

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Posílení účinku DNA vakcíny proti karcinomu
děložního hrdla pomocnými epitopy**

Lucie Peřinová
Školitel: RNDr. Michal Šmahel, Ph.D.
Praha 2010

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala sama za použití uvedené literatury a na základě konzultací se svým školitelem.

.....

Obsah

Abstrakt	4
Klíčová slova	4
Abstract	4
Key words	4
Seznam zkratk.....	5
Úvod	6
Vakcinace proti lidskému papillomaviru	7
DNA vakcíny proti onkoproteinu E7 HPV16	8
Modelování spolupráce buněk při aktivaci CTL v aktivační kaskádě odpovědi imunitního systému....	10
Epitopy na onkoproteinu E7.....	12
Pan HLA-DR reactive epitope, PADRE.....	14
LAMP-1, nasměrování do dráhy MHC gp II	17
Vliv interleukinu 2	18
Hybrid epitop-li-Key	20
Závěr	23
Seznam použité literatury	25

Abstrakt

Původci rakoviny děložního hrdla jsou viry ze skupiny lidských papillomavirů (HPV). Na transformaci infikované buňky v buňku nádorovou se nejvíce podílejí jejich onkoproteiny E6 a E7, a proto se právě na ně zaměřuje vývoj terapeutických DNA vakcín. Pro posílení jejich účinnosti se pracuje na definování pomocných epitopů aktivujících CD4+ T buňky, které se podílejí na navýšení počtu efektorových cytotoxických T lymfocytů a tedy i eliminaci nádoru. Pro celkové posílení imunitní odpovědi se již využívají epitopy pocházející přímo z onkoproteinů, syntetické epitopy, případně bakteriální epitopy nespecificky aktivující imunitní reakce. Prozatím nebylo provedeno dostatečné množství srovnávacích prací, které by určily jednoznačně nejefektivnější pomocné epitopy. Vývoj se spíše ubírá směrem ke kombinaci více variant za využití imunostimulačních molekul.

Klíčová slova

HPV16, onkoprotein E7, DNA vakcína, pomocné T lymfocyty, Th, cytotoxické T lymfocyty, CTL, pomocný epitop, PADRE, li-Key, bakteriální epitop

Abstract

The human papillomaviruses (HPV) are the etiological agent of cervical cancer. Their oncoproteins E6 and E7 are involved in the transformation of an infected cell into a neoplastic cell, thereby they are the target antigens for the development of DNA vaccines. Helper epitopes activating CD4+ T cells are under study because they enhance the efficacy of DNA vaccines through increasing the number of cytotoxic T lymphocytes and thereby removal of the tumor. There are already being used epitopes derived directly from oncoproteins, synthetic epitopes or bacterial epitopes for the general enhancement of the immune response. Sufficient number of comparative studies which would establish the exactly most efficient helper epitopes has not been made. The research aims at combining more peptide types using immunostimulatory molecules.

Key words

HPV16, E7 oncoprotein, DNA vaccine, helper T lymphocyte, Th, cytotoxic T lymphocyte, CTL, helper epitope, PADRE, li-Key, bacterial epitope

Seznam zkratek

aa	Amino acid, aminokyselina (aminokyselinový zbytek)
APC	Antigen presenting cell, buňka prezentující antigen
CCL	Chemokin
CD	Cluster of differentiation, diferenciační skupina (povrchové determinanty buněk)
CLIP	Class II-associated invariant chain peptide, peptid invariantního řetězce asociovaný s MHC II
CTL	Cytotoxic T lymphocyte, cytotoxický T lymfocyt
DC	Dendritic cell, dendritická buňka
ER	Endoplazmatické retikulum
gp	Glykoprotein
HLA	Human leukocyte antigen, lidský MHC
HPV	Human papillomavirus, lidský papillomavirus
IFN- γ	Interferon gama
Ii	Invariant chain, invariantní řetězec
IL-2	Interleukin 2
LAMP-1	Lysosome-associated membrane protein 1, membránový protein asociovaný s lysozomy
MHC	Major histocompatibility complex, hlavní histokompatibilní komplex
PADRE	Pan HLA-DR reaktivní epitop
TCR	T cell receptor, receptor T lymfocytu
Th	Helper T lymphocyte, pomocný T lymfocyt
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha, faktor nekrotizující nádory alfa
Treg	Regulatory T lymphocyte, regulační T lymfocyt
VLP	Virus-like particle, částice podobné virům

Úvod

Karcinom děložního hrdla je celosvětově druhým nejčastějším maligním onemocněním vyskytujícím se u žen. Ročně na jeho následky zemře více než čtvrt milionu pacientek (Parkin et al. 2005). Pro vývoj léčebných postupů bylo zcela zásadní, že se podařilo identifikovat původce tohoto onemocnění. Jedná se o viry ze skupiny lidských papillomavirů (HPV), která čítá přes 100 typů, z nichž jsou v nádorech děložního hrdla nejčastěji přítomny HPV16 (v cca 50 %) a HPV18 (cca 15 %) (Bosch et al. 1995).

Studiem genomu a proteomu HPV byly definovány nejvhodnější virové produkty, na které se následně mohla začít soustředit léčba pomocí vakcín. Do povědomí široké veřejnosti již vstoupilo, že proti HPV způsobujícímu rakovinu děložního hrdla byla vyvinuta preventivní vakcína, která se vyznačuje velmi vysokou účinností. Nicméně celosvětově je velká poptávka po vakcíně terapeutické, jelikož 83 % všech případů karcinomu děložního hrdla je diagnostikováno v rozvojových zemích (Parkin et al. 2005), kde je prevence jen těžko uskutečnitelná v širším měřítku.

V současnosti je jedním z nejslibnějších a tedy i nejstudovanějších metodických postupů terapeutické vakcinace imunizace pomocí plazmidové DNA. Tato metoda má mnoho významných předností (viz níže) (Leitner et al. 1999), klinickému využití ale prozatím stojí v cestě její nízká účinnost, a proto se právě zvyšování účinnosti aktuálně věnuje veliká pozornost.

K posílení imunitní odpovědi vyvolané DNA vakcínou směřované proti HPV se vyvíjí různé postupy zahrnující syntetické epitopy (Hung et al. 2007), ale i epitopy pocházející z patogenních organismů, u nichž byla imunogennost potvrzena v předchozím výzkumu (Chen et al. 2000), popřípadě se cíleně využívá stimulačních účinků molekul, např. cytokinů, které se na imunitní odpovědi přirozeně podílejí (Kim et al. 2008).

Bylo vícekrát doloženo, že na úspěšném rozvoji imunitní reakce se významně podílejí pomocné T lymfocyty (Th), které do jisté míry zprostředkovávají, prozatím ne zcela objasněným mechanismem, signál efektorovým cytotoxickým T buňkám (CTL). Proto je zaměření se na Th jedním ze slibných kroků k posílení imunitní odpovědi proti karcinomu děložního hrdla vyvolanému HPV.

Vakcinace proti lidskému papillomaviru

Jak bylo zmíněno v úvodu, proti HPV již byla vyrobena preventivní vakcína, ale ve vývoji je v současnosti i vakcína terapeutická. Rozdíl mezi těmito dvěma typy vakcín proti HPV je v antigenech, na které jsou zacíleny. Úkolem preventivní vakcíny je zasáhnout proti eventuálně do organismu vstoupivšímu viru co nejdříve, v prvopočátku infekce. HPV patří mezi neobalené dsDNA viry, které mají kapsidu tvořenou proteiny, proti nimž jsou preventivní vakcíny směřované. Tyto vakcíny byly vyvinuty jako tzv. *virus-like* partikule (VLP) obsahující povrchový virový protein L1. Jedná se o složku kapsidy a příslušné proteiny jsou syntetizovány až v pozdní fázi životního cyklu viru (písmeno L označující povrchové proteiny má původ v anglickém *late*, pozdní) (Tindle 2002). Při preventivní vakcinaci si tělo proti těmto proteinům vytvoří protilátky, které v případě infekce povrchový L1 ihned rozpoznají a imunitní systém může proti virovým partikulám okamžitě zasáhnout a zabránit tak i jejich vstupu do buněk.

Terapeutickou vakcínou je žádoucí vyvolat ne humorální ale buněčnou (cytotoxickou) odpověď. CTL totiž zasahují proti již infikovaným buňkám a jsou schopné je eliminovat. Jelikož se virus při vývoji nádoru integruje do buněčného genomu (Peitsaro et al. 2002), nemá potřebu proteiny kapsidy syntetizovat (dokud se neblíží do fáze lytického cyklu). Oproti tomu ale během své přítomnosti v buňkách exprimuje geny E1 – E7 (E ~ *early*, časný), které jsou z většiny pro jeho přežívání nezbytné (Lin et al. 2010) a jsou tak potenciálními cílovými antigeny imunitní odpovědi. Za vhodné antigeny k terapeutické vakcinaci jsou všeobecně považovány takové, které:

- jsou exprimovány konstitutivně, tedy jsou v infikovaných buňkách permanentně přítomné;
- jsou pro virus/infikovanou buňku specifické, takže nasměrování imunitní reakce proti nim není spojeno s rizikem autoimunitního napadení organismu;
- hrají významnou roli v patogenitě a životním cyklu daného viru, který je tak ze strategických důvodů nemůže přestat produkovat (Lin et al. 2010).

Všechny tyto předpoklady u HPV velmi dobře splňují onkoproteiny E6 a E7, které mají v životní strategii viru zcela klíčový význam (Tindle 2002). Jejich působením jsou v infikované buňce inhibovány mechanismy apoptózy, indukuje se zvýšení chromozomální nestability a stimuluje se buněčná proliferace, v důsledku čehož dochází k immortalizaci buňky a ztrátě

schopnosti kontrolovaného růstu a to v součtu vede k transformaci buňky v buňku nádorovou (zur Hausen 2002). Z vakcinačních strategií se budeme věnovat především DNA vakcínám, jejichž použití v budoucích klinických postupech se, jak bylo řečeno, teprve obhazuje, ale již teď je známo, že skýtají velké možnosti.

DNA vakcíny proti onkoproteinu E7 HPV16

Myšlenka vakcinace pomocí plazmidové/nahé DNA spočívá v tom, že se z DNA kódující antigen po vpravení do buněk imunizovaného organismu tento protein exprimuje, je prezentován na povrchu zasažených buněk, tělo se jej naučí rozpoznávat jako cizí a začne specificky napadat všechny buňky, které jej produkují, tedy i buňky infikované/nádorové. Je zde důležité podotknout, že jedním ze základních předpokladů pro zacílení DNA vakcín na E7 z HPV16 (a onkoproteiny vůbec) a jejich využití v klinické praxi je, že genu použitému ve vakcíně musí být zamezeno v onkogenosti či schopnosti transformovat buňky. Toho se zároveň musí dosáhnout co nejmenšími modifikacemi, aby byly zachovány pokud možno všechny přirozené epitopy, které výkonné buňky imunitního systému přirozeně rozeznávají (Ohlschlager et al. 2006).

Jako hlavní výhody DNA vakcín bývají uváděny jejich bezpečnost nebo možnost opakovaného podání (oproti např. virovým vektorům, kde mohou být vyvolány imunitní reakce proti vektorovým partikulím). Pomocí DNA vakcín se dá též dosáhnout dlouhodobé exprese kódovaných proteinů. Nesporné výhody spočívají také v jejich poměrně nenáročné výrobě, stabilitě, snadné přípravě velkého množství vysoce čisté vakcinační DNA a samozřejmě jsou podstatné poměrně nízké náklady na jejich produkci, transport i uskladnění (Leitner et al. 1999; Smahel 2002).

Prozatím hlavní překážkou v uplatnění DNA vakcín je jejich nízká účinnost, ač je snaha její maximalizace dosáhnout již od počátku vlastního vývojového procesu, tedy při navrhování vakcinační DNA. Například se dbá na optimalizaci použitých kodónů jednotlivých aminokyselin, jelikož papillomaviry využívají některé kodóny v odlišné frekvenci než savčí buňky (Zhou et al. 1999). Jelikož je plazmidová DNA určená k vakcinaci produkována a následně izolována z bakterií, obsahuje nemethylované CpG motivy, které mají všeobecně pozitivní imunogenní účinek a nespécificky tak podporují vybuzení imunitní odpovědi (Klinman et al. 1997; Li et al. 2001; Smahel 2002). Pro klinické studie a pozdější terapeutické

využití je ale nutné i těmito primárními modifikacemi navýšenou účinnost DNA vakcín dále výrazně posílit. V hojné míře se proto vědecké skupiny zabývají výzkumem nejrůznějších druhů adjuvans, kterými by se účinek DNA vakcinace podpořil. Na posloupnosti působení DNA vakcíny, projevu jejího účinku a cestě, kterou signál o přítomnosti exprimovaného antigenu musí urazit, než dojde k vyvolání imunitní odpovědi, existuje více možností, na které se adjuvans zaměřují.

Pro vyvolání účinné specifické imunitní odpovědi je třeba, aby došlo k postupnému předání signálu od antigen prezentujících buněk (APC) pomocným a výkonným T lymfocytům. Nejčastěji bývají adjuvans protinádorových DNA vakcín směřovány na tyto strategické body (Lin et al. 2010):

- A. prodloužení životnosti APC, které mohou déle aktivovat specifické T lymfocyty,
- B. posílení prezentace pomocí MHC gp I (na nádorových buňkách, APC) a MHC gp II (APC),
- C. posílení množství aktivovaných Th buněk,
- D. posílení imunitní odpovědi/množství aktivovaných CTL,
- E. navýšení počtu paměťových buněk,
- F. eliminace Treg z nádoru.

Pro aplikaci DNA vakcín se jako jedna z nejúčinnějších metod jeví použití tzv. genové pistole (Porgador et al. 1998; Best et al. 2009). Plazmidová DNA se nejčastěji adsorbuje na zlaté částice, které se pod tlakem helia vstřelí do kůže, kde proniknou do buněk. Jelikož je kůže osídlena množstvím APC (Langerhansovy buňky), s velkou pravděpodobností vstoupí DNA právě do nich (do jader). Tyto dendritické buňky (DC) jsou schopny prezentovat peptidové fragmenty na svém povrchu v komplexu s dvěma odlišnými typy molekul. Primárně endogenní peptidy, vzniklé štěpením v proteazómu (Obr. 2, levá část), jsou vystavovány na molekulách MHC gp I (ty jsou přítomny i na všech somatických buňkách). Proteiny, které DC pohltní ze svého okolí, postupují endozomálně-lysozomální dráhou (Obr. 2, vpravo) a po rozštěpení jsou prezentovány na MHC gp II (pouze na APC). Existuje ale i možnost, kdy je pozřený peptid transportován z lysozómu do endoplazmatického retikula (ER), kde je vázán do komplexu s MHC gp I (tzv. *cross-priming*, zkřížená prezentace).

Předpokládá se, že aktivace výkonných buněk (CTL) DNA vakcínou je vedena přes přímou prezentaci peptidů na MHC gp I (DNA vstoupila přímo do DC a kódované proteiny jsou prezentovány jako endogenní), zatímco u proteinových vakcín se na aktivaci podílí

víceméně výhradně mechanismus zkřížené prezentace (DC pozřely proteiny vakcíny ze svého okolí a ty po úniku z fagozómu podstoupily cestu prezentace na MHC gp I) (Porgador et al. 1998). Zkřížená prezentace se ale pravděpodobně významně uplatňuje i při DNA vakcinaci, jelikož při imunizaci genovou pistolí jsou zasaženy kromě DC v hojné míře i okolní keratinocyty, které mohou kódované peptidy uvolňovat do svého okolí, odkud jsou dendritickými buňkami vycytávány (Chen et al. 2000). Imunizace DNA vakcínou tedy může vést k tomu, že DC prezentují epitopy pocházející z vakcínou kódovaného proteinu jak na MHC gp I (vlastní syntéza antigenu + zkřížená prezentace), tak i na MHC gp II (pohlčený antigen z okolí).

Modelování spolupráce buněk při aktivaci CTL v aktivační kaskádě odpovědi imunitního systému

Cytotoxické T lymfocyty jsou hlavními výkonnými buňkami v imunitní odpovědi proti virově infikovaným a nádorovým buňkám. Cílem vakcinace je proto specificky aktivovat co největší počet těchto buněk. Jelikož ale CTL stojí až na konci procesu aktivační kaskády imunitní odpovědi, je žádoucí posílit již kroky předešlé, čímž se celková imunitní reakce násobí. Zároveň však dosud nebyl jednoznačně definován mechanismus, kterým se signál z APC na CTL transdukuje, resp. jakou úlohu v něm hrají pomocné Th lymfocyty.

Signály o tom, že se CD4⁺ T buňky na aktivaci efektorových CD8⁺ T lymfocytů podílejí, již byly popsány mnohokrát, nicméně existuje více různě pravděpodobných modelů skutečné úlohy Th buněk na tomto procesu (Obr. 1) (Castellino and Germain 2006).

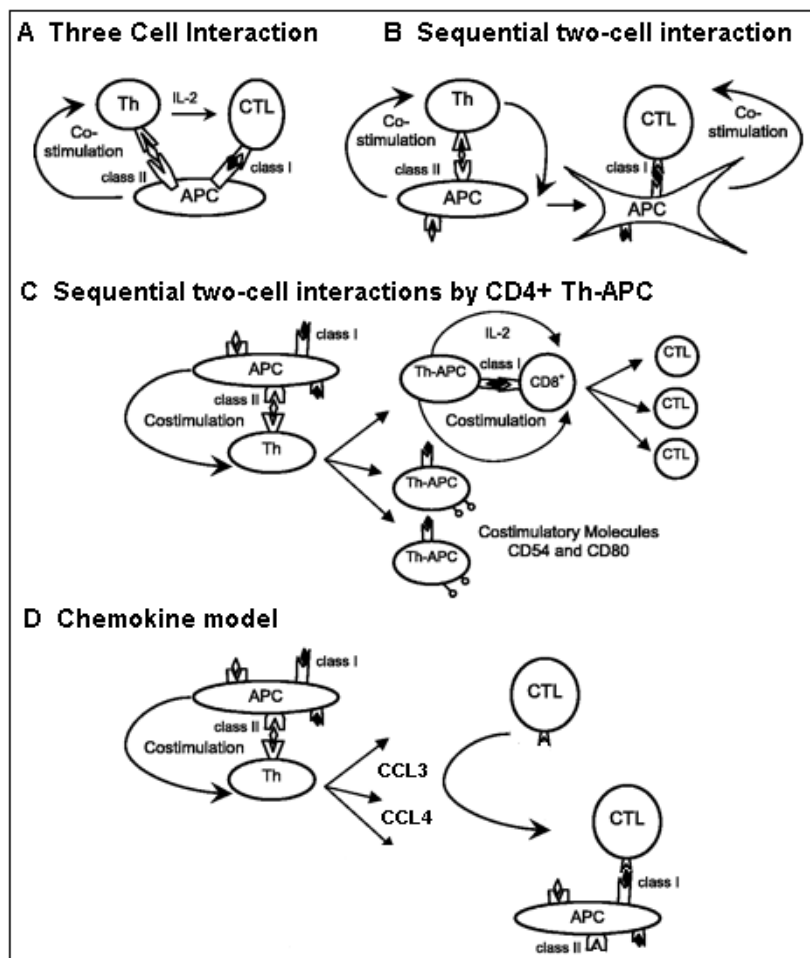
První modelovou hypotézu (model A, M.A) experimentálně potvrzují Keene a Forman (1982). Dle ní k účinné aktivaci CTL musí být na jedné APC kromě CTL-specifického antigenu ve vazbě na MHC gp I současně přítomná „pomocná determinanta“ (Obr. 1A). Aby se tak stalo, má být organismus imunizován oběma potřebnými antigeny ve stejném místě. Současně je zde dodáván třetí signál v podobě stimulačního cytokinu interleukinu 2 (IL-2), sekretovaného pomocnými T lymfocyty, které rozeznaly onu „determinantu“. IL-2 se tedy také významně podílí na aktivaci efektorové funkce CTL.

K první teorii se později přiklání i další (Bennett et al. 1997), kteří ale již částečně formulují další posilující funkci CD4⁺ T buněk v transdukcii signálu. Na obr. 1B je sekvenčním modelem (M.B) popsán předpoklad, jak jej následně v roce 1998 definovali Paul Ridge,

Francesca Di Rosa a Polly Matzinger, že Th nejprve interakcí (CD40/CD40L) stimuluje dendritickou buňku, která pak dovede bez současné přítomnosti Th sama aktivovat CTL (Ridge et al. 1998). Elegantně se tak řeší ne snadno představitelná situace původního modelu, že se poměrně vzácný naivní antigenně specifický CTL setká v tu samou chvíli u té samé DC se zrovna tak ojedinělým antigenně specifickým Th.

Novější dynamický model (M.C) následně přichází s velmi zajímavou hypotézou dokumentovanou více studiemi, a sice že Th buňka je schopná během interakce s APC od ní přebrat některé povrchové kostimulační a prezentační molekuly a sama pak dokáže fungovat jako APC (Th-APC), tedy i samostatně stimulovat diferenciaci naivních CTL v efektorové (Obr. 1C) (Xiang et al. 2005).

Ještě nověji byl pak predikován model (M.D, Obr. 1D), v němž hrají CD4+ T buňky roli producenta chemokinových atraktantů (CCL3, CCL4). V CD4+ lymfocytu se interakcí s APC indukuje sekrece těchto rozpustných molekul, které do místa imunologické synapse v lymfatické uzlině svým gradientem přivábí naivní CD8+ T buňky. Tyto mohou následně rozeznat antigen na té samé APC, se kterou pomocný T lymfocyt interagoval (Castellino et al. 2006). Tento model upravuje a činí snáze představitelným nejpůvodnější předpoklad (Obr. 1A), že antigenně specifické T buňky, CD4+ a CD8+, jsou v uzlině schopné nalézt shodnou dendritickou buňku.



Obr. 1 Čtyři základní modely přenosu signálu od CD4+ k CD8+ buňkám (Xiang, J., Huang, H., and Liu, Y. Q. A new dynamic model of CD8(+) T effector cell responses via CD4(+) T helper-antigen-presenting cells. *Journal of Immunology* (2005) 174(12):7497-7505; doplněno, upraveno)

Všechny čtyři modely tedy klíčovou funkci v transdukci aktivačního signálu CD4+ T lymfocytům přiřítají. To, který skutečnost popisuje nejlépe, nebo jaký další přibude, se ukáže nejspíše až v budoucnu. Již v současnosti se ale obrací zájem právě směrem k definování epitopů specificky aktivujících CD4+ buňky a skrze ně posilujících imunitní odpověď.

Epitopy na onkoproteínu E7

Po odhalení úzkého vztahu mezi karcinomem děložního hrdla a lidskými papillomaviry byla v průběhu následujících let věnována velká pozornost výzkumu genomu HPV16 a charakterizaci jeho proteomu. Po identifikaci jednotlivých genů, resp. proteinů, bylo další studium zaměřeno i na vyhledávání specifických epitopů obsažených v molekulách E6 a

E7, které byly popsány jako antigeny vhodné pro zacílení vakcín (viz výše). Byly vyhledávány peptidové epitopy potenciálně specificky interagující s molekulami MHC gp I a II, které by aktivovaly specifickou CTL a Th1 imunitní odpověď.

V roce 1991 byly dvěma různými skupinami identifikovány epitopy pocházející z onkoproteinu E7 HPV16, které aktivovaly specifickou produkci protilátek. Kromě toho nezávisle na sobě popsaly jen několika aa se lišící Th epitop (Comerford et al. 1991; Tindle et al. 1991). O rok později bylo identifikováno několik dalších syntetických peptidů navržených dle sekvence E7 proteinu, které aktivovaly diferenciaci jak CD4+ tak i CD8+ T buněk (Altmann et al. 1992) Následně byl popsán ještě další Th peptid vykazující opět jistou míru překryvu s již definovanými (Vandebriel et al. 1995).

Současně s tímto výzkumem epitopů specificky vázajících a aktivujících lymfocyty byly publikovány výsledky studie ukazující úzký vztah mezi některými alelickými formami lidského MHC gp II a výskytem nádoru děložního hrdla (Wank and Thomssen 1991). U žen s cervikálním karcinomem byl výskyt alely HLA-DQw3 výrazně vyšší (88 %) než v průměrné populaci (40–50 %) a relativní riziko pro vývoj karcinomu bylo u této alelické formy stanoveno na 7,1. Dalo by se říci, že vedlejším produktem práce bylo zjištění, že alela HLA-DR6 vykazuje naopak výrazně nižší náchylnost k rozvoji tohoto maligního onemocnění (negativní relativní riziko 12,7).

Za syntézy těchto dvou typů poznatků se mohl výzkum dále orientovat směrem ke specifikaci peptidových epitopů z E7 HPV16 k lidským MHC gp I a II molekulám. Stále na tomto poli přibývá nově definovaných vazebných dvojic peptid–HLA molekula(y), např. Oerke et al. (2005). Podobně byl identifikován i další epitop z onkoproteinu E7 (aa71-85) specifický k alele HLA-DQB1*02 (Peng et al. 2007), jenž byl schopen vyvolat produkci specifických CD4+ T lymfocytů. U skupiny pacientek s touto alelou byla popsána schopnost spontánní regrese předstupně cervikálního karcinomu (cca v 30 % případů). Tato skupina vykazovala v porovnání s pacientkami, u kterých k regresi nedošlo, signifikantně vyšší počet CD4+ T buněk vykazujících afinitu k alele HLA-DQB1*02. Cytokinovou analýzou těchto specifických CD4+ T buněk byl prokázán jejich Th1 fenotyp – kromě IFN- γ produkovaly i TNF- α a IL-2. IL-2 (viz níže) je jedním z nejdůležitějších cytokinů podílejících se na stimulaci CTL odpovědi Th1 buňkami (tedy v souladu s modely M.A a M.C). Vyšší počet CD4+ T buněk produkuje souhrnně více IL-2 a může být aktivováno větší množství CD8+ T lymfocytů.

Na této studii (Peng et al. 2007) je obzvláště podstatné zjištění, že onen nově popsaný epitop (aa71-85) vzniká endogenně, je APC přirozeně vyštěpen z proteinu E7 a vystaven na povrchu v komplexu s MHC gp II. Může tedy být běžně přítomen na DC, které pozřely onkoprotein E7 z HPV16+ buněk, a tělo proti němu může vyvinout Th1 lymfocyty dále aktivující CTL – to by korelovalo s regresí premaligních lézí u oněch 30 % pacientek. V ostatních pracích byly studovány syntetické peptidy, u kterých nebylo potvrzeno, že by takto vznikaly a byly prezentovány i v přirozeném/živém systému.

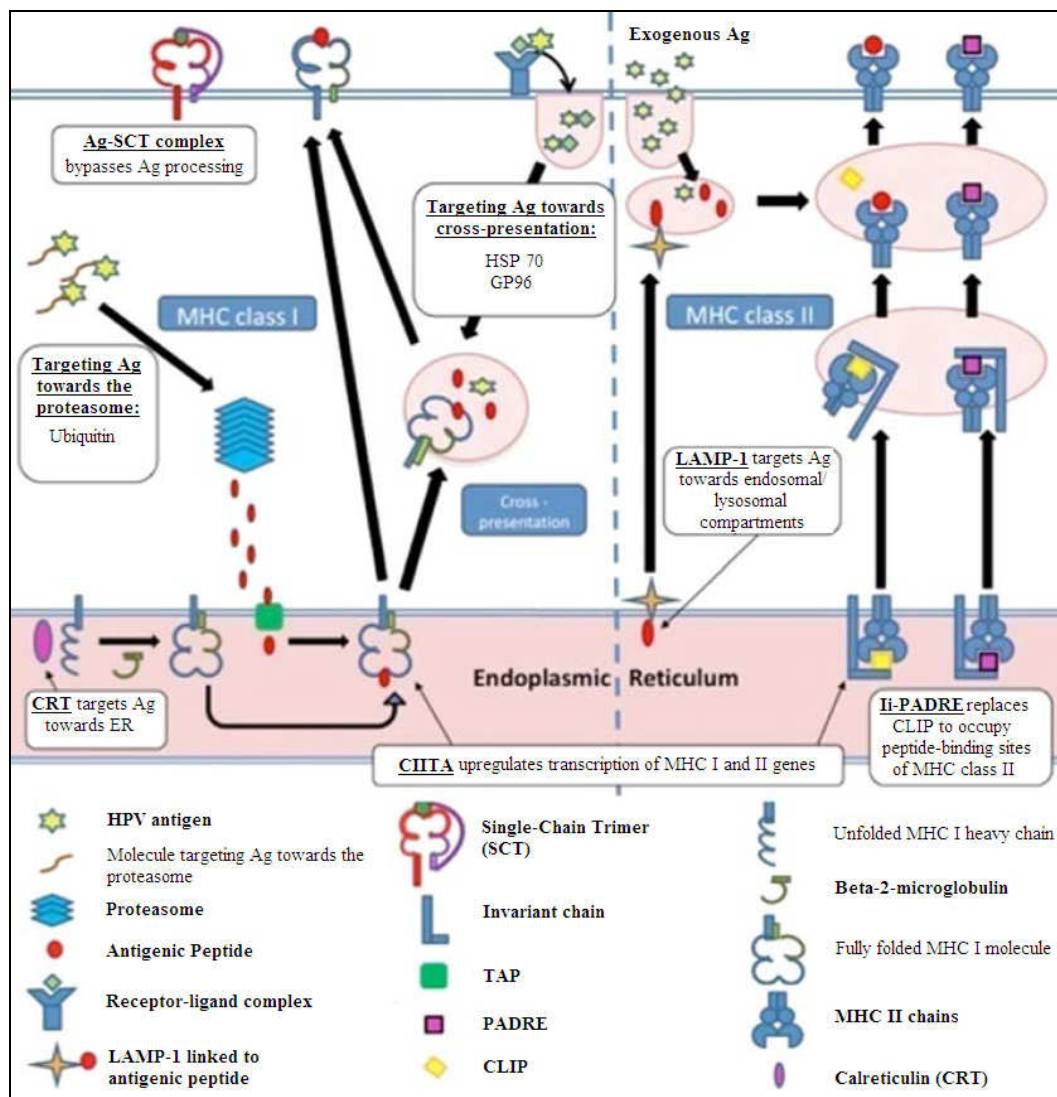
Ač byly definovány jednotlivé dvojice peptidů a alel MHC gp II vykazujících vůči sobě různě silnou afinitu, je zde stále vyvíjen tlak na formulaci co nejobecnějších a nejvšestrannějších epitopů posilujících imunitní odpověď tak, aby se daly používat u všech pacientek bez předchozích genetických analýz. Takový přínos by již mohl být ekonomicky zajímavější pro skutečné terapeutické využití aktuálně nejžádanější v zemích třetího světa, kde je profylaktická vakcinace prakticky nemožná.

Pan HLA-DR reactive epitope, PADRE

Pomocné T lymfocyty rozpoznávají svými T receptory (TCR) antigeny prezentované na DC a jiných APC v komplexu s MHC gp II. Alexander et al. (1994) poprvé naformulovali peptid schopný vazby na různé alely HLA-DR, přičemž k těmto komplexům pak vykazují TCR zvýšenou afinitu. Tato molekula PADRE (*Pan HLA-DR reactive epitope*) tak významně posiluje aktivaci T lymfocytů.

S využitím tohoto syntetického peptidu bylo následně dosaženo poměrně zajímavých výsledků. Skupina kolem profesora T-C Wu z americké Johns Hopkins University zabývající se právě výzkumem DNA vakcín proti nádorům spojeným s infekcí HPV16 peptid PADRE provázala s molekulou invariantního (Ii) řetězce. Ii-řetězec se v ER váže na nascentní MHC gp II, přičemž sekvence Ii-řetězce zvaná CLIP je poutána do vazebného místa MHC molekuly (Obr. 2, vpravo), čímž brání vazbě endogenních peptidů. V Ii-řetězci zaměnila skupina profesora Wu aminokyselinovou oblast tvořící CLIP právě za molekulu PADRE. Takto modifikovaný invariantní řetězec (Ii-PADRE) následuje po transkripci z DNA vakcíny stejnou cestu jako běžný Ii-řetězec, je tedy kotranslačně transportován do ER, kde se váže do komplexu s MHC gp II. Ve váčku odpoutaném od ER a postupujícím směrem k cytoplazmatické membráně je následně Ii-PADRE rozštěpen aktivovanými proteázami a

v komplexu s MHC gp II zůstává pouze peptid PADRE (Obr. 2, zcela vpravo). MHC gp II s PADRE je následně transportován na membránu a zde vystaven.



Obr. 2: Strategie posílení zpracování a prezentace antigenu pomocí MHC gp I a MHC gp II (převzato z: Lin, K., Roosinovich, E., Ma, B., et al. Therapeutic HPV DNA vaccines. *Immunologic Research* (2010) doi 10.1007/s12026-009-8141-6; upraveno)

Po imunizaci organismu DNA vakcínou kódující tuto kombinovanou molekulu li-PADRE došlo ke zvýšení počtu PADRE-specifických CD4+ T buněk. Ve studii C-F Hung et al. bylo dále zjištěno, že vložený peptid PADRE do li-řetězce je v indukci antigen-specifických CD4+ T buněk výrazně účinnější, než je-li na samostatný PADRE napojena sekvence LAMP-1 (Obr. 2, levá část obrázku) směřující jej do lysozómu (Hung et al. 2007). Jak bylo prokázáno (viz níže), LAMP-1 zvyšuje prezentaci fúzovaného antigenu na MHC gp II. Ale právě zde se velmi dobře projevuje význam základní myšlenky záměny CLIP v sekvenci li-řetězce za peptid PADRE aktivující PADRE-specifické CD4+ T lymfocyty. Dopravit antigen do lysozómu

jednoznačně není nejpotřebnější krok k výraznému posílení jeho expozice na povrchu buňky v komplexu s MHC gp II. Možná, že usazení peptidu do vazebného místa molekuly MHC gp II již během cesty z ER směrem k membráně, jak se děje, když je součástí li-řetězce, může mít jistý vliv na pevnost vazby nebo i na množství navázaných peptidů do komplexu s MHC gp II. Ve studii využívající jiný mechanismus vsazení peptidu do vazebného místa MHC gp II je prezentovaný antigen napojen na li-Key molekulu (viz níže), která se váže na alosterické místo MHC gp II (Obr. 3), což má dle autorů indukovat konformační změnu MHC molekuly a zvýšit tak přístupnost vazebného místa pro interakci s antigenem (Xu et al. 2009). Během interakce li-PADRE s MHC molekulou nejspíše také dochází k jistému ovlivnění konformace MHC gp II, která by do vazebného místa vložený peptid fixuje jinak, než když se setká (např. pozřený) peptid v rozpustné formě s MHC molekulou až v endolysozómu.

Podání li-PADRE DNA vakcíny může nespecificky posílit aktivaci antigen-specifických CD8+ T lymfocytů. Byla-li CRT-E7¹ DNA (plazmidová DNA kódující onkoprotein E7 HPV16 fúzovaný s kalretikulinem) doplněna o li-PADRE DNA, bylo pozorováno nejen zvýšení počtu PADRE-specifických CD4+ buněk, ale právě i E7-specifických CD8+ T lymfocytů. Použil-li se k CRT-E7 DNA vakcíně jako adjuvans pouze PADRE peptid (injekčně, subkutánně), nedošlo k téměř žádnému navýšení E7-specifických CD8+ buněk (Hung et al. 2007). Tyto výsledky jsou nejen potvrzením, že vytvoření modifikovaného li-řetězce s PADRE peptidem představuje velmi dobré využití a vylepšení původního samostatného Pan HLA-DR reaktivního epitopu, ale též nás vrací k otázce, jak se CD4+ buňky podílí na převodu aktivačního signálu směrem od DC až k antigenně specifickým CTL.

Každá z T buněk (Th, CTL) vykazuje jinou specifitu (PADRE-specifické CD4+, E7-specifické CD8+ lymfocyty), přesto může ve výše zmíněném experimentu docházet k situaci, kterou popisují první a čtvrtý model (Obr. 1A a 1D), tedy ke stimulaci obou T lymfocytů jedinou APC, jelikož při imunizaci genovou pistolí může být jediná DC zasažena oběma plazmidy (pokud byly vpravovány plazmidy ve směsi, tedy současně, což není v článku explicitně řečeno). V experimentech ale nebylo studováno cytokinové prostředí v místě transdukce signálu mezi jednotlivými buňkami, nelze se tedy jednoznačně přiklonit

¹ Fúzí proteinu E7 s molekulou kalretikulinu dochází k nasměřování E7/epitopu do endoplazmatického retikula, posílení prezentace na MHC gp I a následně i navýšení počtu E7-specifických CD8+ T lymfocytů (Kim, J. W., Hung, C. F., Juang, J., et al. Comparison of HPV DNA vaccines employing intracellular targeting strategies. *Gene Therapy* (2004) 11(12):1011-1018.

k jedinému z modelů. Ze studie se také nedá usoudit, v jakém časovém rozmezí k aktivaci jednotlivých typů T lymfocytů docházelo, tedy byla-li přítomnost APC nutná i ve chvíli předání signálu naivnímu CTL (jak by vyžadovaly modely M.A, M.B, M.D) nebo nebyla. Mechanismus Th-APC (M.C) by se mohl odehrávat i za delšího časového rozestupu aktivace CD4+ a CD8+ buněk, jelikož k druhé fázi transdukce aktivačního signálu v něm DC s relativně kratší životností (Xiang et al. 2005) nejsou vyžadovány.

Na problematice týkající se li-PADRE, tedy epitopu aktivujícího Th, je poměrně zajímavá skutečnost, že ač PADRE nahrazuje v invariantním řetězci oblast CLIP a jako takový shodně po štěpení proteázami zůstává vázán na příslušném MHC gp II, není PADRE následně vyměněn za peptid z lumen endolysosomálního váčku, jak se děje s CLIP. Ze všeho nejvíc to nahrává představě o výraznější afinitě PADRE k MHC gp II (HLA-DR) než má CLIP, jelikož za tím účelem byl i epitop PADRE navržený. Zde by se tedy nabízela možnost identifikace a přípravy obdobných peptidů specifických pro další formy molekul MHC gp II. Problematický u nich ovšem je pověstný extrémní alelický polymorfismus, bylo by tedy obtížné nadefinovat alespoň do jisté míry univerzálnější peptidové struktury. (Nejspíš ne nadarmo byla molekula PADRE vytvořena právě specificky k HLA-DR, jehož α -řetězec tento polymorfismus nevykazuje a je znám pouze v jedné alelické formě, což může činit vazebné místo MHC gp II predikovatelnějším.)

LAMP-1, nasměrování do dráhy MHC gp II

Na pomezí přímého posílení aktivace Th lymfocytů a posílení prezentace antigenů na MHC molekulách stojí nasměrování CD4-specifického epitopu do lysosómu. Primárně je tedy posílena prezentace epitopů na MHC gp II, což ale generuje více příležitostí pro interakci s Th buňkami. V přímé kombinaci s DNA vakcinací proti nádorům způsobeným HPV16 byla studována molekula LAMP-1. Jak již bylo řečeno, jedná se o molekulu, která je schopná nasměrovat s ní fúzovaný protein do endozomálně-lysosomální dráhy (viz. Obr. 2) a posílit tak prezentaci peptidů vzniklých z fúzního proteinu na MHC gp II. Jedná se tedy primárně o metodu navyšující počet aktivovaných CD4+ T lymfocytů, nikoli CD8+, ale i na ně má v konečném efektu zřejmý posilující vliv (Kim et al. 2004; Lin et al. 2010). Nicméně jak bylo uvedeno výše, napojení Th epitopu typu PADRE na li-řetězec vykazuje vyšší účinnost v aktivaci jak CD4+, tak i CD8+ T buněk (Hung et al. 2007). Molekula LAMP-1 si ale svůj

nesporný význam obhájí, jelikož oproti li-fúzním peptidům je schopná posílit prezentaci většího počtu epitopů, protože protein s ní provázaný se nemusí omezovat na krátké sekvence a může po rozštěpení poskytnout více peptidů afinitních k MHC gp II.

Vliv interleukinu 2

Po interakci TCR Th buňky s komplexem peptidu navázaného na MHC gp II musí být do okolí vyslán takový signál, který prozatím naivní CD8+ T lymfocyt stimuluje k diferenciaci na zralý efektorový CTL. Aktivace CTL jsou schopné pouze pomocné lymfocyty vykazující Th1 fenotyp (nikoli Th2). To, že se na vlastním signálu významně podílí IL-2, je známo již delší dobu. IL-2 působí především jako hlavní autokrinní růstový faktor během diferenciaci Th1 buněk, je ovšem využíván i diferencujícími se CTL, pro které je silně stimulační. Jak bylo prokázáno, pozitivní působení IL-2 se projevuje pouze v měřítku nejbližšího okolí (Kim et al. 2008), tedy je schopen fungovat jako parakrinní cytokin.

V souvislosti s funkcí IL-2 byl opět studován vliv PADRE-specifických Th buněk na vývoj E7-specifických CD8+ T lymfocytů (Kim et al. 2008). Autoři studie ukazují, že pro úspěšné navýšení počtu CD8+ T buněk vykazujících afinitu k epitopu na onkoproteinu E7 dodaném pomocí DNA vakcíny, je nezbytná aplikace plazmidové DNA kódující li-PADRE ve shodném místě jako E7 DNA. Při podání každé z vakcín do místa na opačné straně těla, nebyl nárůst E7-specifických CTL tak vysoký (na počet PADRE-specifických CD4+ T buněk přitom neměla různá lokalizace vakcíny vliv). To potvrzuje základní předpoklad mechanismu, kterým ke stimulaci CD4+ i CD8+ lymfocytů dochází: DC po interakci s antigeny doputují do lymfatických uzlin orientovaných po spádu lymfatických cév od místa podání, kde se setkají s dalšími buňkami imunitního systému a jsou jim k dispozici pro jejich aktivaci. Při podání jednotlivých vakcín do protilehlých míst doputují DC obsahující antigeny do různých uzlin, kde v jedné dojde k aktivaci CD4+ PADRE-specifických T buněk a v protilehlé se eventuelně vyvinou CD8+ E7-specifické lymfocyty (ale pouze ve výrazně nižším množství než při současném podání vakcín na stejném místě). Nárůst počtu CD4+ v protilehlé uzlině nedokáže na dálku pozitivně ovlivňovat CD8+ lymfocyty, nedochází proto k tak výraznému zvýšení jejich počtů. To naznačuje, že se na aktivaci CTL Th buňky skutečně podílí buď přímým kontaktem nebo jinou formou výrazně lokálního působení.

Účast IL-2 na posílení odpovědi E7-specifických CD8+ T buněk PADRE-specifickými Th lymfocyty byla ověřena použitím IL-2-specifické neutralizační monoklonální protilátky. Po vyvázání IL-2 z konstelace [PADRE-DC, PADRE-specifické CD4+ buňky, E7-specifické CD8+ buňky] došlo k vymazání posilujícího efektu CD4+ T buněk na CTL.

„Pasivní“ model současné interakce tří buněk (M.A) předpokládá, že naivní CTL a Th1 buňky musí interagovat přímo s jednou konkrétní DC prezentující antigen, popřípadě oba antigeny (zde PADRE a E7), přičemž Th1 sekretuje IL-2, který stimuluje konečnou diferenciaci CTL v efektorové buňky (Obr. 1A). Z výsledků Kim et al. ale vyplývá, že stačí, aby byly DC tyto antigeny prezentující přítomné ve stejné uzlině, ve které ke stimulaci imunitní odpovědi dochází. Přímě to „pasivní“ model nevyvrací, ale ani jej jednoznačně nepodporuje, jak autoři vyvozují. Podstatnou funkci IL-2 připisuje též konkurenční „dynamický“ model C. Ve zbylých modelech sice IL-2 explicitně nevystupuje, ale jeho role v posílení aktivity CTL byla deklarována více nezávislými studiemi, takže o jeho stimulačním efektu na CTL by neměly být pochyby. Je-li tedy platný jiný z predikovaných modelů (Castellino and Germain 2006), bude do něj funkce IL-2 jistě doplněna.

S poměrně zajímavými výsledky, co se vlivu IL-2 týče, přichází další studie. Gen pro IL-2 byl v DNA vakcíně napojen na E7 HPV16 a byly sledovány síla a charakter imunitní odpovědi proti antigenu E7. Takováto fúzní DNA vakcína měla nejvyšší protektivní i terapeutický účinek v porovnání s ostatními použitými variantami dodání obou genů (DNA kódující pouze protein E7; DNA kódující pouze IL-2; současné podání DNA vakcíny kódující E7 s DNA kódující IL-2) a vyvolala produkci největšího množství E7-specifických CTL. Fúzní vakcína byla též účinnější, než byly-li geny kódující antigen E7 a IL-2 umístěny na zvláštních plazmidech. Tento zvýšený účinek byl pozorován i přesto, že množství mRNA proteinu E7 v transfekovaných buňkách bylo za použití všech forem vakcinačních genů srovnatelné (Lin et al. 2007).

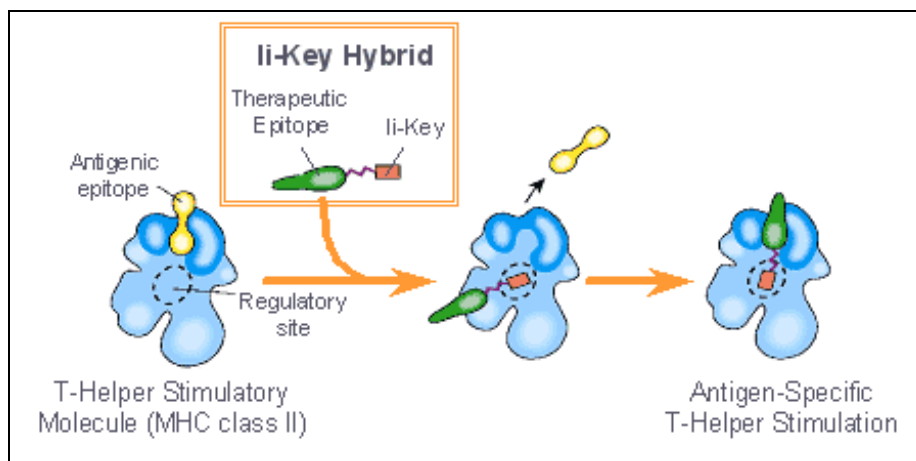
Podle autorů měl fúzní IL-2 pozitivní vliv na prezentaci antigenů E7 na povrchu buněk. Mechanismus, kterým by dle jejich názoru k tomuto posílení skrze fúzi oněch dvou proteinů mělo docházet, ale blíže nevysvětlují. Jelikož se jedná o poměrně malé proteiny (E7 ~ 98 aa, myší IL-2 ~ 169 aa; zdroj: PubMed), neměl by být ani fúzní konstrukt buňce nápadný svou velikostí, aby jej ve zvýšené míře metabolizovala. Je tedy možné, že aminokyselinová sekvence v oblasti fúze proteinových podjednotek obsahuje oblast, která je nestabilní nebo

jinak charakteristická (např. rozeznána jako podezřele lokalizovaná díky podjednotce IL-2) a může být preferenčně nasměrována k degradaci. Dochází-li ke zvýšenému štěpení fúzního proteinu, může být více E7-peptidů prezentováno na povrchu APC a poskytovat tak více vazebných a aktivačních příležitostí naivním CTL.

Jedním z největších přínosů této práce by však mohlo být (Lin et al. 2007), že takto dodaný IL-2 je schopen celkově zastoupit podpůrnou úlohu CD4+ lymfocytů v aktivaci diferenciaci naivních CTL na efektorové. I při odstranění CD4+ T buněk se totiž CTL specificky aktivovaly. Cytokin tedy nejspíš musí být z DC v dostatečném množství též sekretován, aby jej mohly CD8+ buňky svými receptory detekovat a využít. Práce Lin et al. tedy v korelaci s modelem A potvrzuje význam IL-2 v posílení aktivace CTL; model C ovšem v podstatě vyvrací, jelikož v něm nejsou Th buňky jen producenty IL-2, ale hrají zcela nezastupitelnou roli, kdy s CTL během jejich aktivace fyzicky interagují (Xiang et al. 2005).

Hybrid epitop-li-Key

Jako v praxi využitelná možnost posílení CD4+ lymfocytů se ukázala další modifikace molekuly li-řetězce. li-Key je definovaná peptidová oblast pocházející z li-řetězce, která se váže do alosterického místa na MHC gp II (Obr. 3). Epitop navázaný na li-Key, jenž měl sloužit k vybuzení a posílení CD4+ odpovědi, byl vybrán ze sekvence onkoproteinu E7 HPV16. Tato molekula byla podávána ve formě peptidové vakcíny. Bylo ukázáno, že navázání epitopu na li-Key oproti podání samotného epitopu výrazně zvýšilo jeho potenciál v aktivaci antigenně specifických CD4+ buněk (Xu et al. 2009).



Obr. 3 Vazba li-Key hybridu na MHC gp II (převzato z www.antigenexpress.com)

Oproti pracím zaměřeným na PADRE v tomto případě s vazebným místem MHC gp II interaguje peptid pocházející přímo z proteinu E7. Ten byl vytipován speciálně k HLA-DR4 molekule (Xu et al. 2009). Tedy oba typy T lymfocytů (Th i CTL) aktivované v tomto experimentu jsou antigenně specifické k epitopům pocházejícím z proteinu E7 HPV16. To by mohlo mít pro případné protinádorové terapeutické využití podstatný význam, jelikož se ukazuje, že jisté subpopulace CD4+ T buněk mají určité cytotoxické schopnosti (van de Berg et al. 2008). Novější model (M.C) funkce CD4+ buněk v transdukci signálu kromě jiného popisuje, že po proměně, kterou CD4+ lymfocyty prodělají během imunologické synapse s APC, jsou vzniklé Th-APC schopny exprimovat perforin (Xiang et al. 2005), hlavní cytolytickou zbraň CTL a NK-buněk. V případě platnosti modelu C by tak mohly tímto mechanismem dále napomoci v efektorové funkci proti infikovaným/nádorově pozměněným buňkám exprimujícím onkoprotein E7.

Autoři Xu et al. uvádějí pětinašobné navýšení počtu CD4+ T lymfocytů po imunizaci vakcínou li-Key/HPV16 E7, ale jak se v diskuzi ukazuje, je to nepotvrzená domněnka, ve které se může skrývat jistá chyba. Ve studiích z dřívějších let byla proliferace T lymfocytů měřena dle množství zainkorporovaného [³H]thymidinu po inkubaci buněk s příslušným peptidem, ke kterému vykazovaly afinitu (Comerford et al. 1991; Tindle et al. 1991; Vandebriel et al. 1995). V současnosti se k analýze zastoupení různých typů buněk nejběžněji používá metoda průtokové cytometrie, pomocí které jsme schopni buňky označit a následně analyzovat dle dvou znaků (pro tyto účely běžně molekuly IFN- γ a CD4/CD8). Je poněkud zarážející, že k identifikaci buněk produkujících IFN- γ při studiu li-Key/HPV16 E7 nebyla metoda průtokové cytometrie použita. Xu et al. (2009) jen z nepřímých důkazů dedukují, že dochází k posílení odpovědi skutečně přes MHC gp II. Analyzují množství IFN- γ -sekretujících buněk, nikoli již však další buněčné determinanty. Jelikož ale IFN- γ produkuje více typů buněk, nejen Th1, není tato jediná identifikovaná vlastnost oněch buněk, které na imunizaci peptidem reagovaly, dostačující pro vyvozování podílu Th na navýšené produkci IFN- γ . Výsledky mohou být navíc ovlivněny další nespecifickou imunitní odpovědí, protože jako adjuvans byly použity oligonukleotidy s nemetylovanými CpG, na které mohou reagovat i buňky vrozené imunity svými TLR. Například dendritické buňky exprimují jak TLR 9, na které se CpG váží, tak jsou zároveň schopné produkce IFN- γ . Analýza pomocí průtokové cytometrie by tedy pro doložení platnosti výsledků měla být v této době považována za samozřejmost.

Xu et al. bohužel neprezentují žádná data o reaktivitě li-Key/HPV16 E7 hybridní peptidové vakcíny proti nádorovým buňkám exprimujícím onkoprotein E7, nemůžeme tedy účinnost li-Key a např. PADRE porovnávat na této úrovni. PADRE molekula má přeci jen tu výhodu, že její aplikace může být prováděna jak ve formě peptidu, tak kódovaná DNA vakcínou, jíž se přisuzuje vyšší účinnost (Hung et al. 2007). li-Key konstrukt byl zatím používán pouze jako hybridní peptidová vakcína. Ve formě DNA nejspíš ani dodáván být nemůže, jelikož antigenní peptid je s jádrem li-Key (aa sekvence = LRMK) vázícím se na alosterické místo MHC gp II propojen pomocí nepeptidové spojky. Tato spojka je tvořena 5-aminovalerovou kyselinou. Dodání signálu pro takovouto fúzi li-Key a prezentovaného peptidu do DNA vakcíny by bylo ne snad nemožné, ale nejspíš velmi obtížné. Při pohledu na 5-aminovalerovou kyselinu ($\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_4-\text{COOH}$) se nabízí varianta, že by se pro účely DNA vakcíny mohla nahradit např. dvěma glyciny (v kostře spojky by byl shodný počet atomů), ale pravděpodobně by to přeci jen vedlo k určitému pozměnění vlastností spojovacího článku, tedy možným odlišným interakcím s alosterickým místem na MHC gp II, do kterého se li-Key váže.

Závěr

Od identifikace prvních epitopů pocházejících z onkoproteinu E7 a posilujících skrze CD4+ T buňky imunitní odpověď proti nádorovým buňkám infikovaným HPV se dospělo k výrazným pokrokům. Byly popsány alely MHC gp II, které vykazují vyšší, ale i nižší náchylnost k tomuto malignímu onemocnění (Wank and Thomssen 1991; Peng et al. 2007). To může napomoci v úspěšnosti další léčby u pacientek, jelikož je možné povzbudit specifickou imunitní odpověď. Vedle toho byly ale především formulovány syntetické peptidy jako PADRE nebo li-Key s navázaným epitopem, které jsou schopné obecněji aktivovat Th buňky a navýšit tak celkovou účinnost imunitní odpovědi (Alexander et al. 1994; Hung et al. 2007; Xu et al. 2009). Porovnání účinnosti jednotlivých pomocných konstruktů (li-PADRE, li-Key apod.) pouze odvozováním z publikovaných výsledků jednotlivých skupin je prakticky nemožné. Každý tým autorů používá pro stimulaci buněk a následné analýzy poněkud odlišné postupy, není tedy možné i jen relativní srovnání provést. K takovému účelu by bylo třeba experimentu studujícího účinky daných molekul za shodných podmínek, jako to bylo provedeno Kim et al. (2004) ve studii kombinující DNA vakcínu proti E7 s různými molekulami podporujícími intracelulární zacílení antigenů, z níž vyšla jako nejúčinnější v indukci E7-specifických CTL výše zmiňovaná molekula kalretikulinu.

Vzhledem k prozatím ne zcela rozklíčovanému mechanismu účasti Th na souborné transdukcii signálu o přítomnosti infikovaných/nádorových buněk (viz modely M.A – M.D) je těžko predikovatelné, jaké další stimulační molekuly je nutné pro posílení přidat. Bude-li lépe prozkoumán cytotoxický charakter CD4+ T buněk (van de Berg et al. 2008), je pravděpodobné, že to v budoucnu zásadně změní úhel pohledu na tyto buňky a jejich funkci nejen v aktivaci CTL.

Dalšího posílení imunitní odpovědi je snaha dosáhnout vylepšením způsobu aplikace DNA vakcíny, kde je aktuálně nejlepších výsledků dosahováno využitím elektroporace po intramuskulární injekci vakcíny (Best et al. 2009). Ještě více zesílit odpověď organismu je možné pomocí adjuvans. Je zde například možnost použití genů pro cytokiny (Lin et al. 2007; Kim et al. 2008) nebo byly vysoce stimulační účinky potvrzeny u bakteriálních proteinů teplotního šoku (HSP) (Chen et al. 2000; Liu et al. 2007). HSP jsou molekuly posilující imunitní odpověď poměrně obecně, je tedy možné je využívat v kombinovaných vakcínách.

Kromě HSP byly v nejrůznějších souvislostech identifikovány též přímo bakteriální Th epitopy. Podobným způsobem jako u peptidu PADRE byl studován imunostimulační účinek pomocných epitopů pocházejících z bakterie *Listeria monocytogenes* (Nagata et al. 2008). Tyto epitopy byly vsazeny do li-řetězce namísto CLIP a byl sledován jejich účinek na aktivaci CD4+, resp. CD8+ T buněk. Obdobně jsou především britskou skupinou kolem Fredy K. Stevenson studovány epitopy pocházející z bakterie *Clostridium tetanii*, u které již byly v tetanovém toxinu identifikovány pomocné epitopy, které by mohly v budoucnu být účinnými adjuvans protinádorových DNA vakcín (Rice et al. 2002). Na Ústavu hematologie a krevní transfuze pod vedením RNDr. Michala Šmahela právě začíná výzkum využívající těchto pomocných epitopů z tetanového toxinu k posílení stimulace imunitní odpovědi proti onkoproteinu E7 HPV16. Pokud bude ověřena jejich schopnost významně aktivovat Th buňky po vložení do DNA vakcín, mohly by být vybrané pomocné epitopy aplikovány v následujícím výzkumu ke zvýšení imunogenity transkripčních faktorů nutných pro sebeobnovu nádorových kmenových buněk. V případě těchto molekul, které jsou tělu vlastní, je totiž pro účinnou aktivaci imunitní odpovědi nezbytná silná stimulace Th buněk, jelikož musí být prolomena tolerance, která se proti těmto vlastním (*self*) antigenům přirozeně ustavuje. Protože tyto transkripční faktory svým působením podmiňují „kmenový“ charakter buněk, ve kterých jsou exprimovány, jsou, obdobně jako protein E7 z buněk infikovaných HPV16, vhodnými cílovými antigeny pro terapeutickou protinádorovou vakcinaci.

Seznam použité literatury

- Alexander, J., Sidney, J., Southwood, S., et al. Development of high potency universal DR-restricted helper epitopes by modification of high-affinity DR-blocking peptides. *Immunity* (1994) 1(9):751-761.
- Altmann, A., Jochmus-Kudielka, I., Frank, R., et al. Definition of immunogenic determinants of the human papillomavirus type 16 nucleoprotein E7. *European Journal of Cancer* (1992) 28(2-3):326-333.
- Bennett, S. R. M., Carbone, F. R., Karamalis, F., et al. Induction of a CD8(+) cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4(+) T cell help. *Journal of Experimental Medicine* (1997) 186(1):65-70.
- Best, S. R., Peng, S. W., Juang, C. M., et al. Administration of HPV DNA vaccine via electroporation elicits the strongest CD8+T cell immune responses compared to intramuscular injection and intradermal gene gun delivery. *Vaccine* (2009) 27(40):5450-5459.
- Bosch, F. X., Manos, M. M., Munoz, N., et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: A worldwide perspective. *Journal of the National Cancer Institute* (1995) 87(11):796-802.
- Castellino, F., and Germain, R. N. Cooperation between CD4+ and CD8+ T cells: When, where, and how. *Annual Review of Immunology* (2006) 24:519-540.
- Castellino, F., Huang, A. Y., Altan-Bonnet, G., et al. Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8(+) T cells to sites of CD4 T cell-dendritic cell interaction. *Nature* (2006) 440(7086):890-895.
- Chen, C. H., Wang, T. L., Hung, C. F., et al. Enhancement of DNA vaccine potency by linkage of antigen gene to an HSP70 gene. *Cancer Research* (2000) 60(4):1035-1042.
- Comerford, S. A., McCance, D. J., Dougan, G., et al. Identification of T- and B-cell epitopes of the E7 protein of human papillomavirus type 16. *Journal of Virology* (1991) 65(9):4681-4690.
- Hung, C. F., Tsai, Y. C., He, L. M., et al. DNA vaccines encoding li-PADRE generates potent PADRE-specific CD4+ T-cell immune responses and enhances vaccine potency. *Molecular Therapy* (2007) 15(6):1211-1219.
- Keene, J. A., and Forman, J. Helper activity is required for the in vivo generation of cytotoxic lymphocytes-T, *Journal of Experimental Medicine*, Vol. 155, 1982.
- Kim, D., Monie, A., He, L., et al. Role of IL-2 secreted by PADRE-specific CD4(+) T cells in enhancing E7-specific CD8(+) T-cell immune responses. *Gene Therapy* (2008) 15(9):677-687.
- Kim, J. W., Hung, C. F., Juang, J., et al. Comparison of HPV DNA vaccines employing intracellular targeting strategies. *Gene Therapy* (2004) 11(12):1011-1018.
- Klinman, D. M., Yamshchikov, G., and Ishigatsubo, Y. Contribution of CpG motifs to the immunogenicity of DNA vaccines. *Journal of Immunology* (1997) 158(8):3635-3639.
- Leitner, W. W., Ying, H., and Restifo, N. P. DNA and RNA-based vaccines: Principles, progress and prospects. *Vaccine* (1999) 18(9-10):765-777.
- Li, G. J., Li, Y. J., Yan, W. Y., et al. CpG DNA enhances the immune responses elicited by the DNA vaccine against foot-and-mouth disease virus in guinea pigs. *Chinese Science Bulletin* (2001) 46(16):1376-1379.
- Lin, C. T., Tsai, Y. C., He, L. M., et al. DNA vaccines encoding IL-2 linked to HPV-16 E7 antigen generate enhanced E7-specific CTL responses and antitumor activity. *Immunology Letters* (2007) 114(2):86-93.
- Lin, K., Roosinovich, E., Ma, B., et al. Therapeutic HPV DNA vaccines. *Immunologic Research* (2010):1-27.
- Liu, H. W., Wu, B. H., Rowse, G. J., et al. Induction of CD4-Independent E7-specific CD8(+) memory response by heat shock fusion protein. *Clinical and Vaccine Immunology* (2007) 14(8):1013-1023.
- Nagata, T., Aoshi, T., Uchijima, M., et al. In vivo hierarchy of individual T-cell epitope-specific helper T-cell subset against an intracellular bacterium. *Vaccine* (2008) 26(40):5123-5127.

- Oerke, S., Hohn, H., Zehbe, I., et al. Naturally processed and HLA-B8-presented HPV16 E7 epitope recognized by T cells from patients with cervical cancer. *International Journal of Cancer* (2005) 114(5):766-778.
- Ohlschlager, P., Pes, M., Osen, W., et al. An improved rearranged Human Papillomavirus Type 16 E7 DNA vaccine candidate (HPV-16 E7SH) induces an E7 wildtype-specific T cell response. *Vaccine* (2006) 24(15):2880-2893.
- Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., et al. Global cancer statistics, 2002. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians* (2005) 55(2):74-108.
- Peitsaro, P., Johansson, B., and Syrjanen, S. Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. *Journal of Clinical Microbiology* (2002) 40(3):886-891.
- Peng, S. W., Trimble, C., Wu, L., et al. HLA-DQB1*02-restricted HPV-16 E7 peptide-specific CD4(+) T-cell immune responses correlate with regression of HPV-16-associated high-grade squamous intraepithelial lesions. *Clinical Cancer Research* (2007) 13(8):2479-2487.
- Porgador, A., Irvine, K. R., Iwasaki, A., et al. Predominant role for directly transfected dendritic cells in antigen presentation to CD8+ T cells after gene gun immunization. *Journal of Experimental Medicine* (1998) 188(6):1075-1082.
- Rice, J., Buchan, S., and Stevenson, F. K. Critical components of a DNA fusion vaccine able to induce protective cytotoxic T cells against a single epitope of a tumor antigen. *Journal of Immunology* (2002) 169(7):3908-3913.
- Ridge, J. P., Di Rosa, F., and Matzinger, P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4(+) T-helper and a T-killer cell. *Nature* (1998) 393(6684):474-478.
- Smahel, M. DNA vakciny, *Casopis lekaru ceskych*, Vol. 1, 2002.
- Tindle, R. W. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nature Reviews Cancer* (2002) 2(1):59-65.
- Tindle, R. W., Fernando, G. J. P., Sterling, J. C., et al. 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* (1991) 88(13):5887-5891.
- van de Berg, P. J., van Leeuwen, E. M., ten Berge, I. J., et al. Cytotoxic human CD4+ T cells. *Current Opinion in Immunology* (2008) 20(3):339-343.
- Vandebriel, R. J., Van Der Kolk, M., Geerse, L., et al. A helper T-cell epitope of the E7 protein of human papillomavirus type 16 in BALB/c mice. *Virus Research* (1995) 37(1):13-22.
- Wank, R., and Thomssen, C. High risk of squamous cell carcinoma of the cervix for women with HLA-DQw3. *Nature* (1991) 352(6337):723-725.
- Xiang, J., Huang, H., and Liu, Y. Q. A new dynamic model of CD8(+) T effector cell responses via CD4(+) T helper-antigen-presenting cells. *Journal of Immunology* (2005) 174(12):7497-7505.
- Xu, M. Z., Lu, X. Q., Sposato, M., et al. li-Key/HPV16 E7 hybrid peptide immunotherapy for HPV16+ cancers. *Vaccine* (2009) 27(34):4641-4647.
- Zhou, J., Liu, W. J., Peng, S. W., et al. Papillomavirus capsid protein expression level depends on the match between codon usage and tRNA availability. *Journal of Virology* (1999) 73(6):4972-4982.
- zur Hausen, H. Papillomaviruses and cancer: From basic studies to clinical application. *Nature Reviews Cancer* (2002) 2(5):342-350.