsen, P.J., Schuurhuis, D., Adema, G.J., Lipford, G.B., Chiba, T., Sijts, A., Kloetzel, P.M., Ricciardi-Castagnoli, P., Melief, C.J.M. (2005): Differential expression regulation of the α and β subunits of PA28 proteasom activator in mature dendritic cells. *J Immunol* 174:7815-7822.
- Oviedo-Orta, E., Evans, W.H. (2004): Gap junctions and connexin-mediated communication in the immune system. *Biochem Biophys Acta* 1662:102-112.
- Paliard, X., Liu, Y., Wagner, R., Wolf, H., Baenziger, J., Walker, C.M. (2000): Priming of strong, abroad, and long-lived HIV type 1 p55gag-specific CD8⁺ cytotoxic T cells after administration of a virus-like particle vaccine in rhesus macaques. *AIDS Res Hum Retrovir* 16:273-282.
- Pillay, C.S., Elliott, E., Dennison, C. (2002): Endolysosomal proteolysis and its regulation. *Biochem J* 363:417.
- Pinto, L.A., Edwards, J., Castle, P.E., Harro, C.D., Lowy, D.R., Schiller, J.T., Wallace, D., Kopp, W., Adelsberger, J.W., Baseler, M.W., Berzovsky, J.A., Hildesheim, A. (2003): Cellular immune responses to human papillomavirus (HPV)-16 L1 in healthy volunteers imunized with recombinant HPV-16 L1 virus-like particles. *J Infect Dis* 188:327-338.
- Poegh, H.L. (1998): Viral strategies of immune evasion. *Science* 280:248-253.
- Raposo, G., Nijman, H.W., Stoorvogel, W., Leijendekker, R., Harding, C.V., Melief, J.M., Genze, H.J. (1996): B lymphocytes secrete antigen presenting vesicles. *J Exp Med* 183:1161-1172.
- Reimann, J., Schirmbeck, R. (1999): Alternative pathways for processing exogenous and endogenous antigens that can generate peptides for MHC class I-restricted presentation. *Immunol Rev* 172:131-152.
- Rock, K.L. a Shen, J. (2005): Cross-presentation: underlying mechanism and role in immune surveillance. *Immunol Rev* 207:166-183.
- Rudolf, M.P., Fausch, S.C., Da Silva, D.M., Kast, W.M. (2001): Human dendritic cells are activated by chimeric human papillomavirus type-16 virus-like particles and induce epitope-specific human T cell response in vivo. *J Immunol* 166:5917-5924.
- Ruedl, C., Storni, T., Lechner, F., Bächli, T., Bachmann, M.F. (2002): Cross-presentation of virus-like particles by skin-derived CD8⁻ dendritic cells: a dispensable role for TAP. *Eur J Immunol* 32:818-825.
- Savinov, A.Y., Wong, F.S., Stonebraker, A.C., Chervonski, A.V. (2003): Presentation of antigen by endothelial cells and chemoattraction are required for homing of insulin-specific CD8⁺ T cells. *J Exp Med* 197:643-656.

- Schirmbeck, R., Melber, K., Kuhrober, A., Janowicz, Z.A., Reimann, J. (1994): Immunisation with soluble hepatitis B virus surface protein elicits murine H-2 class I-restricted CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte responses in vivo. *J Immunol* 152:1110-1119.
- Schirmbeck, R., Melber, K., Reimann, J. (1995): Hepatitis B surface particles are processed in a novel endosomal pathway for MHC class I-restricted epitope presentation. *Eur J Immunol* 25:1063-1070.
- Schirmbeck, R., Reimann, J. (1996): Empty I_d molecules capture peptides from endocytosed hepatitis B surface antigen particles for major histocompatibility complex class I-restricted presentation. *Eur J Immunol* 26:2812-2822.
- Sedlik, C., Saron, M., Sarraseca, J., Casal, I., Leclerc, C. (1997): Recombinant parvovirus-like particles as an antigen carrier: a novel nonreplicative exogenous antigen to elicit protective antiviral cytotoxic T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:7503
- Shen, L., Sigal, L.J., Boes, M., Rock, K.L. (2004): Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I cross-presentation in vivo. *Immunity* 21:155-165.
- Shi, G.P., Munger, J.S., Meara, J.P., Rich, D.H., Chapman, H.A. (1992): Molecular cloning and expression of human alveolar macrophage cathepsin S, an elastinolytic cysteine protease. *J Biol Chem* 267:7258-7262.
- Srivastava, P. (2002): Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2:185-194.
- Storni, T., Lechner, F., Erdmann, I., Bächli, T., Jegerlehner, A., Dumrese, T., Kündig, T.M., Ruedl, C., Bachmann, F.M. (2002): Critical role for activation antigen-presenting cells in priming of cytotoxic T cell responses after vaccination with virus-like particles. *J Immunol* 168:2880-2886.
- Storni, T., Ruedl, C., Schwarz, K., Schwendener, R.A., Renner, W.A., Bachmann, M.F. (2004): Nonmethylated CG motifs packaged into virus-like particles induce protective cytotoxic T cell responses in the absence of systemic side effects. *J Immunol* 172:1777-1785.
- Tsunetsugu-Yokota, Y., Morikawa, Y., Isogai, M., Kawana-Tachikawa, A., Odawara, T., Nakamura, T., Grassi, F., Autran, B., Iwamoto, A. (2003): Yeast derived human immunodeficiency virus type 1 p55^{gag} virus-like particles activate dendritic cells (DCs) and induce perforin expression in gag-specific CD8⁺ T cells by cross-presentation of DCs. *J Virology* 77:10250-10259.
- Touret, N., Paroutis, P., Terebiznik, M., Harrison, R.E., Trombetta, S., Pypaert, M., Crow, A., Jiang, A., Shaw, J., Yip, C., Moore, H.P., Well, N., Houben, D., Peters, P.J., de Chastellier, C., Mellman, I., Grinstein, S. (2005): Quantitative and dynamic assessment of the contribution of the ER to phagosome formation. *Cell* 123:157-170.

Vivanco, I., Sawyers, C.L. (2002): The phosphatidylinositol 3-kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2:489-501.

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

Warfield, K.L., Bosio, C.M., Welcher, B.C., Deal, E.M., Mohamadzadeh, M., Schmaljohn, A., Aman, M.J., Bavari, S. (2003): Ebola virus-like particles protect from lethal Ebola virus infection. *Proc Nat Acad Sci USA* 100:15889-15894.

Wolfers, J., Lozier, A., Raposo, G., Regnault, A., Théry, C., Masurier, C., Flament, C., Pouzieux, S., Faure, F., Turss, T., Angevin, E., Amigorena, S., Zitvogel, L. (2001): Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med* 7:297-303.

Yan, M., Peng, J., Jabbar, I.A., Liu, X., Filgueira, L., Frazer, I.H., Thomas, R. (2004): Despite differences between dendritic cells and Langerhans cells in the mechanism of papillomavirus-like particle antigen uptake, both cells cross-prime T cells. *Virology* 324:297-310.

York, I.A., Rock, K.L (1996): Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol* 14:369-396.

Zitvogel, L., et al. (1998): Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nature Med* 4:594-600.