

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: BMOBIBO



**Šárka Boháčová**

Zkřížená prezentace antigenů - mechanismus a biologický význam  
Antigen cross-presentation - mechanism and biological significance

Bakalářská práce

Školitel: Ing. Kvido Stříšovský, Ph.D.

Praha, 2017

## **Prohlášení**

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

V Praze, 01.05.2017

Šárka Boháčová

## Abstrakt

Zkřížená prezentace antigenů je proces, kdy dendritické buňky předkládají antigeny zvenčí CD8+ T lymfocytům na MHC-I glykoproteinech. Jako zkřížená se označuje proto, že oproti cestám klasické prezentace vede vskutku křížem, protože vnější antigeny jsou zpravidla prezentovány na MHC-II a vnitřní na MHC-I glykoproteinech. Molekulární mechanismus zkřížené prezentace doposud není uspokojivě objasněn. Uvažují se dvě hlavní cesty - vakuolární a cytosolická. Vakuolární cesta předpokládá, že pohlcené antigeny jsou naštěpeny v endosomu pomocí proteáz a následně naloženy na MHC-I. Cytosolická cesta předpokládá, že pohlcený antigen proniká z váčku do cytosolu, kde je naštěpen v proteazomu. Odtud putuje buď do endoplasmatického retikula (ER), kde je MHC-I naloženo i při klasické prezentaci antigenu, nebo zpět do endosomu, kam se mašinérie nakládající MHC-I přesouvá. Procesu se účastní proteiny z ER, včetně těch, které spolupracují na mechanismu ERAD, Rab GTPázy regulující váčkový transport a struktury podílející se na maturaci endosomů. Zkřížená prezentace má svůj význam z medicínského hlediska, jelikož aktivuje CD8+ T lymfocyty proti intracelulárním patogenům a rakovinným buňkám a také navozuje toleranci na periférii.

**Klíčová slova:** Prezentace antigenu; Zkřížená prezentace; Dendritická buňka; MHC-I; CD8+ T lymfocyt

## **Abstract**

Antigen cross-presentation is a process, when dendritic cells present exogenous antigens in context of MHC-I to CD8+ T lymphocytes. Unlike classical antigen presentation, this one goes crosswise, because exogenous antigens are otherwise usually presented on MHC-II and endogenous antigens on MHC-I glycoproteins. Molecular mechanism of cross-presentation has not been well established yet. Two major pathways are considered - vacuolar and cytosolic. In the vacuolar pathway, the internalised antigens are cleaved in the endosome by proteases and then loaded onto MHC-I. In the cytosolic pathway, the internalised antigens leave the endosome to be cleaved by the proteasome in the cytosol. They are then imported into the endoplasmic reticulum (ER) to be loaded onto MHC-I as in classical antigen presentation, or they go back into the endosome where the MHC-I loading machinery is trafficked. This process is mediated by ER proteins including those participating in ERAD, by Rab GTPases regulating vesicular transport, and by structures important for endosome maturation. Cross-presentation is important in medicine, because it ensures activation of CD8+ T lymphocytes against intracellular pathogens and cancer cells, and induction of tolerance at the periphery.

**Key words:** Antigen presentation; Cross-presentation; Dendritic cell; MHC-I; CD8+ T lymphocyte

## Obsah

<b>Abstrakt</b> .....	<b>ii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>iii</b>
<b>Abecední seznam zkratk</b> .....	<b>vi</b>
<b>1 Úvod</b> .....	<b>1</b>
1.1 Význam prezentace antigenu v kontextu imunitního systému.....	1
1.2 Antigen-prezentující a rozpoznávající buňky.....	2
1.3 MHC-I.....	4
1.3.1 <i>Exprese a skládání MHC-I</i> .....	4
1.3.2 <i>Struktura HLA-I</i> .....	6
1.4 MHC-II.....	6
1.4.1 <i>Exprese a nakládání MHC-II antigenními peptidy</i> .....	7
<b>2 Zkřížená prezentace antigenu - jaký je její fyziologický význam?</b> .....	<b>7</b>
2.1 První zjištění.....	7
2.2 Zkříženě prezentující buňky.....	8
2.3 Fyziologický význam zkřížené prezentace DC.....	8
2.3.1 <i>Intracelulární patogeny - viry, bakterie, parazité</i> .....	8
2.3.2 <i>Tolerance</i> .....	9
2.3.3 <i>Nádorová onemocnění</i> .....	10
<b>3 Základní molekulární mechanismy zkřížené prezentace</b> .....	<b>10</b>
3.1 Cytosolická cesta zkřížené prezentace.....	10
3.1.1 <i>Význam TAP</i> .....	11
3.1.2 <i>Význam proteazomu</i> .....	12
3.1.3 <i>Cesta z fagosomu do cytosolu</i> .....	12
3.2 Vakuolární cesta.....	13
3.3 Závěrem kapitoly.....	14
<b>4 Nejdiskutovanější adaptace DC na zkříženou prezentaci</b> .....	<b>15</b>
4.1 Nižší proteolytická aktivita ve fagosomech a endosomech DC favorizuje zkříženou prezentaci.....	16
4.2 Činnost NADPH oxidázy na fagosomální membráně je zásadní pro zkříženou prezentaci.....	17
4.2.1 <i>Malé GTPázy Rab27a a Rac2 jsou důležité pro funkci NOX2 na fagosomální membráně.</i> .....	19
4.2.2 <i>Mechanismus, kterým NOX2 napomáhá zkřížené prezentaci, však není jednoznačně jasný.</i> .....	20
4.3 Další principy regulace proteolytické aktivity během zkřížené prezentace.....	21

4.4	Endosomy účastníci se zkřížené prezentace obsahují peptidázu IRAP. ....	21
<b>5</b>	<b>Vnitrobuněčný transport komponent mašinerie pro nakládání MHC-I molekul.....</b>	<b>22</b>
<b>6</b>	<b>Vnitrobuněčný transport MHC-I molekul .....</b>	<b>23</b>
6.1	MHC-I molekuly mohou být recyklovány a nepřicházejí společně s PLC z ERGIC. ....	24
6.2	Na vnitrobuněčném transportu MHC-I molekul se podílí řada Rab GTPáz. ....	25
6.3	Závěrem kapitoly .....	27
<b>7</b>	<b>Mechanismus ERAD a zkřížená prezentace.....</b>	<b>29</b>
7.1	Základní mechanismus ERADu špatně složených solubilních proteinů v lumen ER (ERAD-L).....	29
7.1.1	<i>Retrotranslokony</i> .....	30
7.2	Význam ERADu pro zkříženou prezentaci.....	33
7.3	Závěrem kapitoly .....	35
<b>8</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>35</b>
	<b>Seznam použité literatury.....</b>	<b>37</b>

## Abecední seznam zkratk

AMK	<b>A</b> minokyselina	GAP	<b>G</b> TPázu-aktivující protein
APC	<b>A</b> ntigen <b>p</b> resenting cell, ve smyslu profesionální antigen prezentující buňka (typicky dendritická buňka, makrofág)	GEF	<b>G</b> TP exchange factor
ATPáza	Enzym štěpící ATP	GFP	<b>G</b> reen fluorescent protein
BCR	<b>B</b> -buněčný receptor	GTPáza	Enzym štěpící GTP
$\beta_2m$	<b>B</b> eta2-mikroglobulin	HLA	<b>H</b> uman leukocyte antigen
CD#	<b>C</b> luster of <b>d</b> ifferentiation, užívá se pro označení různých povrchových molekul leukocytů	IFN	<b>I</b> nterferon
CD# +/-	Buňka nese/nese na svém povrchu molekulu CD#	IRAP	<b>I</b> nsulin-regulated aminopeptidase
CGD	<b>C</b> hronic <b>g</b> ranulomatous <b>d</b> isease	LPS	<b>L</b> ipopolysacharid
CMV	<b>C</b> ytomegalovirus	MHC	<b>M</b> ajor <b>h</b> istocompatibility complex
CPY*	Karboxypeptidáza Y s bodovou mutací	MR	<b>M</b> anosový receptor
CTL	<b>C</b> ytotoxický <b>T</b> lymfocyt	NOX2	<b>N</b> ADPH-oxidáza <b>2</b>
DAMPs	<b>D</b> anger-associated molecular patterns	OVA	<b>O</b> valbumin, protein často používaný jako modelový antigen pro zkříženou prezentaci
DC	<b>D</b> endritic cell, dendritická buňka	PAMPs	<b>P</b> atogen-associated molecular patterns
ER	<b>E</b> ndoplasmatické retikulum	pDC	<b>P</b> lasmacytoidní <b>DC</b>
ERAD	<b>ER</b> -associated degradation	PDI	<b>P</b> rotein-disulfid-izomeráza
ERAP	<b>ER</b> -aminopeptidáza	PLC	<b>P</b> eptide loading complex
ERC	<b>E</b> ndosomální recyklující kompartment	PRR	<b>P</b> attern recognition receptor
ERGIC	<b>ER</b> -Golgi intermediate compartment	ROS	<b>R</b> eactive oxygen species, kyslíkové radikály
ERp57	<b>ER</b> -protein <b>57</b> , jedná se o protein-disulfid-izomerázu	TAP	<b>T</b> ransporter associated with antigen processing
ExoA	<b>E</b> xotoxin <b>A</b>	TLR	<b>T</b> oll-like receptor
GA	<b>G</b> olgiho aparát	TCR	<b>T</b> -buněčný receptor
		TfR	<b>T</b> ransferrinový receptor
		Ub	<b>U</b> bikvitin

# 1 Úvod

Tato bakalářská práce pojednává o molekulárních mechanismech procesu tzv. zkřížené prezentace antigenů a jejím fyziologickému významu. Úplné a podrobné pojednání o zkřížené prezentaci by vydalo jistě na pěknou knihu. Nezasvěcenému se na první pohled musí zdát, že přeci nemůže být toliko známo o buněčném procesu, o jehož existenci sotva zaslechl. Opak je však pravdou. Nenaleznete zde tudíž kapitoly o problematice samotných dendritických buněk, o jejich lidských a myších podtypech, ani o jejich maturaci, k níž dochází po stimulaci pattern recognition receptorů. Proces zkřížené prezentace zasahuje do několika buněčných kompartmentů, vyžaduje zapojení spousty proteinových faktorů a jeho průběh je ovlivněn tuctem proměnných. Mnohé křížovatky jsou dosud zastřeny mlhou a existuje více názorů na jednu věc. V této práci se tedy nesnažím téma zkřížené prezentace pojmut v jeho úplnosti, ale vybírám si užší problematiku, která je v současné době obestřena nejasnostmi.

## 1.1 Význam prezentace antigenu v kontextu imunitního systému

Imunitní systém sestává z části adaptivní a vrozené. Vrozená, nebo též neadaptivní, imunita je utvářena řadou buněk jako jsou NK buňky, bazofily, eozinofily, žírné buňky, fagocytyující neutrofil, dendritické buňky (DC) a makrofágy. Dále jsou k neadaptivní imunitě řazeny bariéry bránící prostupu patogenů a rozpustné faktory jako komplement či cytokiny (Cruvinel *et al.*, 2010). Jedním z důležitých úkolů fagocytů vrozené imunity je vhodným způsobem předkládat (prezentovat) nebezpečné pohlcené antigeny (antigen je obecně struktura proti níž mohou být vytvořeny protilátky, ne nutně je tudíž nebezpečný) buňkám adaptivní části imunitního systému - hlavně T lymfocytům, a tím je aktivovat (tzn. spustit jejich diferenciaci a klonální expanzi) (Iwasaki & Medzhitov, 2015). Toho jsou schopné makrofágy a zejména DC, společně označované jako profesionální antigen-prezentující buňky (APC).

Že se jedná o antigeny potenciálně nebezpečné, rozpoznává neadaptivní imunita pomocí pattern recognition receptorů (PRR), které jsou specifické například pro bakteriální lipopolysacharidy, či virovou DNA. Kromě těchto tzv. pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), mohou být signálem nebezpečí i danger-associated molecular patterns (DAMPs) - struktury spojené s poškozením vlastních tkání, např. ATP či jiné nukleosidy a DNA vazebné proteiny. Kromě strukturních motivů může být rozpoznána také nebezpečná činnost a efekty virulencních faktorů, jako je formace pórů v membráně buněk, či enzymatické aktivity některých alergenů.

Pokud fagocyt zaznamená přítomnost PAMPs či DAMPs, zvýší se jeho aktivita, mnohem efektivněji pohlcuje vzorky svého okolí, vystavuje přítomné proteiny na MHC glykoproteinech, exprimuje kostimulační molekuly a produkuje cytokiny. Typ PRR, které jsou aktivovány, určuje, jakým konkrétním způsobem se aktivuje APC a následně jak konkrétně se polarizuje imunitní odpověď, přičemž záleží také, v jaké části



organismu byly antigeny zachyceny. Dendritické buňky se dělí na řadu subpopulací a předpokládá se, že každá je schopna aktivovat T lymfocyty trochu jinak.

Při setkání dendritické buňky s T lymfocyt, který je specifický pro antigen vystavený na jejím povrchu dochází k těsné interakci těchto dvou buněk - utváří se imunologická synapse (Dustin, 2014). Součástí imunologické synapse jsou molekuly antigen specifické, adhezní a kostimulační. T lymfocyt se váže svým T-buněčným receptorem (TCR) na komplex MHC-antigenní peptid, kostimulační molekuly jako CD80, CD86 a mnohé další se propojují se svými protějšky na T lymfocytu (CD28 aj.). Cytokiny jako IL-12 a IL-2 hrají roli nejen v aktivaci T lymfocytu, ale také v následné diferenciaci do konkrétního buněčného podtypu. Vhodná prezentace antigenu spočívá tedy v poskytnutí všech tří typů signálů - MHC-peptid komplex, kostimulační molekuly, cytokiny. Pokud lymfocyt nedostane potřebné signály, nedochází k aktivaci a je naopak umlčen. Tímto způsobem je zajištěno, že aktivovány jsou pouze ty lymfocyty, které jsou právě potřeba (co do specifity). Prezentace antigenu je tedy zásadní proces, jímž vrozená imunita předává zprávu imunitě adaptivní.

## 1.2 Antigen-prezentující a rozpoznávající buňky

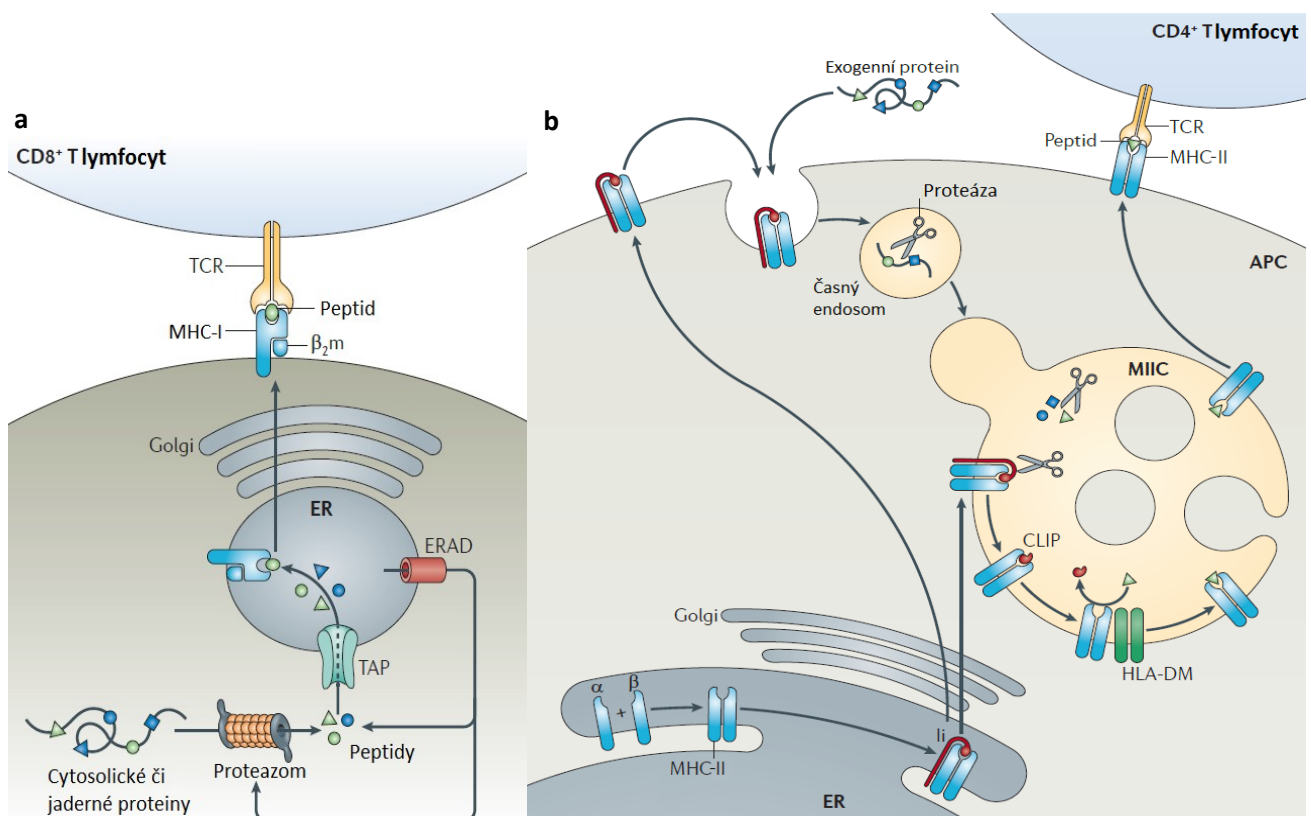
Aby buňka mohla prezentovat antigeny ze svého okolí buňkám imunitního systému, musí na svém povrchu nést MHC glykoproteiny, které jsou v komplexu s peptidy rozpoznávány prostřednictvím TCR. MHC-I glykoproteiny nesou na svém povrchu všechny jaderné buňky a prezentují na nich své vnitřní antigeny (Obr. 1) (Goldberg & Rizzo, 2015a). Umožňují tak imunitnímu systému kontrolu nad svým vnitřním obsahem. Fragmenty z proteinů exprimovaných uvnitř buňky se objevují na povrchu v komplexu s MHC-I a jsou rozpoznávány cytotoxickými T lymfocyty (CTL, efektorové stadium CD8+ T lymfocytů, kdy CD8 je koreceptor uplatňující se při vazbě na MHC-I), jednou z hlavních výkonných složek adaptivní imunity (Andersen *et al.*, 2006).

Pakliže je buňka napadena intracelulárním patogenem, či nádorově transformována, projeví se to na skladbě peptidů prezentovaných na jejích MHC-I molekulách. To rozpozná CTL a buňku usmrtí. Schopnost zabít tělní buňky, jenž představují riziko pro zbytek organismu, je velmi důležitá. Tímto způsobem je eliminováno šíření virové či intracelulární bakteriální nákazy nebo bujení nádoru. Na druhou stranu to představuje i potenciálně nebezpečný mechanismus, pokud CTL omylem zaútočí na zdravé a pro tělo nezbytné buňky, jako jsou třeba  $\beta$  buňky slinivky břišní produkující inzulin. Jejich prostřednictvím tak vznikají mnohá autoimunitní onemocnění nebo opožděné alergické reakce (hypersenzitivita IV. typu).

Aktivita CTL musí být proto dobře regulována a CTL rozpoznávající vlastní antigeny jsou efektivně eliminovány jednak při jejich vývoji v brzlíku a následně i na periférii. K jejich aktivaci, jenž zahrnuje diferenciaci z naivního CD8+ T lymfocytu na CTL a významnou klonální expanzi, je třeba APC, typicky DC. Ta pohltí a v lymfatických uzlinách či slezině vhodně předloží antigen, k němuž je naivní T lymfocyt specifický. Až pak může CTL zaútočit na buňky, jenž na svém povrchu nesou stejný komplex MHC-I-peptid, jako nesla DC. K

zabití buněk využívají CTL několika mechanismů. Jednak lysosomálních váček s obsahem cytotoxických látek granzymů a perforinů. Dále CTL exprimují Fas ligand, který po vazbě na Fas receptor cílové buňky vyvolá apoptózu. Zároveň CTL produkují při stimulaci TCR cytokiny jako TNF $\alpha$ , jenž při vazbě na receptor opět spouští apoptózu, a IFN $\gamma$ , který stimuluje prezentaci na MHC-I a expresi Fas receptoru.

MHC-II glykoproteiny nesou konstitutivně pouze APC a jsou na nich prezentovány peptidy pocházející z vnějšího prostředí (Obr. 1) (Goldberg & Rizzo, 2015a). Mezi APC řadíme makrofágy, DC a B lymfocyty, ale také Langerhansovy buňky (DC kůže) a Kupferovy buňky (jaterní makrofágy). Některé buňky mají schopnost změnit se v APC za stimulačních podmínek. V zánětlivém prostředí jsou tohoto schopny některé epiteliální buňky. B lymfocyty jsou co do běžných APC nejméně prozkoumány. Molekuly MHC-II na jejich povrchu slouží mimo jiné i k vlastní aktivaci B lymfocytů. MHC-II molekuly rozpoznávají CD4+ T lymfocyty, souhrnně označované jako pomocné T lymfocyty (CD4 je opět koreceptor podílející se na vazbě k MHC-II). Pomocné T lymfocyty jsou na rozdíl od CTL velmi širokou skupinou T lymfocytů s rozmanitými funkcemi podmíněnými produkcí odlišných cytokinů (Abbas *et al.*, 1996). Zjednodušeně se však dá říct, že jejich rolí je vskutku napomáhání imunitní odpovědi. Jejich prostřednictvím jsou diferencovány, aktivovány, či ve své funkci podporovány nebo naopak potlačovány efektorové lymfocyty (CTL a B lymfocyty produkující protilátky) stejně tak jako samotné APC a další pomocné T lymfocyty.



**Obr. 1:** Mechanismus klasické MHC-I prezentace (a) a MHC-II prezentace (b) (převzato a upraveno z Neefjes *et al.*, 2011) (a) Endogenní proteiny jsou degradovány v proteazomu, vzniklé peptidy nasedají v ER na MHC-I, odkud jsou společně transportovány na buněčný povrch, kde je rozpozná CD8+ T lymfocyt. (b) Exogenní proteiny jsou pohlceny, v proteolyticky aktivních endosomech naštěpeny, naloženy na MHC-II a společně vystaveny na buněčném povrchu, kde je rozpozná CD4+ T lymfocyt.

Oproti těmto klasickým cestám prezentace antigenů ovšem existují výjimky. CD8+ T lymfocyty totiž nejsou schopny rozpoznávat antigenní peptidy na MHC-II, jejich CD8 koreceptor umožňuje interakci jediné s MHC-I. Přitom musí být pomocí APC aktivovány dříve, než diferencují na efektorové CTL. APC sice nesou oba typy glykoproteinů (MHC-I i MHC-II), poněvadž jsou jadernými buňkami, ale běžnou cestou antigenní prezentace by se na MHC-I neměly dostat žádné antigeny pocházející zvenčí. Prakticky by tak mohly být aktivovány jediné CTL specifické k vnitřním antigenům z APC. V případě, že by sama APC byla nakažena intracelulárním patogenem, tento mechanismus by byl dostačující. V řadě případů však patogen infikuje pouze určité tkáně a APC nikoliv. Také nádory mohou být odvozeny od spousty jiných tělních buněk. Proto existuje takzvaná zkřížená prezentace antigenu, kdy se na MHC-I glykoproteinech mohou objevit antigeny z vnějšího prostředí (Joffre *et al.*, 2012). Z analogického důvodu, kvůli aktivaci pomocných T lymfocytů, se na MHC-II mohou vyskytnout antigeny vnitřní, což je založeno na procesu autofagie.

### 1.3 MHC-I

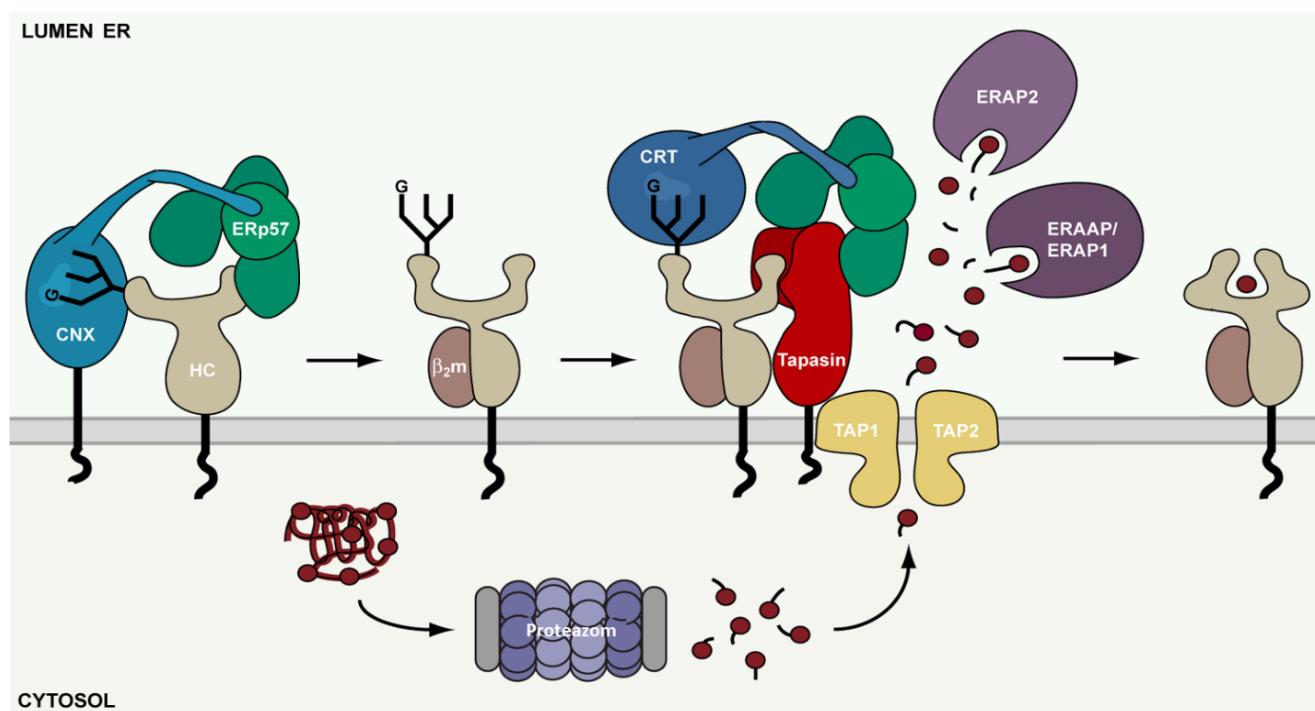
Podívejme se nyní blíže na jednotlivé molekulární složky účastnící se prezentace antigenů. MHC je zkratka z anglického výrazu major histocompatibility complex, která byla zavedena během transplantačních experimentů, pro genovou oblast odpovědnou za odmítnutí transplantátu příjemcem. V dnešní literatuře se však používá pro označení příslušné genové oblasti i samotných proteinů. Lidské MHC proteiny jsou běžně označovány také zkratkou HLA (human leukocyte antigen). Jsou kódovány na krátkém raménku šestého chromozomu společně s dalšími imunologicky významnými proteiny jako je TAP1, TAP2, C2 a C4a komplementu, TNF a jiné (The MHC sequencing consortium, 1999).

Geny pro HLA jsou extrémně polymorfní v rámci populace (Goldberg & Rizzo, 2015a). Každý jedinec je vybaven třemi typy klasických HLA-I: HLA-A, HLA-B, HLA-C, a několika neklasickými. Od klasických HLA-I jsou známy tisíce různých funkčních alel v populaci, je proto vysoce pravděpodobné, že na každém chromozomu se u jedince nachází jiná, ten je pak vybaven 6 různými HLA-I. Tato variabilita je velmi důležitá, neboť se týká prakticky výhradně oblasti, která se podílí na vzniku vazebného žlábků, kam se vážou antigenní peptidy. Čím více různých žlábků, tím spíše bude vystaven antigenní peptid patogenu a imunitní systém proti němu může zasáhnout. Vysoký polymorfismus HLA tak zajišťuje nejen imunitu jedince, ale celé populace. Podobné je to pro HLA-II.

#### 1.3.1 Exprese a skládání MHC-I

Geny HLA-I jsou exprimovány u všech jaderných buněk. Jedná se o membránově vázané glykoproteiny a k jejich skládání tak dochází v endoplasmatickém retikulu (ER). Je to složitý proces, který vyžaduje přítomnost mnohých chaperonů: kalnexinu a kalretikulinu (chaperony lektinového typu), ERp57 (thiol-oxidoreduktáza patřící mezi protein-disulfid-izomerázy) a tapasinu (Obr. 2) (Wearsch & Cresswell, 2008). Po translokaci do ER těžký řetězec MHC-I asociuje s kalnexinem prostřednictvím oligosacharidu a s

oxidoreduktázou ERp57, která je propojena s kalnexinem. Dochází ke sbalení a následně propojení s invariantním beta2-mikroglobulinem ( $\beta_2m$ ). Poté se místo kalnexinu připojuje kalretikulín, tapasin a utváří se tzv. peptide loading complex (PLC), v překladu komplex nakládající peptid. Jeho součástí je kromě již zmíněných molekul transportér asociovaný se zpracováním antigenu 1 (TAP1) a TAP2, které společně utváří transportní kanál pro peptidy generované v cytosolu proteazomem, a též aminopeptidázy ERAAP/ERAP1 a ERAP2, které přichozí peptidy upravují na vhodnou délku. PLC zajišťuje nasednutí vhodného peptidu do žlábků HLA-I.

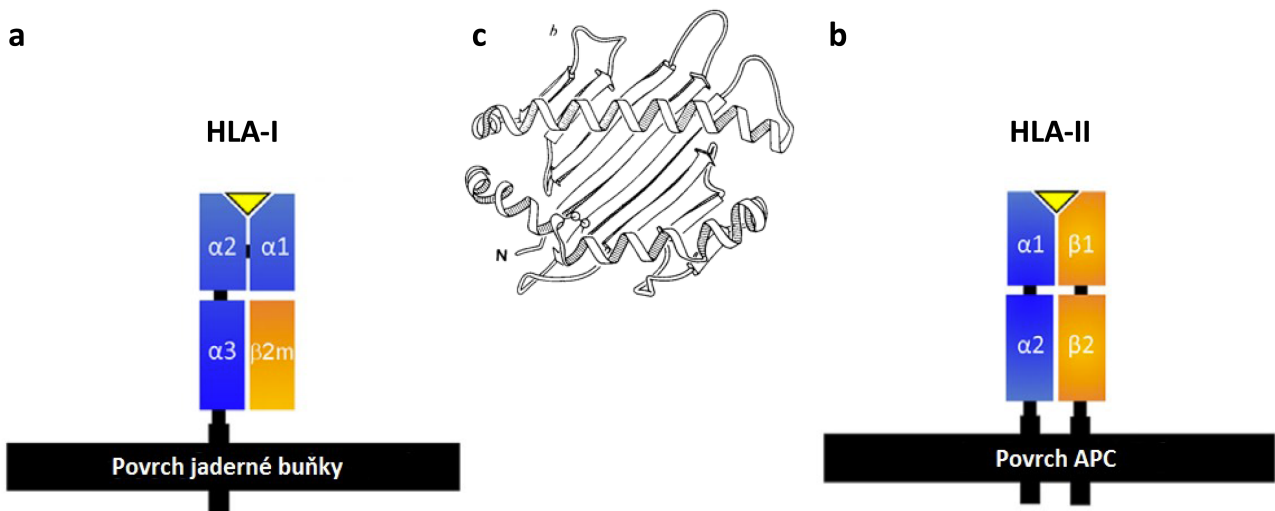


**Obr. 2:** Skládání MHC-I molekul v endoplasmatickém retikulu (převzato a upraveno z Wearsch & Cresswell, 2008)  
 CNX = kalnexin; HC = těžký řetězec MHC-I;  $\beta_2m$  = invariantní beta2-mikroglobulin; CRT = kalretikulín; červené kuličky se "stopkou" = antigenní peptidy, přičemž "stopka" znázorňuje aminokyselinový úsek, jenž musí být před nasednutím do žlábků MHC-I odstraněn

Buněčné proteiny, které jsou poškozené či již nejsou potřeba, jsou označovány řetízkou ubiquitinu a rozpoznány a degradovány proteazomem. Proteazom je multipodjednotkový komplex, jehož jednotlivé podjednotky se podílí na rozpoznání, vazbě, rozložení a enzymatické degradaci substrátových proteinů (Goldberg & Rizzo, 2015b). Některé podjednotky proteazomu mohou být za stimulačních podmínek (IFN gama) vyměněny a vzniká tzv. imunoproteazom, který generuje odlišné peptidy než proteazom běžný. Zvyšuje se tak šance, že některý z peptidů bude rozpoznán T lymfocyty. Peptidy z proteazomu jsou dlouhé okolo 9 aminokyselin (AMK) a uvnitř ER jsou dále zastříženy na délku 8-10 AMK aminopeptidázami ERAP1 a ERAP2. Různé peptidy transientně asociují s HLA-I a až některý vytvoří dostatečně stabilní komplex, je HLA-I kompletní. Peptid musí být přichycen do žlábků dost silně, aby v něm vydržel transport a pobyt na buněčném povrchu. Pouze správně složené a naložené molekuly HLA-I se přesouvají do Golgiho aparátu (GA), kde dochází k jejich další glykosylaci a následnému transportu na plasmatickou membránu.

### 1.3.2 Struktura HLA-I

Všechny klasické HLA-I tvoří heterodimery s  $\beta_2m$  (Bjorkman *et al.*, 1987). Jejich řetězec označovaný těžký prostupuje jedenkrát membránu, zatímco  $\beta_2m$  celý komplex stabilizuje, aniž by sám zasahoval do membrány. Extracelulární část těžkého řetězce je tvořena třemi doménami  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  a  $\alpha_3$  (viz Obr. 3). Domény  $\alpha_1$  a  $\alpha_2$  jsou si velmi podobné. Navzájem spolu interagují a utváří vazebný žlábek. Doména  $\alpha_3$  je si naopak velmi podobná s  $\beta_2m$ . Obě jsou to klasické imunoglobulinové domény, které můžeme pozorovat například v molekulách protilátek. Vazebný žlábek je dlouhý 25 Å a široký 10 Å. Jeho dno je tvořeno  $\beta$ -listy, okraje pak  $\alpha$ -helixy. Vystavovaný antigen interaguje s aminokyselinovými zbytky  $\alpha$ -helixů a  $\beta$ -listů - musí být se žlábkem komplementární. Antigen však nemusí nutně interagovat se všemi aminokyselinovými zbytky žlábků, proto jedno konkrétní HLA-I (např. určitá alela HLA-A) dokáže nést skupinu různých antigenů.



**Obr. 3:** Schematická struktura HLA-I (a) a HLA-II (b) molekul (převzato a upraveno z Wiczorek *et al.*, 2017); uprostřed stužkový model vazebného žlábků HLA-I (c) (převzato z Bjorkman *et al.*, 1987); N = značí N-konec proteinového řetězce; žlutý trojúhelník = antigenní peptid ve vazebném žlábků; spirála =  $\alpha$ -helix; šipka =  $\beta$ -řetězec; tenčí linie = smyčky

### 1.4 MHC-II

Lidské MHC-II jsou kódovány v oblasti krátkého raménka šestého chromozomu, blíže k centroměře (Goldberg & Rizzo, 2015a). Klasické MHC-II molekuly jsou označovány jako HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP. Podobně jako HLA-I tvoří heterodimery, nikoli však s invariantním řetězcem. Oba partneři jsou kódováni zde, označují se jako geny A a B (HLA-DRA, HLA-DRB, atd.). Existuje mnoho alelických variant těchto genů a pro geny HLA-DRB se může na chromozomu vyskytovat až pět funkčních lokusů. Výsledná struktura HLA-II je podobná struktuře HLA-I. Při detailnějším pohledu je však patrných několik rozdílů (viz Obr. 3). Obě HLA molekuly heterodimeru procházejí membránou, protein A se skládá z domén  $\alpha_1$  a  $\alpha_2$ , protein B z domén  $\beta_1$  a  $\beta_2$ . Vazebný žlábek je utvářený doménami  $\alpha_1$  a  $\beta_1$  a je více otevřený než žlábek u HLA-I. Nakládání peptidů proto mohou být delší než 9 AMK a přesahovat žlábek.

### 1.4.1 Exprese a nakládání MHC-II antigenními peptidy

Na MHC-II molekulách jsou vystavovány převážně peptidy pocházející zvenčí, které některá z APC pohltila prostřednictvím fagocytózy, pinocytózy, receptorem zprostředkované endocytózy, trogocytózy, či pohlcením exosomů (Goldberg & Rizzo, 2015b). V případě B lymfocytů jsou vnější struktury zachytávány B receptorem a internalizovány společně s ním receptorem-indukovanou endocytózou. Dendritické buňky a makrofágy zachycují kromě patogenů také apoptotická tělíska, fragmenty z nekrotických buněk a částice opsonizované protilátkami či komplementem. Zdrojem endogenních peptidů mohou být autofagosomy. Ve všech případech se antigenní proteiny dostávají do endosomů. Jejich zrání je aktivováno PRR jako jsou Toll-like receptory (TLR), které rozpoznají přítomnost určitých PAMPs či DAMPs. Endosomy pak splývají s lysosomy, které obsahují peptidázy (aminopeptidázy, karboxypeptidázy, cathepsiny) a vzniká pozdní endosom, nebo též fagolysosom. Peptidázy naštěpí proteiny na peptidy asi 25 AMK dlouhé, dále jsou zastřiženy na délku 14 - 15 AMK. V pozdním endosomu, označovaném jako MIIC kompartment, pak dochází k naložení vzniklých peptidů do žlábků MHC-II.

MHC-II je složeno v ER, přesto nedochází k naložení žlábků endogenními peptidy - tomu brání invariantní gama řetězec (Ii), který se k heterodimeru připojuje (Obr. 1) (Neefjes *et al.*, 2011). Zároveň ho i stabilizuje a navádí směrem do fagolysosomu. Ve fagolysosomu je pak invariantní gama řetězec odštěpen cathepsinem B, ale část, která blokuje vazebný žlábek, zůstává (označuje se jako CLIP). Výměnu CLIPu za některý z antigenních peptidů katalyzují neklasické MHC-II molekuly jako HLA-DM, které umožňují výměnu CLIPu za peptid aniž by došlo k poškození struktury MHC-II. Teprve když antigenní peptid vytvoří s MHC-II dostatečně stabilní komplex, může tento být transportován na buněčný povrch váčkovým transportem.

## 2 Zkřížená prezentace antigenu - jaký je její fyziologický význam?

### 2.1 První zjištění

Zkřížená prezentace antigenů je proces, kdy jsou exogenní struktury (obvykle peptidy) prezentovány na MHC-I glykoproteinech. Aktivace CD8+ T lymfocytů tímto mechanismem se označuje jako zkřížená aktivace (cross-priming). Zkřížená aktivace jako taková byla poprvé pozorována při transplantačních experimentech již v 70. letech (Bevan, 1976). Dlouho však trvalo, než začal být koncept zkřížené prezentace obecně přijímán. Narušoval tehdejší představy o tom, jak jsou T lymfocyty aktivovány, později se vůbec nehodil do jednoduše oddělených cest MHC-I a MHC-II prezentace (Bevan, 2006).

Proto až o dvacet let později bylo dokázáno, že tento mechanismus opravdu funguje (Reis e Sousa & Germain, 1995). Na myších modelech bylo následně zjištěno, že zkřížená prezentace hraje roli nejen pro aktivaci, ale i navození tolerance u CD8+ T lymfocytů *in vivo* (Kurts *et al.*, 1997, 1996). Kurts *et al.* zde využili modelový antigen ovalbumin (OVA), jenž byl membránově vázaný exprimován v transgenní myši pod inzulinovým promotorem jako autoantigen. Samice myši exprimovala OVA v proximálním tubulu ledvin, beta

buňkách pankreatu a v brzlíku. Po injekci OVA-specifických CD8+ T lymfocytů byla detekována jejich aktivace ve spádových uzlinách OVA-exprimujících orgánů. Bylo zjištěno, že k aktivaci jsou nezbytné APC z kostní dřeně. Těchto autoreaktivních T lymfocytů však postupem času ubývalo. Při jejich fyziologických množstvích se vyvinul diabetes pouze u 1 z 12 myší (jako důsledek destrukce beta buněk pankreatu).

## 2.2 Zkříženě prezentující buňky

Mezi APC, jejichž úkolem je pomocí zkřížené prezentace aktivovat CD8+ T lymfocyty, patří zejména DC (Kurts *et al.*, 2001; Jung *et al.*, 2002), neboť právě jejich odstranění brání procesu aktivace i tolerizace CD8+ T lymfocytů. Nejedná se však obecně o všechny typy DC (Gutiérrez-Martínez *et al.*, 2015). Některé podtypy DC jsou *in vivo* schopny zkříženě prezentovat lépe za běžných nezápálivých podmínek, jiné naopak vyžadují zápalivé podmínky. Zkříženě prezentující podtypy DC jsou obvykle popisovány pomocí povrchových markerů jako CD8 $\alpha$ + či CD103+, dosud však není jasné, co konkrétně způsobuje, že prezentují lépe.

Vedle DC dovedou zkříženě prezentovat i další tělní buňky jako makrofágy, žírné buňky i neutrofil, tyto ale nejsou schopny aktivovat CD8+ T lymfocyty (Kurts *et al.*, 2010). Také B lymfocyty disponují mechanismem zkřížené prezentace (Dasari *et al.*, 2016), jeho *in vivo* role však není dosud objasněna. Zatím se zdá, že B lymfocyty by mohly s DC při aktivaci CD8+ T lymfocytů spolupracovat. Dále je známé, že jaterní endoteliální buňky dovedou pohltit exogenní antigeny pocházející z potravy či střevní mikroflóry, zkříženě je prezentovat a navodit vůči nim toleranci u CD8+ T lymfocytů (Knolle *et al.*, 2000). Co do fyziologického významu při zkřížené prezentaci *in vivo* jsou však nejlépe prostudovány DC a prakticky všechny studie týkající se mechanismu zkřížené prezentace jsou proto prováděny na nich.

## 2.3 Fyziologický význam zkřížené prezentace DC

DC jsou tedy hlavními buňkami, které mohou prostřednictvím zkřížené prezentace vystavovat na MHC-I glykoproteinech antigenní peptidy pocházející zvenčí a u CD8+ T lymfocytů tak navodit toleranci či cytotoxickou aktivaci vůči nim. Cytotoxická aktivita T lymfocytů je zásadní při eliminaci intracelulárních patogenů a nádorových buněk. Schopnost tolerance brání vzniku autoimunitních onemocnění a schopnost jejího navození je zásadní při transplantacích.

### 2.3.1 Intracelulární patogeny - viry, bakterie, parazité

V případě, že virus neinfikuje DC ale pouze určitou tkáň, CD8+ T lymfocyty nemohou být aktivovány běžnou MHC-I prezentací (Rock *et al.*, 1999). Samotné nakažené tkáňové buňky nejsou schopny CD8+ T lymfocyty aktivovat, neb sice nesou MHC-I-peptid komplexy, ale chybí jim příslušné kostimulační molekuly. Zkřížená prezentace exogenních antigenů na MHC-I v dendritických buňkách je tudíž prakticky jediným mechanismem, jak může být CTL odpověď v tomto případě generována. Příkladem může být virus Epstein-Barrové, jenž infikuje zejména B lymfocyty a v některých případech způsobuje vznik nádorů (Bickham *et al.*, 2003). V rámci DC nebyla detekována exprese virových proteinů, což vylučuje možnost jejich nakažení. V

primární fázi infekce jsou latentní virové antigeny v umírajících B lymfocytech pohlceny a zkříženě prezentovány DC, které aktivují CD8+ T lymfocyty. Ty následně efektivně potlačují rozvoj onemocnění.

Některé viry disponují mechanismy, jimiž brání klasické MHC-I prezentaci a snaží se tak uniknout imunitnímu systému, kupříkladu lidský cytomegalovirus (CMV). Ten dokáže poměrně výrazně potlačit funkci imunitního systému, přičemž zásadní je narušení funkce DC (Andrews *et al.*, 2001). CMV mimo jiné výrazně negativně ovlivňuje schopnost DC aktivovat CD8+ T lymfocyty. Bylo zjištěno, že na aktivaci CD8+ T lymfocytů specifických proti CMV se proto podílí nenakažené DC, jenž pohltí antigeny zvenčí a prostřednictvím zkřížené prezentace je vystaví na svém MHC-I (Busche *et al.*, 2013). Zkřížená prezentace hraje významnou roli i během mnohých dalších virových onemocněních, ač pravděpodobně ne tak výlučnou, jako ve výše zmíněných. Příkladem zde může být virus chřipky (Ballesteros-Tato *et al.*, 2010).

Z bakteriálních onemocnění se jedná například o tuberkulózu, způsobenou patogenem *Mycobacterium tuberculosis* (Tzelepis *et al.*, 2015). Ten ukrytý uvnitř makrofágů uniká protilátkám, komplementu i fagocytům. Pokud však nakažená buňka zahyne apoptózou, DC ji pohltí a zkříženě aktivuje CD8+ T lymfocyty, jenž mohou následně zlikvidovat zbytek nakažených buněk společně s infekcí. Existují také mnohobuněční intracelulární parazité, vůči nimž je zkřížená prezentace významným obranným mechanismem, například *Chlamydia trachomatis* (Steele *et al.*, 2004).

### 2.3.2 Tolerance

Význam zkřížené prezentace pro navození tolerance u CD8+ T lymfocytů byl po objevu na transgenním modelu myši (viz výše) ukázán i na skutečném fyziologickém autoantigenu (Luckashenak *et al.*, 2008). DC indukují toleranci u CD8+ T lymfocytů zejména v případě, kdy *nejdou* stimulovány k maturaci (Redmond & Sherman, 2005) prostřednictvím PRR, zánětlivých cytokinů či již aktivovaných T lymfocytů. Tehdy DC exprimují málo kostimulačních molekul a CD8+ T lymfocyty tak neobdrží dostatečně silný aktivační signál. Následně dochází k jejich delecii, či anergii, kdy sice v těle zůstávají, ale na antigeny nijak nereagují. Pro navození tolerance je rovněž důležitá abundance příslušného antigenu. Pokud se antigen vyskytuje v těle ve velkém množství a po dlouhou dobu, u CD8+ T lymfocytů je navozena tolerance. V některých případech však tento mechanismus evidentně selhává a DC namísto tolerance indukují rozvoj autoimunitního onemocnění. Typickým příkladem je diabetes I typu, kdy jsou prostřednictvím CTL, aktivovaných zkříženou prezentací, zlikvidovány  $\beta$  buňky pankreatu jenž produkují inzulin (de Jersey *et al.*, 2007). A konečně, v případě transplantací je zkřížená aktivace CD8+ T lymfocytů důležitým mechanismem podílejícím se na odvržení transplantátu (Sutherland *et al.*, 2011). Pokud by bylo možné zde uplatnit poznatky z fyziologické tolerogenní činnosti DC, mohly bychom transplantát před útokem CTL specificky ochránit.



### 2.3.3 Nádorová onemocnění

CD8+ T lymfocyty zkříženě aktivované vůči nádorovým antigenům jsou zásadní pro likvidaci nádorových buněk (Huang *et al.*, 1994). Samotné nádorové buňky T lymfocyty aktivovat nemůžou. Jejich fragmenty musí být pohlceny DC v rámci spádových lymfatických uzlin a vystaveny na MHC-I. Avšak v mnohých případech organismus nevytváří dostatečně silnou CTL odpověď a nádorové onemocnění se rozvíjí. Dalo by se říct, že v řadě aspektů je bující nádor příliš podobný našemu organismu, antigeny jsou přítomny trvale, současně se nevyskytují známky zánětu či patogenů, a místo aktivace je u tak T lymfocytů navozena tolerance (Lyman *et al.*, 2004).

Je zřejmé, že význam zkřížené prezentace v rámci imunitního systému je velký, a proto je dodnes velmi intenzivně studována. Kvalitní porozumění jejímu mechanismu by medicíně poskytlo nový přístup, jak léčit autoimunitní onemocnění, rakovinu či efektivně transplantovat orgány bez nutnosti celkové imunosuprese. Bohužel i přesto jak dlouho se zkřížené prezentaci nejrůznější vědecké skupiny věnují, kompletní molekulární mechanismus stále není objasněn. V následujících kapitolách se pokusím shrnout, co je o molekulárním mechanismu zkřížené prezentace doposud známo.

## 3 Základní molekulární mechanismy zkřížené prezentace

Již několikrát bylo zmíněno, že principem zkřížené prezentace je vystavit antigenní peptid pocházející z extracelulárního antigenu na MHC-I. Aby k tomuto došlo, je zřejmé, že antigen musí být nejprve naštěpen na peptidy o vhodné délce a ty se musí navázat na MHC-I molekuly. Principiálně existuje mnoho variant, jak by k něčemu takovému mohlo dojít, dnes je však obecně přijímán koncept dvou hlavních intracelulárních cest, kterými zkřížená prezentace může proběhnout - tzv. cytosolickou či vakuolární cestou. Prvním společným krokem je vždy internalizace antigenu zvenčí. Cesta cytosolická je pak charakteristická výstupem antigenu z fagosomu do cytosolu, kde dochází k degradaci prostřednictvím proteazomu. Cesta vakuolární naopak výstup antigenu z fagosomu neuvažuje, dle ní přímo ve fagosomu dochází k naštěpení na peptidy a jejich následnému navázání na MHC-I. Cytosolická cesta je v poslední době dělena ještě na dva podtypy dle místa, kde vzniklé peptidy nasedají na MHC-I. "ER cesta" předpokládá naložení v rámci ER, zatímco "fagosomální/endosomální cesta" uvažuje naložení ve fagosomu/endosomu, kam jsou nezbytné komponenty z ER dopraveny.

### 3.1 Cytosolická cesta zkřížené prezentace

První důkaz existence cesty fagosom → cytosol a v souvislosti tedy i možnosti, že by skutečně mohla existovat cytosolická cesta zkřížené prezentace, byl podán v roce 1995 (Kovacsovics-Bankowski & Rock, 1995). V roli antigenu zde vystupuje inhibitor ribosomální proteosyntézy Gelonin konjugovaný s agarosovými kuličkami. Po pohlcení kuliček s Geloninem makrofágy došlo kablokování translace. A neboť pro zastavení

translace je třeba přímé interakce mezi Geloninem a ribosomy, z výsledků vyplývá, že kuličky s Geloninem se z fagosomů musely dostat do cytosolu (Kovacsovics-Bankowski & Rock, 1995).

Po tomto objevu je nasnadě varianta, že pohlcenému antigenu, který pronikl do cytosolu, by nemuselo nic bránit v napojení se na dobře prozkoumanou cestu klasické MHC-I prezentace. Ve snaze tuto variantu ověřit vznikla řada studií. Obvykle jsou založeny na umlčení exprese či inhibici molekul, které hrají důležitou roli při klasické prezentaci na MHC-I. Pokud se cesta zkřížené prezentace na klasickou MHC-I prezentaci napojuje, měla by být rovněž ovlivněna umlčením exprese/inhibicí těchto struktur.

Kovacsovics-Bankowski et al. v tomtéž článku píše (Kovacsovics-Bankowski & Rock, 1995), že zkřížená prezentace antigenu byla narušena při inhibici proteazomu, umlčení genů pro TAP1/TAP2 a při aplikaci Brefeldinu A, který narušuje sekreční dráhu. Z těchto výsledků byla vyvozena základní koncepce cytosolické cesty zkřížené prezentace, kdy pohlcený antigen opouští fagosom, je degradován proteazomem, pomocí TAP transportován do ER, kde je naložen na MHC-I, a následně v komplexu MHC-I-peptid exportován na buněčný povrch.

### 3.1.1 Význam TAP

Význam TAP byl záhy potvrzen též *in vivo*, kdy DC izolované z myši s nefunkční TAP nebyly schopné zkříženě prezentovat (Huang *et al.*, 1996). Význam TAP pro zkříženou prezentaci však nemusí být tak zřejmý, jak se zpočátku zdálo. Je důležité si uvědomit, že pokud TAP nefunguje, MHC-I molekuly nemohou být ani klasicky nakládány a transportovány na buněčný povrch (Van Kaer *et al.*, 1992). Dnes je stále jistější, že významným zdrojem MHC-I molekul pro zkříženou prezentaci mohou být MHC-I recyklované z buněčného povrchu. Narušení zkřížené prezentace při umlčení exprese TAP tak může být pouze důsledkem nefunkčnosti klasické MHC-I dráhy jako takové.

Tuto variantu dokumentuje práce z roku 2011, kde bylo ukázáno, že při obnovení původního množství MHC-I na buněčném povrchu u TAP deficientních dendritických buněk je zkřížená prezentace cytosolickou cestou (tzn. závislou na proteazomu) opět zcela funkční (Merzougui *et al.*, 2011), pouze však tehdy, pokud je původní antigen fagocytován. Jedná-li se o antigen solubilní, který je pohlcen skrze receptorem indukovanou endocytózu, dosažení běžného množství povrchových MHC-I molekul jeho zkříženou prezentaci neobnoví. Navíc je zkřížená prezentace takového antigenu při umlčení exprese TAP zcela zablokována, kdežto u fagocytovaných antigenů je pouze snížena její intenzita. Z těchto výsledků vyplývá, že mechanismus zkřížené prezentace je významně ovlivněn typem antigenu, respektive způsobem jeho pohlcení.

Solubilní antigen v endosomu je na TAP zcela závislý a inhibicí katepsinu S je ovlivněn jen málo. Je tudíž možné, že solubilní antigen primárně putuje do cytosolu a pro naložení na MHC-I do ER, kdežto partikulární antigeny ve fagosomu mohou být naloženy rovnou tam vakuolární cestou. Poněkud matoucí je fakt, že nejen inhibice katepsinu S, ale také zablokování proteazomu výrazně (asi na čtvrtinu) snížilo

efektivitu zkřížené prezentace fagocytovaných antigenů. Pakliže se tedy oba mechanismy (jak štěpení ve fagosomu, tak v proteazomu) významně podílí na zpracování těchto antigenů, musí nejspíš existovat způsob, jak dopravit již naštěpené antigeny z cytosolu zpět do fagosomu bez potřeby TAP transportéru.

### 3.1.2 Význam proteazomu

Zapojení proteazomu do procesu zkřížené prezentace je ověřováno použitím jeho inhibitorů. Existuje však podezření, že narušení zkřížené prezentace při jeho inhibici nemusí být přímým důsledkem zapojení proteazomu, ale důsledkem nedostatku ubikvitinu (Ub). Pokud je zablokovan proteazom, budou se totiž hromadit ubikvitinylované proteiny označené takto pro degradaci. Ub se účastní též modifikace histonů a při jeho nedostatku může docházet k deubikvitinylaci a změně genové exprese, která nakonec může být tím, co ovlivní průběh zkřížené prezentace (Dantuma *et al.*, 2006).

### 3.1.3 Cesta z fagosomu do cytosolu

Model cytosolické cesty zkřížené prezentace je postaven na faktu, že obsah fagosomu se musí dostat do cytosolu. Jak k tomu ale dochází? Objevilo se několik teorií, mezi nimi např. varianta prasknutí fagosomu, která je ovšem výrazně nefyziologická. Takovýto proces by pravděpodobně spustil u DC apoptózu (Wang *et al.*, 2013). Mnohem pravděpodobnější je varianta, že na membrány fagosomů se dostává nějaký proteinový komplex, který únik proteinů z fagosomu umožňuje. Vzhledem k tomu, že dochází ke splývání fagosomů s membránami z ER (Guermontprez *et al.*, 2003), zdá se pravděpodobné, že onen proteinový komplex by mohl pocházet rovněž odtud.

V ER jeden takový komplex je, účastní se procesu označovaného jako ER-asociovaná degradace (ERAD). Proteiny v ER, které se nezvládnou složit do nativní konformace, jsou mechanismem ERAD exportovány vně ER, do cytosolu, označeny Ub a degradovány proteazomem. Je to velmi důležitý proces, neboť pokud by špatně sbalené proteiny nemohly z ER uniknout, hromadily by se zde a brzy začaly působit na buňku toxicky. Proteinový komplex těchto vlastností je přesně to, co by fagosom potřeboval k dopravě antigenů ze svého nitra do cytosolu.

Ve velmi recentním článku bylo ověřeno, že ERAD hraje při zkřížené prezentaci významnou roli, konkrétně jeho složka Sec61 (Zehner *et al.*, 2015). Administrace inhibitorů ERAD procesu (ExotoxinA a Eeyarestatin I) způsobila výrazné a specifické narušení zkřížené prezentace OVA u DC, konkrétně došlo k narušení přenosu antigenů z endosomu do cytosolu, zatímco běžná MHC-I, MHC-II prezentace, ani míra pohlcení antigenu nebyly ovlivněny. Posléze bylo tedy zjišťováno, které ze známých komponent ERAD mašinerie hrají roli při zkřížené prezentaci. Umlčení exprese Sec61 (respektive jeho alfa či gama podjednotky) způsobilo výrazné a specifické narušení zkřížené prezentace. Sec61 je translokon, který se účastní nejen ERAD procesu, ale rovněž je zcela zásadní pro základní transportní mechanismus ve směru do ER (Rapoport, 2007). Umlčení exprese takového proteinu má pochopitelně řadu důsledků (t.j. může mít

pleiotropní efekt). Zehner et al. však význam Sec61 translokonu pro zkříženou prezentaci, a konkrétně pro export jak solubilních tak partikulárních antigenů do cytosolu, elegantně prokázali. Velmi přesvědčivým důkazem bylo zablokování zkřížené prezentace, když donutili Sec61 zůstat v ER prostřednictvím ER-retenční sekvence a necestovat do endosomů, aniž by tím jakkoliv narušili jeho translokační funkci v ER.

Že se Sec61 na membránách fagosomů/endosomů obsahujících antigeny opravdu vyskytuje a tudíž může fungovat tak, jak z výsledků vyplývá, bylo již známo dříve (Ackerman *et al.*, 2003). Nebylo však známo, jak se Sec61 na fagosomální membránu dostává a Zehner et al. ukázali, že tento proces je závislý na signalizaci přes TLR. Přítomnost Sec61 translokonu ve fagosomech/endosomech je tedy ovlivněna přítomností mikrobiálních struktur ve fagosomech/endosomech, které signalizaci skrz TLR iniciují.

Závěrem lze říci, že dnešní koncept cytosolické cesty se od původního trochu liší. Zůstává transport antigenu do cytosolu a jeho degradace proteazomem. Není však jisté, kde dochází k naložení antigenu na MHC-I (Obr. 4). Ve hře jsou kromě ER také endocytické kompartmenty, kam jsou komponenty PLC dopravovány (Cebrian *et al.*, 2011). Je pravděpodobné, že lokalizace naložení antigenu záleží na konkrétní situaci, tzn. na typu antigenu, způsobu jeho pohlcení, konkrétní cytokinové situaci, typu DC a podobně (van Endert, 2016).

### 3.2 Vakuolární cesta

První článek dokumentující proces vakuolární cesty ukazuje, že ke zkřížené prezentaci antigenu dojde v makrofázích zcela nezávisle na klasické MHC-I prezentaci a transportu sekreční dráhou mezi ER a GA (Pfeifer *et al.*, 1993). Bakterie exprimující fúzní proteiny s OVA byly myšimi makrofágy fagocyticky pohlceny a následně zkříženě prezentovány i přes inhibici klasické MHC-I prezentace cykloheximidem a užití brefeldinu A (inhibitor sekreční dráhy mezi ER a GA). Na snímcích z elektronového mikroskopu je vidět, že fagosomy obsahující bakterie záhy splývají s lysosomy a ani po hodině nedošlo k viditelnému úniku bakteriálních antigenů do cytosolu. Autoři článku navrhnou, že podobně jsou nejspíš zpracovány též další antigeny "částicového" charakteru jako savčí buňky či latexové kuličky konjugované s antigeny. Rezistence k brefeldinu A naznačuje, že MHC-I molekuly použité ke zkřížené prezentaci musí pocházet z kompartmentů v sekreční dráze postavených až za Golgiho aparát. V úvahu tedy přichází plasmatická membrána, endocytické a recyklující kompartmenty. Článek pracuje také s variantou zpětného vyvrhnutí zpracovaných antigenů ven z buňky, kde by se mohly navázat na MHC-I, tato varianta však byla pozdějšími pracemi vyvrácena.

Další podobně zaměřená práce byla zveřejněna o tři roky později (Song & Harding, 1996), opět na makrofázích s využitím OVA na latexových kuličkách, či exprimovaného v bakteriích. Kromě zablokování proteazomu a dráhy ER-GA, které nevedlo k narušení zkřížené prezentace, byla umlčena také exprese TAP. Prvotním záměrem bylo pravděpodobně ukázat, že ani TAP není pro vakuolární cestu podstatná. Zjistilo se však, že její umlčení sice neblokuje zkříženou prezentaci zcela, ale vede ke snížení intenzity tohoto procesu.

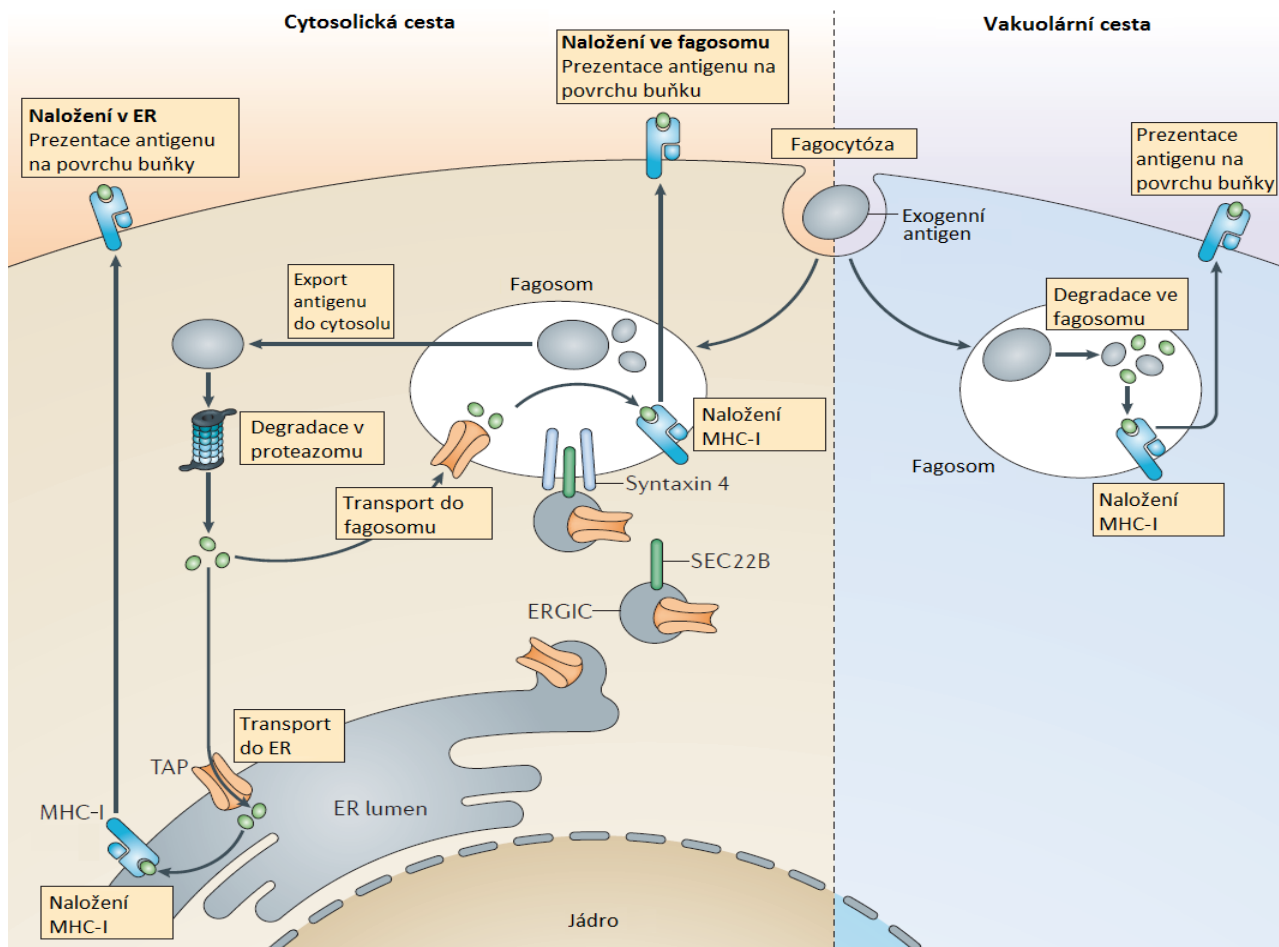
Teprve po inkubaci TAP-deficientních makrofágů ve 26°C došlo k obnovení běžné intenzity zkřížené prezentace. S vysvětlením tohoto jevu přichází v poměrně recentním článku Merzougui et al. (Merzougui et al., 2011). Inkubace APC při této teplotě vede k obnovení běžných množství MHC-I-peptid komplexů na plasmatické membráně. A právě recyklované MHC-I z PM se zdají být pravděpodobným zdrojem pro zkříženou prezentaci vakuolární cestou (Nair-Gupta et al., 2014).

O deset let později je identifikován katepsin S jako klíčový hráč tohoto procesu (Shen et al., 2004). Autoři využili modelový antigen OVA obalený biodegradovatelným polymerem. Takto upravený ho DC zkříženě prezentovaly vakuolární cestou - bez potřeby TAP či proteazomu. Při současném zablokování cysteinových proteáz, konkrétně katepsinu S, se zkřížená prezentace zastavila zcela. Bohužel z dnešního pohledu je požadavek na TAP poněkud kontroverzní, poněvadž vakuolární cesta pravděpodobně využívá recyklované MHC-I molekuly. Proto není možné vyvozovat z jejich výsledků nic moc dalšího, než zásadní význam katepsinu S při zpracování antigenů uvnitř fagosomu.

Efektivita vakuolární cesty zkřížené prezentace se zdá nižší, než v případě cesty cytosolické (van Endert, 2016). Při zpracování pohlčeného antigenu na krátké peptidy se uplatňují fago/endolysosomální proteázy. Je možné, že řada potenciálních antigenních epitopů je takto zničena a proto se efektivita oproti cytosolické cestě snižuje. Vzniklé peptidy jsou následně přímo ve fagosomu nakládány na MHC-I. Obecně se tento proces hodně překrývá s MHC-II prezentací. Jaký je však skutečný význam vakuolární cesty oproti cytosolické cestě není známo. Zdá se, že vakuolární cesta se uplatňuje spíše, pokud APC pohltní velké množství antigenů (Gutiérrez-Martínez et al., 2015). Mohla by se tudíž primárně uplatňovat při zpracování velkých fagocytovaných objektů, jako jsou celé buňky.

### 3.3 Závěrem kapitoly

Shrnutu dohromady, na Obr. 4 jsou znázorněny základní principy cytosolické (vlevo) a vakuolární (vpravo) cesty zkřížené prezentace. Z dostupné literatury je zatím bohužel nemožné vyvodit, jak přesně zkřížená prezentace v konkrétním případě probíhá. Je to proces složitý, založený na komunikaci mezi fagocytózou, endocytózou a klasickou MHC-I prezentací. Je rovněž ovlivněný řadou aspektů, mezi nimiž je velmi významný způsob pohlčení antigenu.



**Obr. 4:** Základní rozdíly mezi cytosolickou a vakuolární cestou zkřížené prezentace (převzato a upraveno z Joffre et al. 2012). Antigen přicházející zvenčí, který je v obou případech nejprve pohlcen, se dostává do fagosomu. Při vakuolární cestě zkřížené prezentace je zde naštěpen, naložen na MHC-I a prezentován na buněčném povrchu, aniž by se dostal do styku s cytosolem. Při cytosolické cestě je antigen exportován do cytosolu, kde je rozštěpen v proteazomu. Vzniklé peptidy pak mají dvě možnosti, kde mohou být naloženy na MHC-I, buď v ER, nebo ve fagosomu.

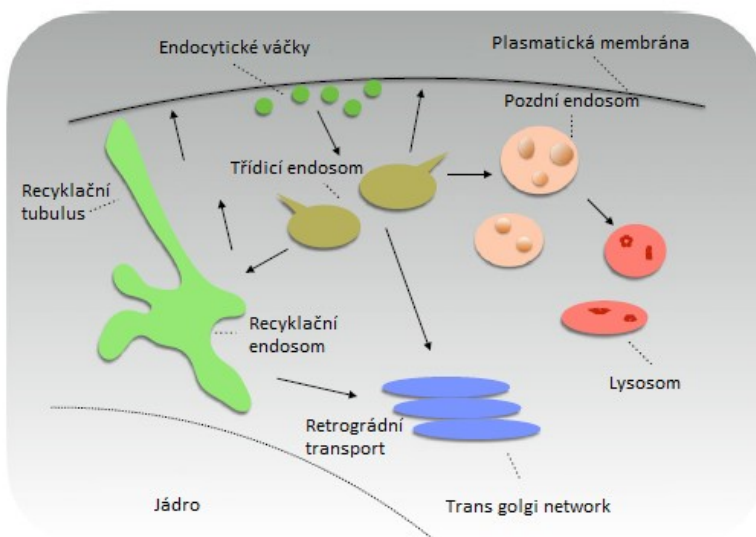
## 4 Nejdiskutovanější adaptace DC na zkříženou prezentaci

Když DC pohltí nějakou vnější strukturu, dochází ke vzniku intracelulárního membránového útvaru označovaného jako endosom v její cytoplasmě. Pokud se jednalo o větší strukturu (např. celou bakterii), obvykle se užívá označení fagosom. Záhy po vzniku se jedná o endo/fagosomy časně, ty posléze takzvané zrají v endo/fagosomy pozdní až nakonec splývají s lysosomy a dochází k degradaci jejich obsahu (Obr. 5). Obsah časných endosomů bývá pouze slabě kyselý, směrem k lysozomu pH váčku postupně klesá až k pH 5. Peptidy, které jsou vystavovány při zkřížené prezentaci, musí endocytickými váčky projít, než se dostanou na MHC-I molekuly. Proto problematika endo/fagosomů, jejich okyselování, splývání s dalšími váčky, obohacování o další aktivní proteiny, a podobně, je v souvislosti se zkříženou prezentací studována. Za jeden ze základních důvodů, proč dendritické buňky ve zkřížené prezentaci vynikají nad jiné APC, je totiž

považována schopnost udržet pohlcené antigeny po dlouhou dobu nenaštěpené a vystavitelné epitopy tak nepoškozené.

**Obr. 5:** Schematické znázornění možných osudů endosomů a jejich obsahu (převzato a upraveno z van Endert 2016).

Endocytické váčky vznikají jako vchlípeniny plasmatické membrány, kterýžto proces může být facilitován strukturálním proteinem klathrinem (např. internalizace transferrinového receptoru), či nikoliv (např. MHC-I). Po odstranění obalového proteinu pak váčky fúzí a dávají vznik takzvaným třídícím endosomům. Tento název souvisí s pozorováním, že v tomto kompartmentu jsou například oddělovány receptory od jejich nákladu, obsah váčky je tedy tříděn podle toho, co chce buňka zachovat a co degradovat. Panuje zde poněkud kyselější pH, které umožňuje oddělení receptorů od nákladu



Receptory obvykle putují buď do endosomů recyklačních, odkud jsou transportovány zpět na plasmatickou membránu, nebo mohou být na plasmatickou membránu poslány přímo, tzv. rychlou recyklační cestou. Co je méně obvyklé, neb vyžaduje speciální transportní signály, je transport receptorů do lysosomů či GA. Náklad je naopak často zpracován v pozdních endosomech splývajících s lysosomy. V imunologické literatuře je toto rozdělení různých typů endosomů obvykle zjednodušováno, kdy recyklující a třídící endosomy jsou slučovány dohromady a označovány jako endosomy časné.

#### 4.1 Nižší proteolytická aktivita ve fagosomech a endosomech DC favorizuje zkříženou prezentaci.

Již dlouho je známo, že právě u DC oproti makrofágům je výrazně omezena aktivita lysosomálních proteáz a tato skutečnost je zároveň velmi prospěšná pro účinnost antigenní prezentace (Delamarre *et al.*, 2005). Po imunofluorescenčním značení jednotlivých proteáz *in situ* v rámci sekundárních lymfatických orgánů myši a následně i pomocí imunoblotu bylo ukázáno, že různé katepsiny i asparaginové endopeptidázy jsou mnohem více exprimovány makrofágy než DC. Následně byla proteolytická aktivita otestována na samotných pohlcených strukturách, kdy po pohlcení zeleného fluorescentního proteinu (GFP) navázaného na nedegradovatelný dextran byla jedna třetina DC i po 20 hodinách stále GFP pozitivní, naopak prakticky všechny makrofágy v té době GFP již degradovaly a fluorescence tak u nich nebyla měřitelná. Podobně tomu bylo též při pohlcení OVA.

Pozitivní ovlivnění klasické antigenní prezentace (přes MHC-II) nižší proteolytickou aktivitou bylo elegantně prokázáno pomocí páru antigenů, které se lišily pouze v náchylnosti k proteolytické degradaci. Vybraný pár antigenů byl stejnou měrou pohlcován, avšak ten náchylnější k degradaci byl i u DC po několika hodinách rozštěpen. Stabilnější antigen naopak vytrval a bylo pozorováno, že byl mnohem efektivněji prezentován T lymfocytům. Bylo navrženo, že snížená proteolytická aktivita nejspíše uchovává pohlcené

antigeny s jejich potenciálními epitopy, což může být podstatné zejména pro DC, které putují do lymfatických uzlin několik dní a postupně shromažďují materiál k prezentaci (Delamarre *et al.*, 2005).

Chatterjee *et al.* se následně zaměřili na význam zjištěného konkrétně pro účinnost zkřížené prezentace u DC (Chatterjee *et al.*, 2012). Studovali antigeny internalizované receptorem zprostředkovanou endocytózou, jejichž zkřížená prezentace byla závislá na degradaci v proteazomu. Receptor CD40, který navádí pohlcený materiál do časných endosomů byl shledán mnohem efektivnějším pro následnou zkříženou prezentaci, než receptor DEC205, který navádí antigeny naopak do endosomů pozdních. Jednalo se přitom o identické antigeny, které byly pouze pomocí protilátek zacíleny na různé povrchové receptory DC.

Zacílení na CD40 receptor přitom nevedlo ke stimulaci maturace DC, která by mohla vysvětlovat zvýšení účinnosti zkřížené prezentace. Rozdíl byl vskutku v cílovém kompartmentu a intenzitě jeho proteolytické činnosti. V pozdních endosomech byly komplexy protilátek s antigeny degradovány dříve, než se mohly dostat do cytosolu, kde by je rozštěpil proteazom a vznikly by tak peptidy vhodné pro nasednutí na MHC-I molekuly. Časně endosomy, jako kompartment s nízkou proteolytickou aktivitou, byly vhodnějším místem pro uchování antigenů k následné zkřížené prezentaci. Ale i pozdní endosomy byly zkřížené prezentace v malé míře schopné. Dokonce po omezení proteolytické aktivity pozdních endosomů se výrazně zvýšila účinnost zkřížené prezentace antigenů do nich cílených, což naznačuje, že překážkou je opravdu pouze předčasná degradace. Pokud byly podány příliš vysoké dávky inhibitorů proteáz, narušilo to i zkříženou prezentaci antigenů cílených na CD40. Z toho vyplývá, že určitá malá míra degradace je před exportem do cytosolu potřeba.

## 4.2 Činnost NADPH oxidázy na fagosomální membráně je zásadní pro zkříženou prezentaci.

Z výše zmíněných prací lze vyvodit, že specializace DC ke zkřížené prezentaci spočívá v "nízko-proteolytickém" obsahu endosomů. Nižší pH společně s lysosomálními proteázami, které endosomy získávají během zrání, vede běžně k účinné degradaci obsahu původního váčku, ale DC jsou tento proces schopné zřejmě efektivně zpomalit. Jeden z dalších mechanismů, vedle nízké koncentrace proteáz, který k zachování potenciálních epitopů přispívá, je produkce reaktivních kyslíkových sloučenin (ROS) NADPH oxidázou v endo/fagosomech dendritických buněk (Savina *et al.*, 2006; Mantegazza *et al.*, 2008).

Většina lysosomálních proteáz, které štěpí obsah endo/fagosomu, má kyselé pH optimum (Appelqvist *et al.*, 2013). K okyselování dochází zejména prostřednictvím membránového přenašeče, který koncentruje protony z cytosolu uvnitř váčku na úkor spotřeby ATP, obvykle je označován jako V-ATPáza. Vedle něj se na membránách fagosomů nachází i další protonové kanály. U makrofágů dochází k velmi rychlé acidifikaci fagosomů, která vede k výrazné aktivaci lysosomálních proteáz. U neutrofilů, což jsou velmi významné fagocyty, a DC je na fagosomálních membránách přítomen proteinový komplex NADPH oxidázy, označovaný jako NOX2. Tato NADPH oxidáza přenáší elektrony z cytosolického NADPH přes fagosomální



membránu a produkuje superoxidový anion dovnitř fagosomů. Ten se následně mění v další ROS jako je peroxid vodíku a jiné a přitom spotřebovává přítomné protony. Ve výsledku tedy činností NOX2 dochází nejen k produkci ROS, které zabíjejí mikroorganismy ve fagosomech neutrofilů (proces označovaný jako oxidativní vzplanutí), ale zároveň jsou spotřebovávány protony a pH uvnitř fagosomů rapidně roste až k pH 8. To však v případě neutrofilů netrvá dlouho a záhy pH klesá, aby proteázy mohly efektivně štěpit.

DC exprimují NOX2 mnohem méně než neutrofilů. Produkce ROS by u nich proto nejspíše nebyla dostačující k zabití případných mikroorganismů, ale ke zvýšení pH by stačit mohla. A právě prostřednictvím pH je pravděpodobně možné proteázy s kyselým optimem ve fago/endosomech DC efektivně regulovat. Tak, aby pohlcené proteiny byly naštěpeny pouze do té míry, která usnadní transport do cytosolu, a přitom maximum potenciálních epitopů bude zachováno.

Savina et al. použili v práci na toto téma jako antigen latexové kuličky pokryté fluorescenční značkou, buď citlivou (při kyselém pH nesvítící) či necitlivou k pH (Savina *et al.*, 2006). Porovnáním jejich fluorescencí byla odečtena míra okyselení fagosomů. Takto bylo nejprve znovu ověřeno, že u DC je okyselování fagosomů obecně pomalejší než u makrofágů a rovněž bylo možno odvodit konkrétní střední hodnotu pH fagosomů daných buněk. Již po půl hodině od pohlcení prvních kuliček s fluorofory se pH fagosomů makrofágů snížilo pod 6, kdežto u DC pH vzrostlo nad 7, kde se drželo ještě tři hodiny po pohlcení kuliček. Evidentně tedy u DC není pouze narušeno okyselování, ale musí docházet přímo k alkalizaci obsahu váčku. To bylo potvrzeno zablokováním V-ATPázy, jejímž prostřednictvím dochází k okyselování fagosomů. I nízká koncentrace inhibitoru V-ATPázy (Konkanamycinu B) vedla k ještě výraznější alkalizaci pH uvnitř fagosomů DC, kdežto u makrofágů taková koncentrace inhibitoru pH prakticky neovlivnila; až při vysoké koncentraci došlo u makrofágů pouze k neutralizaci fagosomálního pH.

Tedy u DC, na rozdíl od makrofágů, existuje mechanismus aktivní alkalizace fagosomů, který se projevuje výrazněji, pakliže je zablokovaná hlavní mechanismus acidifikace. Za účelem potvrzení tušené role NOX2 byla nejdříve prostřednictvím mikroskopie studována její lokalizace uvnitř DC. Její podjednotky byly za klidových podmínek nalezeny roztroušeny v buňce, po fagocytóze antigenu se však záhy přesunuly do vzniklých fagosomů, což bylo potvrzeno i western-blotem purifikovaných fagosomů. Navíc bylo zjištěno, že komplex NOX2 je na fagosomální membráně plně funkční.

Následně byly zkoumány DC izolované z myši, u níž byla umlčena exprese důležité podjednotky NOX2. Zde nebyla alkalizace fagosomů vůbec pozorována, a to ani při zablokování V-ATPázy. Naopak nefunkčnost NOX2 vedla k rychlému okyselování obsahu fagosomů, neboť aktivita V-ATPázy převážila, a OVA ve fagosomu byl rychleji degradován. Při zaměření se na ovlivnění zkřížené prezentace bylo zjištěno, že je při inhibici či umlčení exprese NOX2 narušena aktivace příslušných CD8+T lymfocytů specifických k peptidu z OVA. Účinnost zkřížené prezentace byla obnovena, pokud byla nefunkčnost NOX2 vyvážena částečnou inhibicí lysosomálních proteáz. Bylo tedy zjištěno, že NOX2 se dostává na membrány fagosomů myších DC,

zajišťuje alkalizaci fagosomů, udržuje pH vyšší než 7 a působí tak proti aktivitě V-ATPázy a proteáz. Tím zajišťuje, že pohlcené antigeny jsou degradovány v menší míře a zvyšuje efektivitu zkřížené prezentace.

Mantegaza et al provedli analogickou studii na lidských DC (Mantegazza *et al.*, 2008). Od lidských jedinců s vrozenou nefunkčností NOX2 (toto onemocnění je známo jako chronická granulomatózní choroba (CGD)) byly získány od monocytů odvozené DC a jejich vlastnosti byly porovnány s DC od zdravých jedinců a s makrofágy. Oproti studii na myších bylo nalezeno několik rozdílů. Lidské makrofágy exprimují více NOX2 než DC, ve velké míře ji rekrutují na fagosomy a ve výsledku produkují ve fagosomech asi 10-krát více ROS než DC. Přesto se obsah jejich fagosomů rychle okyseluje, tak jak je tomu i u myší. Toto zjištění bylo posléze částečně vysvětleno současnou vysokou expresí a rekrutací V-ATPázy, která alkalizační efekt aktivity NOX2 dostatečně potlačuje. DC mají na fagosomech mnohem méně V-ATPázy, neboť i při zablokování NOX2 inhibitory se jejich fagosomální pH okyseluje výrazně méně než u makrofágů. Dokonce u DC z pacientů s CGD nedošlo k acidifikaci téměř vůbec, přestože NOX2 u nich ve fagosomech nefunguje. Zřejmě zde tedy významnou roli vedle produkce ROS hraje i nízká aktivita či rekrutace V-ATPázy, případně nějakého dalšího protonového přenašeče. Ve studii byla prozkoumána role NOX2 též v endosomech lidských DC. Bylo zjištěno, že NOX2 se nachází hlavně na membránách časných endosomů a produkuje zde ROS podobně jako ve fagosomech, ačkoliv její role zde není tak markantní. V endosomech pozdních již nefunkčnost NOX2 nemá výrazný efekt na míru okyselování. Jak endosomy dozrávají, mění se podíl NOX2 a V-ATPázy na jejich membráně ve prospěch protonové pumpy.

Každopádně DC z pacientů s CGD nebyly schopné alkalizace fagosomů a zkřížená prezentace antigenů u nich byla narušena. Ve výsledku bylo tedy zjištěno, že i u lidských DC je NOX2 důležitým hráčem při zkřížené prezentaci antigenů, protože blokuje přílišné okyselení fagosomu a tím aktivaci řady proteáz. Tento efekt byl méně výrazný než u myší, což může být důsledkem variability napříč různými pacienty, kdy v některých případech mohla být NOX2 zbytkově aktivní. Autoři studie také navrhují, že pozitivní role vyššího pH pro zkříženou prezentaci antigenů může být vysvětlována i jinak, než jen prostřednictvím inhibice přílišné aktivity proteáz. Je možné, že některý z mechanismů, který je ke zpracování antigenu nezbytný, jako transport antigenu do cytosolu, či samotné nasedání hotových peptidů na MHC-I molekuly, je nízkým pH blokován.

#### **4.2.1 Malé GTPázy Rab27a a Rac2 jsou důležité pro funkci NOX2 na fagosomální membráně.**

Bylo pozorováno, že NOX2 se na fagosomy a endosomy dostává záhy po jejich vzniku. Jak je tento proces rekrutace regulován? Bylo zjištěno, že zásadní roli hraje GTPáza Rab27a (Jancic *et al.*, 2007). Nachází se společně s membránovými podjednotkami NOX2 ve váčcích příbuzných lysosomům. Tyto záhy splývají se vzniklými fagosomy/endosomy a jak NOX2, tak Rab27a je detekovatelná v purifikovaných fagosomech. U DC z Rab27a-deficientní myši je NOX2 dopravována do fagosomů/endosomů v menší míře, je produkováno méně ROS a zkřížená prezentace je narušena. Tento efekt lze zvrátit, jestliže je vnitřní pH váčků neutralizováno prostřednictvím inhibitoru V-ATPázy. Pokud je v Rab27a-deficientních DC obnovena exprese

této GTPázy, je obnoveno běžné množství ROS produkovaných ve fagosomech. Nefunkčnost Rab27a nijak neovlivňuje klasickou prezentaci na MHC-I, ani zkříženou prezentaci již hotových peptidů, jež není třeba nijak upravovat před nasednutím na MHC-I. Tato GTPáza tedy zajišťuje transport NOX2 na membrány fagosomů prostřednictvím fúze vezikulů podobných lysosomům s vzniklými fagosomy. K rekrutaci NOX2 navíc dochází nezávisle na signalizaci skrze TLR (Nair-Gupta *et al.*, 2014).

Další identifikovanou molekulou, která se podílí na funkci NOX2 ve fagosomech je GTPáza Rac2 (Savina *et al.*, 2009). Zajišťuje správné sesednutí komplexu NOX2 na fagosomální membráně, který sestává z několika membránových a cytosolických podjednotek. Tato GTPáza svou roli plní u CD8+ DC, naopak u CD8- DC je místo ní přítomna Rac1, která sice napomáhá složení komplexu NOX2, avšak na plasmatické membráně. Rac2 by tedy mohla být i jedním z důvodů, proč jsou CD8+ DC obecně shledávány ke zkřížené prezentaci lépe adaptované (Schnorrer *et al.*, 2006).

#### 4.2.2 Mechanismus, kterým NOX2 napomáhá zkřížené prezentaci, však není jednoznačně jasný.

Naproti těmto studiím stojí recentnější výzkum, kde je ukázáno, že NOX2 ovlivňuje aktivitu fagosomálních cysteinových proteáz přímo, skrze redoxní reakce a nikoliv prostřednictvím pH (Rybicka *et al.*, 2012). Tato vědecká skupina se již dříve zaměřila na význam NOX2 ve fagosomech makrofágů, kde k alkalizaci nedochází, a prokázali zde snížení proteolytické aktivity skrze oxidaci cysteinových katepsinů (Rybicka *et al.*, 2010). Totéž ukazují v této studii na myších DC (Rybicka *et al.*, 2012). Cysteinové katepsiny (B, S, L) vyžadují pro svou aktivitu redukční prostředí, které NOX2 produkcí ROS narušuje. Současně je narušena také redukce disulfidických můstků, což může rovněž hrát roli při zpracování antigenů. Vliv NOX2 lze zvrátit přidáním redukčních agens jako je redukovaný glutation či 2-merkapt ethanol, což potvrzuje její hlavní roli ve tvorbě oxidativního prostředí.

Sami autoři navrhnou, že se zřejmě jedná o další mechanismus, jak NOX2 reguluje proteolytické vlastnosti fagosomů. To, že nebyl pozorován nárůst pH přisuzují odlišnému experimentálnímu uspořádání, ve kterém bylo pH fagosomů měřeno. Přestože podnikli řadu experimentů ve snaze zopakovat výsledky Savina *et al.*, neuspěli. Ve prospěch svých výsledků argumentují, že jelikož aktivita NOX2 ve fagosomech vede k produkci záporně nabitého superoxidového aniontu, musí být nějak udržována uvnitř fagosomů elektroneutralita, pokud má být funkce NOX2 zachována. A bylo zjištěno, že elektroneutralizačním procesem je zde zejména vstup protonů. Aktivita NOX2 byla výrazně narušena, pokud byla zablokována V-ATPáza společně s dalším protonovým kanálem Hv1. Na jeden vzniklý superoxidový anion by tak byl spotřebován jeden proton při vzniku peroxidu vodíku (mechanismus alkalizace), ale zároveň by jeden proton vešel dovnitř fagosomu (mechanismus udržení elektroneutrality). Tedy ve výsledku by se pH vůbec neměnilo, což podporuje jejich pozorování. Z analýzy literatury je ovšem patrné, že tento model působení NOX2 je hůře akceptován, než výsledky výzkumů a modely z laboratoře Sebastiana Amigoreny (Savina *et al.*, 2006;

Mantegazza *et al.*, 2008; Jancic *et al.*, 2007; Savina *et al.*, 2009). Jak je vidno, mechanismus působení NOX2 ve zkřížené prezentaci je nejasný a заслужuje další hlubší a nezávislou analýzu.

### 4.3 Další principy regulace proteolytické aktivity během zkřížené prezentace

Teprve nedávno bylo zjištěno, že DC aktivované skrze TLR jsou schopné zabránit značnému přísunu lysosomálních proteáz do fagosomů znemožněním fago-lysosomální fúze (Alloatti *et al.*, 2015). Po stimulaci DC skrze TLR bylo pozorováno zvýšení účinnosti zkřížené prezentace OVA a shlukování lysosomů okolo buněčného jádra. Fagosomy obsahující pohlcený OVA byly od lysosomů oddělené, nesplývaly s nimi a OVA nebyl příliš degradován. Jako hlavní regulátor těchto pozorování byla identifikována GTPáza Rab34, neb po jejím umlčení ke shlukování lysosomů nedošlo a pohlcený OVA byl záhy degradován. Rovněž účinnost zkřížené prezentace OVA se tak snížila oproti stimulovaným DC. K zablokování fago-lysosomální fúze tedy dochází po stimulaci TLR prostřednictvím GTPázy Rab34, jenž zajišťuje nahloučení lysosomů v oblasti okolo jádra.

Naopak transkripční faktor TFEB reguluje účinnost zkřížené prezentace negativně (Samie & Cresswell, 2015). Stimuluje expresi lysosomálních proteáz a struktur odpovědných za acidifikaci fagosomů, čímž umocňuje proteolytickou aktivitu a degradaci pohlcených antigenů. Jeho aktivace namísto zkřížené prezentace podporuje antigenní prezentaci na MHC-II. U DC dochází k aktivaci TFEB dlouho poté, co pohltily původní antigen, jenž je stimuloval prostřednictvím TLR ke zkřížené prezentaci. V tom okamžiku jsou již antigenní peptidy v komplexu s MHC-I vystaveny na povrchu pro CD8+ T lymfocyty a exogenní antigeny tak mohou začít být zpracovány i pro CD4+ T lymfocyty. Autoři této studie navrhují, že TFEB funguje jako molekulární přepínač mezi zkříženou a MHC-II prezentací, které obě zpracovávají exogenní antigeny, stimulují však imunitní systém odlišně.

### 4.4 Endosomy účastníci se zkřížené prezentace obsahují peptidázu IRAP.

Dalším typickým znakem endosomů, které se účastní zkřížené prezentace v DC, je peptidáza IRAP (insulin-regulated aminopeptidase), kterou obsahují (Saveanu *et al.*, 2009; Weimershaus *et al.*, 2012). Pokud není tato aminopeptidáza exprimována, zkřížená prezentace je narušena. Její jméno je odvozeno od již dříve zjištěného výskytu v recyklujících endosomech adipocytů a svalových buněk společně s glukózovým přenašečem Glut4. Pro problematiku zkřížené prezentace je však zejména podstatné, že IRAP je peptidáza příbuzná peptidázám ERAP1 a ERAP2, které jsou důležité při nakládání MHC-I molekul endogenními peptidy v ER, kde je jejich rolí finální zastřižení peptidů vzniklých v proteazomu na vhodnou délku.

Bylo zjištěno, že IRAP má v porovnání s ERAPy širší spektrum substrátů, které je schopna štěpit a svou aktivitou se vyrovná ERAP1 a ERAP2 dohromady. Z DC byla koimunoprecipitována s MHC-I molekulami a na fluorescenčních snímcích je zřetelná jejich částečná kolokalizace v buňkách. IRAP se nachází se v endosomech, naopak s lysosomálními markery či s MHC-II molekulami IRAP kolokalizována není. Ani v rámci ER nebyla za klidových podmínek detekována. Ačkoliv skrz ER zřejmě musí projít, nejspíše jej velmi záhy

opouští a putuje do endosomálního recyklujícího kompartmentu, kde je kolokalizována s GTPázou Rab14. Tyto "zásoby" IRAP jsou u CD8+ DC rozsáhlejší než u CD8- DC, mohlo by se tedy jednat o další adaptaci CD8+ DC na zkříženou prezentaci. Po fagocytóze antigenu se IRAP významně hromadí v časných fagosomech DC. Zároveň se pohybuje společně s MHC-I molekulami, které jsou recyklovány z buněčného povrchu. Po fúzi fagosomů s membránami z ERGIC (ER-Golgi střední kompartment), kterýmžto procesem jsou do fagosomů přiváděny ER-rezidentní proteiny nezbytné pro nakládání MHC-I molekul, je IRAP kolokalizována s TAP, ale nikoliv s ERAP. Z toho se dá usuzovat, že ERAP zřejmě z ER nepřichází a IRAP by tak mohla ve fagosomech vskutku suplovat její funkci.

U DC z myši, u nichž byla exprese IRAP zablokována, bylo zjištěno narušení zkřížené prezentace OVA ve fagosomech (OVA byl součástí buněk či latexových kuliček), jenž probíhala cytosolickou cestou (v závislosti na proteazomu a TAP). Toto negativní ovlivnění bylo srovnatelné se situací, kdy nebyla exprimována ERAP. Navíc pokud nebyla exprimována ani ERAP ani IRAP, zkřížená prezentace byla narušena výrazněji, přičemž tento efekt byl vzhledem k efektům jednotlivých peptidáz aditivní (Saveanu *et al.*, 2009). Z těchto výsledků vyplývá, že se jedná o dvě na sobě nezávislé cesty, jimiž fagocytované antigeny mohou být v DC finálně zastřiženy - v ER pomocí ERAP, či v endosomu/fagosomu pomocí IRAP.

## 5 Vnitrobuněčný transport komponent mašinerie pro nakládání MHC-I molekul

V kapitole o základních molekulárních mechanismech zkřížené prezentace bylo v závěru zmíněno, že dnes není s jistotou známo, kde dochází k nakládání antigenních peptidů na MHC-I při cytosolické cestě. Vedle ER, které se zpočátku zdálo jediným možným místem, se totiž objevila další varianta - k nakládání by mohlo docházet ve fagosomech, jimiž antigeny do DC vstoupily. Oproti nakládání MHC-I molekul v ER tato varianta přináší nespornou výhodu; antigenní peptidy vznikající naštěpením pohlcených částic nemusí kompetovat se spoustou endogenních peptidů a exogenních peptidů z jiných fagosomů, jak tomu je, když vše probíhá společně v ER. Takto se můžou jednotlivé fagosomy plně "soustředit" na svůj náklad a jeho zkříženou prezentaci. Jak však tato myšlenka vznikla? Hlavním impulzem bylo překvapivé zjištění, že fagosomy obsahují prakticky všechny proteiny, které jsou součástí PLC, tedy mašinerie účastníci se nakládání antigenních peptidů na MHC-I v ER (Houde *et al.*, 2003; Ackerman *et al.*, 2003; Guermonprez *et al.*, 2003).

Na základě proteomických studií bylo nejprve zjištěno, že fagosomy z makrofágů obsahují proteiny jako Ub-ligázy, proteazomy, TAP komplexy, MHC-I molekuly i Sec61 (Houde *et al.*, 2003). Proteazomy byly asociovány s fagosomy zvenčí společně s polyubikvitinylovanými proteiny. Ty by po rozštěpení proteazomem mohly vstupovat zpět do fagosomu skrz TAP komplex, kde nasednou na MHC-I molekuly.

Podobně i u DC byly v rámci časných fagosomů nalezeny komponenty PLC a další ER-rezidentní proteiny (Ackerman *et al.*, 2003; Guermonprez *et al.*, 2003), MHC-I molekuly, kalretikulin, kalnexin, tapasin,

Erp57, TAP 1/2 a Sec61/62. Součástí časných fagosomů se staly velmi záhy po pohlcení antigenu, prostřednictvím fúze membrán ER a fagosomu. PLC byl ve fagosomech navíc funkčně propojen a byl schopen katalyzovat nakládání MHC-I molekul. Na základě těchto zjištění byla rozvinuta teorie o nakládání antigenních peptidů na MHC-I ve fagosomech, kdy je antigen v cytosolu naštěpen proteazomem, pomocí TAP se dostávají vzniklé peptidy zpět do fagosomu, a zde je PLC nakládá na MHC-I molekuly. Po úspěšném nasednutí peptidu na MHC-I je komplex přenesen na buněčný povrch, aniž by se vracel do ER. Komplexy MHC-I:peptid bylo dokonce možné ve fagosomech detekovat. Navíc bylo zjištěno, že i solubilní antigeny se dostávají do váčků, které obsahují komponenty z ER, tudíž tato teorie nebyla nutně omezena jen na velké fagocytované antigeny. Postupem času časné fagosomy dozrávaly ve fagolysosomy a množství ER-rezidentních proteinů v nich klesalo. Pravděpodobně jsou rozštěpeny při umocňující se proteolytické aktivitě ve fagolysosomech.

Jak dochází k fúzi membrán ER a fagosomů u DC bylo objasněno teprve nedávno. Nedochází k tvorbě fagosomů za přispění membrán ER, ale komponenty z ER se do fagosomů dostávají váčkovým transportem (Cebrian *et al.*, 2011). Respektive nejde přímo o membrány ER, ale ER-Golgi středního kompartmentu (ERGIC), kde se ER rezidentní proteiny nezbytné pro zkříženou prezentaci shlukují. Specifitu váčkového transportu zajišťuje párování proteinu Sec22b (ERGIC) a Syntaxinu 4 (fagosomy/endosomy). Sec22b je SNARE protein a neboť zajišťuje transport ER rezidentních proteinů z ERGIC nejen do fagosomů, ale i do endosomů, tento proces je zásadní pro zkříženou prezentaci bez ohledu na to, jestli se jedná o antigeny solubilní či partikulární. Do fagosomů/endosomů jsou takto dopravovány proteiny z PLC, struktury podstatné pro export pohlcených antigenů do cytosolu (mohlo by se jednat o komponenty ERAD mašinerie) a v důsledku dochází také ke zpomalení maturace fagosomů (méně fúzují s lysozomy, proteiny uvnitř jsou méně degradovány).

## 6 Vnitrobuněčný transport MHC-I molekul

Velké množství poznatků ohledně internalizace a recyklace MHC-I molekul bylo bohužel získáno studiem jiných buněk, než jsou APC (van Endert, 2016). Těmto studiím se zde věnovat nebudu, neboť nebylo zatím nijak ověřeno, že mechanismy internalizace a recyklace MHC-I molekul fungují stejně i u DC. Pokusím se vyzvednout pouze ty studie, které za model použily DC, nebo alespoň APC.

At' už jsou pohlcené struktury štěpeny v endosomech/fagosomech, či proteazomem v cytosolu, v každém případě se vzniklé antigenní peptidy musí potkat s MHC-I, aby mohly být naloženy a následně vystaveny na buněčném povrchu. Z dosavadních výzkumů vyplývá, že k tomu může docházet i v endosomech/fagosomech kam se komponenty nakládací mašinerie dostávají. Jakým způsobem však cestuje do těchto kompartmentů samotné MHC-I molekuly dlouho nebylo (a dosud není zcela) podrobně známo. Dnes se zdá nejpravděpodobnější, že jsou to MHC-I recyklované z plasmatické membrány, které putují skrze různé recyklační kompartmenty, až se potkají s peptidy určenými ke zkřížené prezentaci.

## 6.1 MHC-I molekuly mohou být recyklovány a nepřicházejí společně s PLC z ERGIC.

Již delší dobu je známo, že MHC-I molekuly vystavené na povrchu buněk jsou po určité době opět internalizovány a mohou být znovu naloženy jinými peptidy (Grommé *et al.*, 1999). Tento proces může být nezávislý na TAP, vyžaduje však lehce kyselé prostředí v kompartmentu, kde k "výměně nákladu" dochází. MHC-I molekuly zde byly označeny pomocí GFP, aniž by to narušilo jejich funkci, asociaci s dalšími molekulami, či vnitrobuněčný transport. Následně byly pozorovány fluorescentní váčky, jejichž existence nebyla narušena ani po dlouhodobé inkubaci v Brefeldinu A, který inhibuje sekreční dráhu. Zřejmě se v těchto váčkách tedy musely nacházet MHC-I molekuly recyklované z plasmatické membrány, neboť transport nově syntetizovaných MHC-I z ER byl zablokovaný.

V předchozí kapitole jsem se věnovala transportu ER-rezidentních proteinů z ERGIC do fagosomů a endosomů. Snadno se nabízí, že MHC-I molekuly by mohly být transportovány stejným mechanismem. Několik pozorování ovšem ukazuje, že tomu tak není. V recentním článku bylo objeveno "hlavní buněčné skladiště" MHC-I molekul, které je MHC-I molekulami zásobováno nezávisle na fúzi membrán ERGIC a fagosomů, tedy nezávisle na Sec22b (Nair-Gupta *et al.*, 2014). Rovněž v případě vakuolární cesty, kdy jiné ER-rezidentní proteiny nejsou pro zpracování antigenu třeba, je zkřížená prezentace na Sec22b nezávislá (Ma *et al.*, 2016). Neznámou jsou na tomto poli MHC-I molekuly z povrchu buněk, které jsou společně s pohlcovanými antigeny učiněny součástí fagosomů. Ač by se mohlo zdát, že tyto molekuly budou pro zkříženou prezentaci významné, experimenty tomu zatím nenasvědčují (van Endert, 2016). Každopádně je dost pravděpodobné, že MHC-I molekuly necestují pouze jedním způsobem ve všech případech. Nedávno bylo například zjištěno, že dlouhé peptidy (které jsou jako typ antigenů studovány, neb se zdají být velmi dobrými kandidáty pro protinádorovou vakcinaci) mohou být v rámci endosomu nakládány na nascentní MHC-I molekuly, tedy takové, které na plasmatické membráně ještě vůbec nebyly, a přitom nepřichází ani přímo z ER (Ma *et al.*, 2016). Jejich zkříženou prezentaci totiž nijak nenarušila inhibice recyklace MHC-I molekul, inhibice sekrece MHC-I na plasmatickou membránu, ani inhibice proteinu Sec22b. Ve výsledku tedy není možné říct, jak se tyto MHC-I molekuly k peptidům dostanou. Je možné, že putují skrze GA rovnou do nějakých recyklačních kompartmentů, či využívají dosud zcela neznámou transportní cestu.

V této publikaci bylo rovněž zjištěno, že zkřížená prezentace dlouhých peptidů u lidských DC běží vakuolární cestou a paradoxně se výrazně zlepší při inhibici TAP. Tento na první pohled zarážející výsledek byl dobře ověřen a zřejmě se nejedná o žádný vedlejší efekt. Je důležité zmínit, že byla analyzována zkřížená prezentace konkrétně na HLA-A2, což je typ MHC-I, který je schopen nést signální peptidy uvolňované v ER a nepotřebuje tedy nutně TAP k tomu, aby mohl z ER vycestovat (Wei & Cresswell, 1992). Signální peptidy jsou krátké aminokyselinové úseky na N konci proteinů, které signalizují pro kotranslační přenos do ER, kde jsou nakonec odštěpeny signální peptidázou, a jejich dislokace z membrán ER je případně dále usnadněna

štěpením uvnitř jejich membránového úseku intramembránovou proteasou SPP (signal peptide peptidase) (Weihs et al., 2002).

Jako vysvětlení pozitivního efektu inhibice TAP se tedy nabízí, že při její nefunkčnosti nejsou do ER dopravovány spousty peptidů z cytoplasmy a MHC-I molekuly jsou naloženy nízkoafinitními signálními peptidy, které mohou být snadno vyměněny za peptidy ke zkřížené prezentaci. Tuto variantu potvrzuje pozorování, kdy zablokování signální peptidázy vedlo k poklesu množství MHC-I molekul na povrchu buněk a zkřížená prezentace přestala být ovlivněna inhibicí TAP. Podobný efekt jako inhibice TAP měla na zkříženou prezentaci též inhibice ERAP. Bez ní peptidy nejsou zastříženy na vhodnou velikost pro nasednutí na MHC-I, které je pak opět naloženo nedokonale. Jiné typy MHC-I molekul, než byly zde zkoumány, pravděpodobně nemohou vystavovat signální peptidy bez funkce TAP, a tudíž by efekt inhibice TAP na zkříženou prezentaci byl u nich zcela opačný (jak tomu také obvykle je). Ale to, že jsou důležitým materiálem pro zkříženou prezentaci nedokonale naložené MHC-I, jež umožňují snadnou výměnu svého nákladu, dost možná platí obecně. A vyplývá z toho také již dříve zmíněné, že ač vakuolární cesta TAP primárně nepotřebuje, je TAP potřeba v ER, aby byly fagosomy či endosomy zásobovány molekulami MHC-I.

## 6.2 Na vnitrobuněčném transportu MHC-I molekul se podílí řada Rab GTPáz.

Protože transport MHC-I molekul buňkou je pravděpodobně založen na vezikulárním transportu, byla prověřena řada různých Rab GTPáz, co do funkce při zkřížené prezentaci (Zou et al., 2009). Rab GTPázy jsou proteiny schopné specificky asociovat s různými membránami, přivádět na jejich povrch další komponenty a regulovat tak vezikulární transfer v závislosti na vazbě GTP/GDP. Při vazbě GTP, čemuž napomáhají tzv. GEF proteiny (GTP exchange factor), jsou Rab GTPázy aktivovány a asociují s membránami. Naopak hydrolyzu GTP a následnou inaktivaci stimulují GAP proteiny (GTPase-activating protein). U řady Rab GTPáz již byla identifikována funkce v rámci různých endocytických kompartmentů. Například Rab4 a Rab5 se podílejí na vzniku časných endosomů a často jsou používány jako markery těchto kompartmentů. Nebo Rab35 se podílí na cestě rychlé recyklace z třídícího endosomu rovnou na plasmatickou membránu (van Endert, 2016). Narušení zkřížené prezentace bylo nalezeno při umlčení exprese dvanácti různých Rab GTPáz (Zou et al., 2009), z čehož vyplývá, že se jedná o velmi komplexní proces. Mezi nimi, Rab3b/3c GTPázy byly navíc objeveny v kolokalizaci s MHC-I a transferrinovým receptorem v tubulárních strukturách poblíž jádra, kam se MHC-I molekuly dostávají po internalizaci. Rab3b/3c tedy označují nějaký recyklující endosomální kompartment a je možné že hrají zásadní roli pro jeho vznik.

O recyklujících endosomech již byla zmínka na začátku 4. kapitoly (Obr. 5). Je to jedno z míst, kam mohou být přesouvány internalizované struktury. Často jsou souhrnně označovány jako endosomální recyklující kompartment (ERC). Tento se nachází poblíž jádra nebo organizačního centra mikrotubulů a je tvořen směsí tubulů a váčků. Hodnota pH je v něm prakticky neutrální a nedochází v rámci něj k žádnému dozrávání spojenému s okyselením či proteolýzou (van Endert, 2016). Tubuly ERC vybíhají k plasmatické



membráně, kde z nich probíhá recyklace dříve internalizovaných struktur zpět na buněčný povrch. V recentním článku je ERC hlouběji popsáno pomocí super-rezolučních mikroskopických přístupů (Xie *et al.*, 2016), které ukázaly, že struktury, které přichází z třídících endosomů, jsou aktivně udržovány v ERC odděleně, aby už nemusely být tříděny znovu. Tudíž s nimi může být rozmanitě nakládáno.

Dnes jsou identifikovány i další Rab GTPázy, které jsou významné pro mechanismus zkřížené prezentace. Jednou z nich je Rab22a (Cebrian *et al.*, 2016), jejíž umlčení výrazně ovlivnilo recyklaci MHC-I molekul a došlo ke značnému zmenšení buněčných zásob MHC-I. Zároveň byla u Rab22a-deficientních DC narušena zkřížená prezentace antigenů solubilních i partikulárních. Za běžných podmínek se Rab22a dostává na membrány fagosomů i endosomů, nejspíše společně s MHC-I. Jaká je však její konkrétní role v rámci mechanismu zkřížené prezentace není dosud známo.

Za jeden z nejvýznamnějších článků poslední doby ohledně vnitrobuněčného transportu MHC-I molekul je považována práce, kde autoři nalézají jednak další GTPázu Rab11a regulující zkříženou prezentaci, zjišťují význam signalizace přes TLR pro transport MHC-I molekul a nakonec nalézají buněčné "shromaždiště" MHC-I molekul v DC (Nair-Gupta *et al.*, 2014). Nejprve bylo zjištěno, že pokud myši DC fagocyticky pohltnou nějakou částici (ne solubilní antigen), ať už se jedná o bakterii, nakaženou apoptotickou buňku, či latexovou kuličku konjugovanou s LPS (lipopolysacharid, tvoří vnější část membrány bakterií), následná signalizace přes TLR má pozitivní efekt na zkříženou prezentaci peptidů odvozených od pohlceného antigenu. Pokud však k signalizaci skrz TLR nedojde, tzn. DC pohltnou nenakaženou apoptotickou buňku, CD8+ T lymfocyty nejsou významně aktivovány. Pravděpodobně zde nejde jen o TLR, ale důležité signalizace se účastní i další typy PRR, neboť i u DC neschopných TLR signalizace, které pohltily apoptotickou nakaženou buňku, byla zaznamenána určitá míra jejich aktivace (v podobě exprese CD40 a CD86).

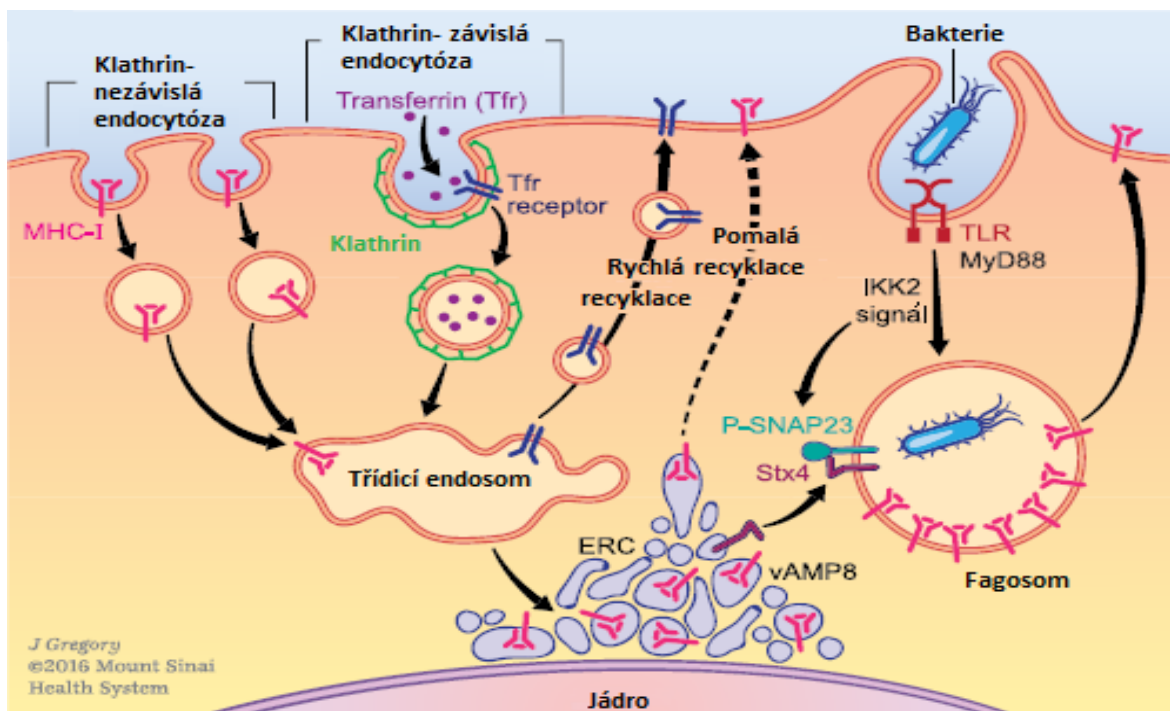
Jedním z přímých důsledků aktivace TLR bylo nabohacení MHC-I molekul na fagosomech, kde byly TLR aktivovány. MHC-I molekuly však nepřicházely společně s PLC z ERGIC. Komponenty PLC se na fagosomy dostávaly nezávisle na TLR signalizaci, prostřednictvím Sec22b, kdežto MHC-I molekuly byly hotové skladovány samostatně, převážně v ERC, jehož hlavními markery byly VAMP8, VAMP3 a Rab11a. Společně s MHC-I byl v ERC nalezen i transferrinový receptor. Internalizace MHC-I z plasmatické membrány nebyla závislá na klathrinu ani dynaminu a transport z třídících do recyklujících endosomů zajistila GTPáza Rab11a. Rab11a hrála zásadní roli pro udržení rezerv MHC-I. Obzvláště zajímavé je, že MHC-I molekuly byly mobilizovány z ERC ve chvíli, kdy DC něco fagocytovala, ale na konkrétní fagosomy přicházely až na popud signalizace skrz TLR. Po aktivaci TLR totiž došlo k aktivaci MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88) a následně IKK2 (druhá podjednotka kinázy inhibitoru jaderného faktoru kapa-B), která fosforylovala fagosomální SNAP23 a tím stabilizovala SNARE komplexy vznikající při fúzi fagosomů s ERC. Tyto komplexy tvoří na fagosomální straně SNAP23 a Syntaxin4, na ERC straně VAMP3 a VAMP8. Jedná se

tedy o proces, kdy fagosomy obsahující TLR-ligandy jsou selektivně obohaceny o MHC-I molekuly, neboť fúzování s váčky z ERC je preferované oproti těm fagosomům, které žádné TLR-ligandy neobsahují.

Zásoby MHC-I molekul pak byly pozorovány i u CD8+ DC, které jsou obecně považovány za lépe uzpůsobené ke zkřížené prezentaci. Validitu těchto výsledků potvrzuje i fakt, že vnitrobuněčné zásoby MHC-I molekul kolokalizované s transferrinovým receptorem byly rovněž pozorovány u plasmacytoidních DC (pDC) (Di Pucchio *et al.*, 2008). Ačkoliv bez stimulace nejsou pDC schopny aktivovat T lymfocyty vůbec, pouhých 6 hodin vystavení virovým antigenům je dostačujících pro aktivaci virově-specifických CD8+ T lymfocytů. Tak rychlá reakce je právě možná, neboť pDC mají zásoby již hotových MHC-I molekul v recyklujících endosomech. Po stimulaci virovými antigeny jsou pak tyto MHC-I molekuly záhy transportovány v komplexu s peptidy na buněčný povrch. Současně bylo pozorováno zpracování virových antigenů vakuolární cestou zkřížené prezentace, která by rovněž mohla přispívat k rychlosti odpovědi. Zkřížená prezentace má zásadní význam při antivirové obraně organismu, a viry se jsou schopny pomnožit velmi rychle. Tyto výsledky mimo jiné ukazují, že pDC jsou schopné proti nim rychle zasáhnout - jednak produkcí cytokinů, ale také rychlou aktivací virově-specifických CD8+ T lymfocytů.

### 6.3 Závěrem kapitoly

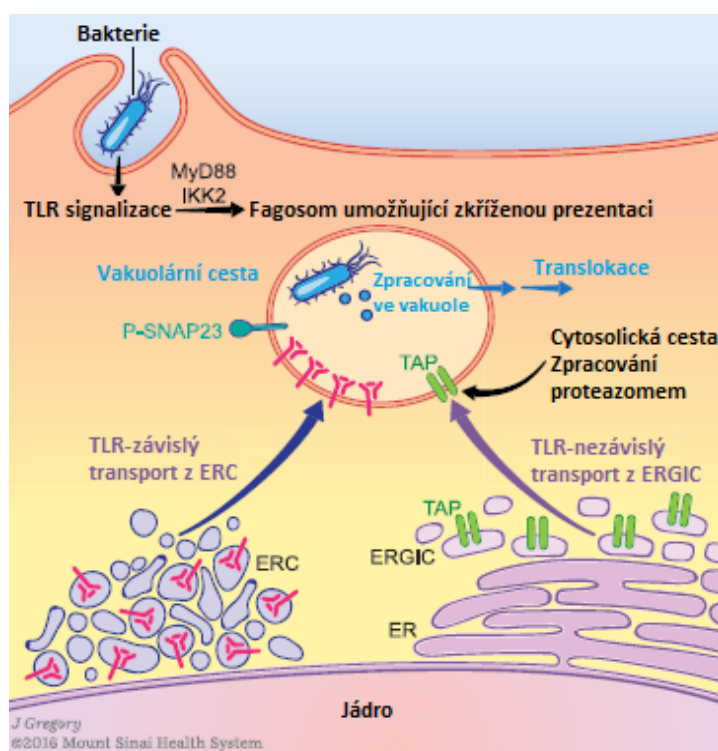
Poznatky o vnitrobuněčném transportu MHC-I molekul, které jsou více méně etablované, jsou shrnuty na Obr. 6. MHC-I molekuly mohou být recyklovány z buněčného povrchu a klathrin-nezávislou endocytózou se dostávají do třídících endosomů společně s řadou dalších molekul. Zde je vedle MHC-I zobrazen transferrinový receptor (Tfr receptor). Z třídících endosomů může proběhnout rychlá recyklace



**Obr. 6:** To nejdůležitější, co je doposud známo o vnitrobuněčném transportu MHC-I molekul u DC (převzato a upraveno z Blander 2016)

přímo na plazmatickou membránu, nebo dojde k transportu do ERC a teprve odtud je receptor pomalu recyklován. Obě varianty jsou možné jak pro MHC-I, tak pro Tfr receptor, ač na obrázku jsou tyto cesty znázorněny vždy pouze pro jednoho z nich. Z ERC se MHC-I molekuly dostávají na popud signalizace skrz TLR do příslušných fagosomů. TLR svou aktivací spouští signální kaskádu, kdy je aktivován MyD88, IKK2 a nakonec fosforylován SNAP23 (P-SNAP23 značí fosforylaci), který stabilizuje SNARE komplexy, které vznikají při splývání ERC a fagosomu. MHC-I molekuly se tak dostanou specificky do fagosomů, které nesou antigeny stimulující TLR. Antigenní peptidy od nich odvozené pak vynesou na buněčný povrch a prezentují CD8+ T lymfocytům. Aby mohly být ony antigenní peptidy na MHC-I molekuly naloženy, je nezbytné, aby se do fagosomů dostaly ER-rezidentní proteiny jako je TAP a další. Tyto jsou do fagosomů dopravovány na MHC-I molekulách i signalizaci skrze TLR nezávisle, z ERGIC. Ve výsledku existují tedy dvě hlavní nezávislé transportní cesty zodpovědné za přetvoření fagosomu v kompartment umožňující zkříženou prezentaci (viz Obr. 7).

**Obr. 7:** Na schopnosti fagosomů zkříženě prezentovat se podílejí struktury z ERC i z ERGIC (převzato a upraveno z Blander 2016)



O vnitrobuněčném transportu MHC-I molekul by se dalo pojednávat ještě řadu stran. To však není cílem mé práce. Toto téma je v poslední době zevrubně studováno spoustou laboratoří, neb se zdá, že když pochopíme, jak MHC-I molekuly procházejí buněčnými kompartmenty, pochopíme pak již snadno rozmanité mechanismy zkřížené prezentace. Minulý rok byl tomuto tématu věnován též značný prostor v příloze o zkřížené prezentaci v časopise Immunological Reviews. Zájemce o zevrubnější analýzu této problematiky, včetně informací získaných na jiných buňkách než jsou APC, zde tedy odkazuji na výborná review psaná těmi nejlepšími v oboru (Blander, 2016; van Endert, 2016).

## 7 Mechanismus ERAD a zkřížená prezentace

V rámci kapitoly o cytosolické cestě zkřížené prezentace byl zmíněn nedávno potvrzený význam translokonu Sec61 pro přenos pohlcených antigenů skrze fagosomální membránu do cytosolu. Sec61 je jednak translokon umožňující cestu proteinů sekreční dráhy do ER, mimo to je však schopen i procesu opačného a je tak jedním z kanálů, u nějž předpokládáme roli v rámci ER-asociované degradace (ERAD). Mechanismus ERADu je dosti komplexní, složitý a dosud ne zcela objasněný, podobně jako je tomu u zkřížené prezentace. Obecně se však jedná o souhrn mnoha proteinů, jejichž zásadní úlohou je přemístit špatně složený protein z ER do cytosolu, přičemž je ubiquitinylován a následně degradován proteazomem. Takto jsou přenášeny jak proteiny solubilní, tak membránově vázané a je pozorována určitá substrátová specifita v tom smyslu, že rozličné ERAD substráty využívají různé komponenty ERAD mašinerie. Obvykle je rozlišován ERAD-L pro solubilní substráty v lumen ER, ERAD-M pro membránově vázané substráty, které mají špatně složenou doménu v lumen ER, a ERAD-C pro membránově vázané substráty, které mají špatně složenou doménu v cytosolu. Právě takový transport přes membránu, jako v případě ERAD-L, je potřeba při cytosolické cestě zkřížené prezentace. Dokonce když uvážíme, že ve fagosomu, v němž se nachází antigen, panuje mírně kyselé pH a určitá míra proteolytické degradace, zdá se dost pravděpodobné, že proteiny v něm obsažené budou vykazovat některé charakteristiky špatně sbalených solubilních proteinů v ER. Dá se tedy předpokládat, že Sec61 nebude jediným článkem ERAD mašinerie, který je do fagosomů dopravován. Případně, že se ve fagosomech nacházejí proteiny jiné, ale s analogickou funkcí ke komponentám ERADu.

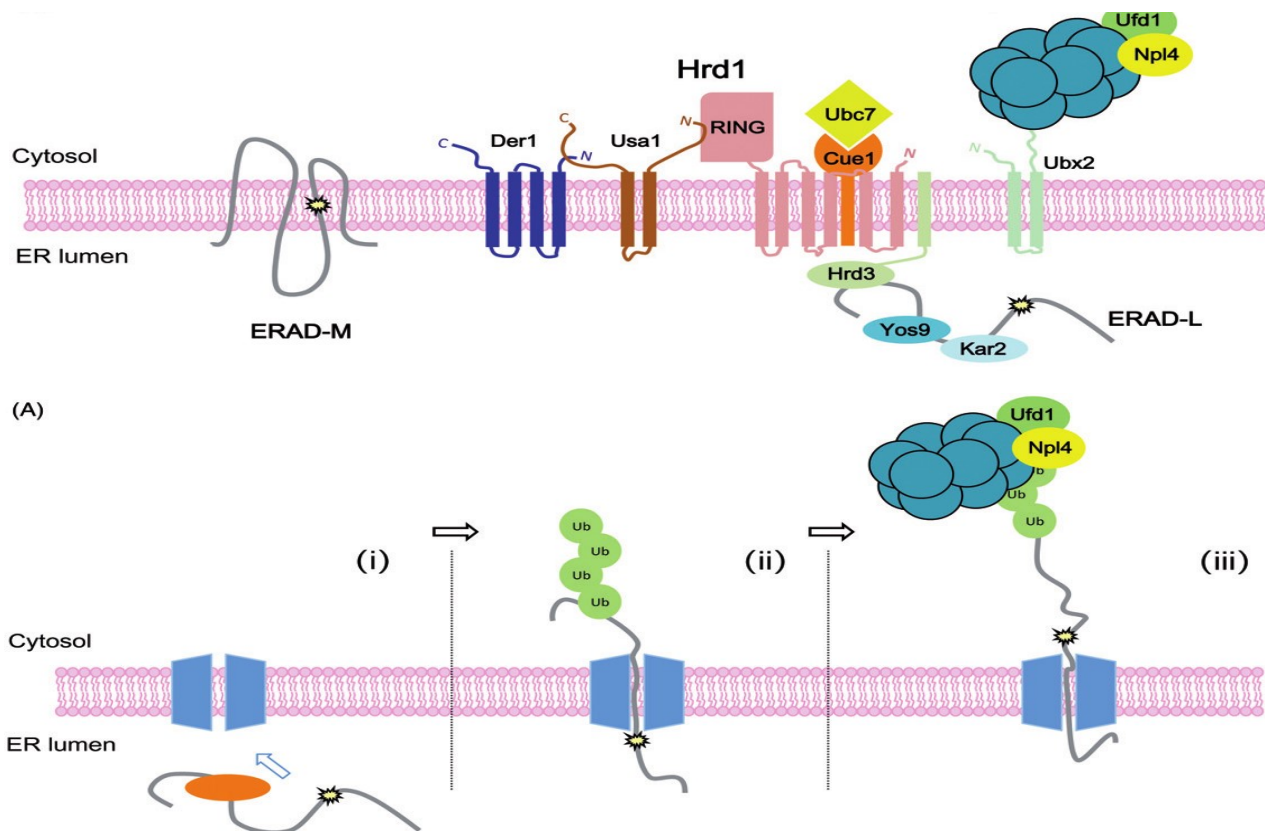
### 7.1 Základní mechanismus ERADu špatně složených solubilních proteinů v lumen ER (ERAD-L)

Mechanismus ERADu je studován převážně na kvasinkách. V zásadě ho lze rozdělit do několika důležitých kroků (Zattas & Hochstrasser, 2015). Prvním je jistě rozpoznání špatně sbaleného proteinu. Následně musí být tento protein přenesen přes membránu a již v rámci přenosu, či až po něm, proběhne ubiquitinylace proteinu. Posledním krokem je pak degradace v proteazomu.

Podrobněji je tento proces ilustrován na Obr. 8. K rozpoznání slouží jednak lektiny v lumen ER (Yos9), neboť řada proteinů je v rámci ER glykosylována, cukerné zbytky jsou následně zkracovány během skládání proteinu do vhodné konformace a pakliže tuto konformaci není schopen po delší dobu zaujmout, nabydou jeho cukerné zbytky konkrétní podoby, kterou rozpoznají lektiny ERADu. Vedle lektinů jsou to pak některé Hsp70 proteiny jako Kar2 (u savců BiP či Grp78) a Hrd3 (u savců SEL1L), které rozpoznávají vyloženě tu špatně sbalenou část proteinu. Při rozpoznání proteinu a jeho přivedení ke zbytku ERAD mašinerie pravděpodobně spolupracují všechny tyto tři komponenty. Po rozpoznání je protein ubiquitinylován E3 Ub-ligázou specifickou pro ERAD - Hrd1 nebo Doa10 (není na obrázku). Obě jsou v cytosolické části vybaveny tzv. RING doménou, jíž asociují s E2 Ub-ligázou (zde Ubc7) nesoucí Ub a následně přenesou tento Ub z E2 na

rozpoznání proteinu. Zatím nedefinovanou roli někdy okolo okamžiku ubikvitinylace hraje též protein Der1 (u savců Derlin-1). Protein Usa1 (u savců Herp) zajišťuje asociaci Der1 s Hrd1 a je důležitý pro oligomerizaci a stabilitu komplexu.

Translokace proteinu přes membránu probíhá buď prostřednictvím proteinového kanálu a to před, či současně s ubikvitinylací. Alternativní model předpokládá pozměnění struktury fosfolipidové membrány prostřednictvím nějakých proteinových faktorů, které tak sníží energii nezbytnou k překonání této bariéry a umožňují vstup proteinu přímo skrze membránu (Zattas & Hochstrasser, 2015). Každopádně tak, jako import proteinů do ER vyžaduje energii (je poháněn energií samotné proteosyntézy), tak upravená membrána či kanál je pravděpodobně pouze pasivním otvorem, který vstup umožňuje, ale musí zde existovat nějaký pohonný zdroj energie. Zde hraje roli nejspíše cytosolická ATPáza Cdc48 (u savců p97), která za spotřeby ATP uvolňuje protein z membrány. Její kofaktory Ufd1 a Npl4 umožňují mimo jiné vazbu proteinů označených Ub.



**Obr. 8:** ERAD mašinérie zajišťující rozpoznání (nahore) a retrotranslokaci (dole) solubilních špatně sbalených proteinů z lumen ER (převzato z Zattas a Hochstrasser 2015).

### 7.1.1 Retrotranslokony

Který protein vytváří retrotranslokační kanál, případně destabilizuje membránu je předmětem debat. Momentálně jsou zvažovány tři hlavní možné mechanismy pro transport špatně složených proteinů přes membránu ER (Römisch, 2017). Jeden z nich uvažuje jako výstupní kanál Sec61 translokon, druhý E3

Ub-ligázu Hrd1 a třetí pseudoproteázu Der1. Je samozřejmě možné, že se tohoto procesu účastní všechny tři zároveň, nebo že záleží na typu proteinu určeného k degradaci. A neboť výstupní kanál je pravděpodobně jednou z nejdůležitějších součástí exportního mechanismu, i vzhledem k roli pro zkříženou prezentaci zde shrnu recentní zjištění o jejich funkci.

#### 7.1.1.1 *Sec61 translokon*

Existují články hovořící jak pro, tak proti funkci Sec61 translokonu při retrotranslokaci, v závislosti na charakteru špatně sbaleného proteinu. Solubilní proteiny tento kanál zřejmě mohou využívat (Willer *et al.*, 2008), na rozdíl od proteinů membránových, které jsou retrotranslokovány jiným mechanismem (Huyer *et al.*, 2004).

Bohužel zásadním problémem při analýze funkce Sec61 pro ERAD je pleiotropní efekt jeho umlčení/inhibice funkce. V dřívějších studiích byly využívány teplotně senzitivní mutanty Sec61 kanálu, které byly při vyšší teplotě zcela funkční, při nízké teplotě pracovat přestaly. To však stejně znamená, že v okamžiku snížení teploty nefungovaly řádně pro přenos ani tam, ani zpět. Navíc snížení teploty mohlo ovlivnit též stabilitu ERAD substrátu a tím zmírnit jeho degradaci, aniž by zde nefunkčnost Sec61 hrála významnou roli.

V poslední době se však objevila mutace specifická právě pro exportní a nikoliv importní funkci Sec61 translokonu. Mutace Y344H (histidin na pozici 344 nahrazen tyrosinem) byla primárně nalezena u myši trpící diabetem (Lloyd *et al.*, 2010). Nedostatek inzulínu byl způsoben apoptózou beta buněk pankreatu v důsledku stresu v ER. Cisterny ER byly zvětšené, což naznačuje, že primárním důvodem mohl být problém v odstraňování špatně sbalených proteinů. Expresie nemutovaného Sec61 v beta buňkách pankreatu vedla k obnovení homeostázy v ER - beta buňky přestaly apoptoticky umírat a došlo k vyléčení diabetu. Při analýze translokonu bylo navíc zjištěno, že import proteinů do ER zřejmě narušen nebyl.

Analogická mutace byla proto vytvořena u kvasinky (Wheeler & Gekakis, 2012). Zde bylo ověřeno, že translokační aktivita Sec61 ve směru dovnitř není narušena. ER však bylo náchylnější k induktorům stresu a retrotranslokace ERAD substrátu byla zpomalená. S pomocí těchto mutantů by v budoucnu mělo být snazší analyzovat roli Sec61 pro ERAD či jiné buněčné procesy.

#### 7.1.1.2 *Ubikvitin ligáza Hrd1*

Tato E3 Ub-ligáza byla v několika recentních pracích označena jako membránový protein umožňující přenos špatně sbalených proteinů přes membránu ER. Má 6 transmembránových domén, což je teoreticky dostačující pro tvorbu transmembránového kanálu.

V jedné z těchto prací byl proces ERADu-L rekonstituován *in vitro* z purifikovaných komponent z kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (Stein *et al.*, 2014). Z výsledků vyplývá, že Hrd1 je centrálním proteinem procesu ERAD-L, neb je schopná rozpoznat špatně sbalené proteiny, ubikvitinylovat je i sebe a přivést ATPázu

Cdc48, která špatně sbalený protein vyprostí z Hrd1 do cytosolu. Hrd1 by tedy byla multifukční komponentou uplatňující se mimo jiné i jako transmembránový kanál. Jako substrát pro ERAD zde byla využita pro-karboxypeptidáza Y s bodovou mutací (CPY\*), která je dostačující k tomu, aby byl tento protein špatně sbalený, a od ní odvozené fúzní deriváty. Z počátku byl celý proces rekonstituován v detergentu. Izolovaná CPY\* zde asociovala s transmembránovou doménou purifikované Hrd1, na rozdíl od nemutované a správně sbalené CPY. Hrd1 se významně podílela na polyubikvitinylaci CPY\* i sebe sama za přítomnosti zbytku ubikvitinylační mašinérie. Její autoubikvitinylace vedla k asociaci s Cdc48 ATPázou prostřednictvím jejích dvou kofaktorů Ufd1 a Npl4 a specifita této interakce se pak zvýšila přidáním Ubx2 proteinu. Reakce v detergentu však zcela jistě nemohou úplně odpovídat reakcím na membráně ER. Autoři se proto pokusili provést celý proces na membráně proteoliposomu. Zde se jim sice podařilo ukázat, že po přidání ATPázy CPY\* liposomy opouští skrze interakci s Hrd1, avšak Hrd1 liposomy opouštěla také a ve větší míře než samotné CPY\*. Navíc CPY bylo asociováno s Hrd1 ještě před vytvořením liposomů. Ani jedno by se na membráně ER běžně dít nemělo, je tedy otázka nakolik fyziologické jsou zde zjištěné skutečnosti.

O několik let později byl proto proveden podobný výzkum, v němž byl zvolen lepší experimentální přístup (Baldrige & Rapoport, 2016). CPY\* zde byla modifikována přídatnou transmembránovou doménou na C konci (CPY\*-TM), jejímž prostřednictvím se sama stala součástí proteoliposomu ve fyziologické orientaci (lumen ER odpovídá lumen váčku). Váček byl poté jemně solubilizován, dodatečně přidaná Hrd1 se do něj začlenila, a znovu zpevněn. Následně byl detekován export CPY\*-TM z proteoliposomu za přítomnosti ATP a ubikvitinylační mašinérie. Bohužel však nebylo ukázáno, že při začleňování Hrd1 do liposomů nedošlo k asociaci s CPY. Pokud by tomu tak bylo, ve výsledku by se tento přístup příliš nelišil od původního. Nelze tedy zcela vyloučit, že Hrd1 sama o sobě kanál nevytváří, ale je pouze jeho částí a ve fyziologických podmínkách potřebuje ke správné funkci třeba právě Der1, či další komponenty.

V každém případě však Hrd1 hraje při retrotranslokaci v rámci ERADu významnou roli, jak bylo potvrzeno na savčích buňkách (Grotzke *et al.*, 2013). Bylo zde využito speciálně upraveného fluorescentního proteinu (Venus fluorescent protein), který začne fluoreskovat pouze, pokud je nejdříve v ER glykosylován a následně deglykosylován v cytosolu, kam se z ER může dostat jedině retrotranslokací, využívanou při ERADu. Prostřednictvím siRNA byla umlčena exprese různých proteinů, které by při ERADu mohly hrát roli, a byl pozorován vliv na fluorescenci tohoto proteinu. Nejvýznamnější efekt vykazovalo umlčení právě Hrd1 a její další savčí podjednotky, až po ní následoval Sec61 a ještě menší roli hrály homology Der1. Problematický je zde fakt, že u savců se nacházejí dva homology Sec61 a umlčet oba dva nelze bez vedlejších účinků (včetně letality). Je možné, že z toho důvodu může být význam Sec61 v této studii podceněn.

### 7.1.1.3 Význam Der1 pro retrotranslokaci

Konkrétní význam proteinu Der1 obecně pro ERAD není doposud uspokojivě znám. Vedle jiných byla navržena též možná role v samotné retrotranslokaci (Mehnert *et al.*, 2014). Protein Der1 má pravděpodobně

6 transmembránových domén a také je schopen oligomerizace, jejímž prostřednictvím by mohl vytvářet kanál. Pro jeho oligomerizaci hraje zásadní roli protein Usa1, který zároveň zprostředkovává asociaci s Hrd1. Der1 se také nachází v těsné blízkosti proteinu Hrd3, který přivádí špatně sbalené proteiny. Rovněž bylo zjištěno, že Der1 asociuje se substráty pro ERAD, a to jak svými ER-luminálními, tak membránovými doménami, což významně naznačuje, že je součástí retrotranslokační mašinerie. Zdá se však, že je podjednotkou, která je potřeba pouze pro určité typy substrátů. Hlavně pro solubilní ERAD substráty jako je CPY\*, protože mutace konzervovaných aminokyselin v transmembránových doménách Der1 narušily translokaci CPY\*. Naopak na translokaci membránových substrátů ERADu neměly mutace vliv a neovlivnily ani topologii samotné Hrd1. Autoři na základě těchto výsledků navrhnou model, kdy špatně sbalené proteiny jsou od Hrd3 předány právě Der1, který zprostředkuje jejich přenos skrze membránu. Na cytosolické straně membrány jsou proteiny následně ubiquitinylovány Hrd1 Ub-ligázou. Samotný kanál by přitom mohl být tvořen transmembránovými doménami Der1 i Hrd1 současně.

## 7.2 Význam ERADu pro zkříženou prezentaci

Jedním z prvních výzkumů zaměřených čistě na toto téma je práce z roku 2006 publikovaná ve významném imunologickém časopise (Ackerman *et al.*, 2006). Původní myšlenka této varianty vychází ze zjištění, že ER-rezidentní proteiny se stávají součástí endosomů a fagosomů nesoucích antigeny ke zkřížené prezentaci, jak už bylo zmíněno výše. Tyto antigeny jsou mnohdy zpracovány tzv. cytosolickou cestou, která ve svém principu předpokládá transport antigenu skrze fagosomální membránu. V ER se k vyřešení tohoto problému naskýtá retrotranslokační mašinerie uplatňující se při ERADu. Ackerman *et al.* se zaměřili na zkříženou prezentaci OVA u DC. Ta zřejmě probíhala cytosolickou cestou, neboť byla narušena po inhibici TAP prostřednictvím peptidu ICP47(1-35) (syntetický peptid odvozený od N-konce virového proteinu ICP47, který interaguje s cytosolickou stranou TAP a tím ji inhibuje). Poněvadž peptid ICP47(1-35) byl podán extracelulárně, narušení zkřížené prezentace zároveň ukazuje, že i on sám se nejdříve musel z endosomu dostat do cytosolu, aby mohl TAP inhibovat. Jako retrotranslokon byl testován Sec61 kanál pomocí reverzibilního inhibitoru Exotoxinu A (ExoA). Pokud byl ExoA podán extracelulárně společně s ICP47(1-35), inhibice TAP byla výrazně omezena, ale zkřížená prezentace byla narušena. Blokáce Sec61 kanálu tedy zřejmě zabránila transportu jak ICP47(1-35), tak antigenu do cytosolu. Bohužel výsledky spojené s inhibicí translokačního kanálu Sec61 jsou doprovázeny řadou pochybností, neb se dá předpokládat pleiotropní účinek takové inhibice. Sec61 kanál se tak touto prací dostal do podvědomí badatelů na poli zkřížené prezentace, ale nebyl přijat jako prokázaný.

Vedle OVA zde byla v roli antigenu použita také luciferáza. Po jejím pohlcení byly váčky izolovány a následně byla měřena míra exportu luciferázy ven prostřednictvím její enzymatické aktivity. Bylo zjištěno, že transport luciferázy je závislý na přítomnosti cytosolických komponent a ATP. To napovídá roli cytosolické ATPázy p97, která napomáhá vytažení proteinu skrze membránu ER při ERADu. Její význam zde byl potvrzen,



neboť přidání čisté p97 a ATP k fagosomům s luciferázou iniciovalo export luciferázy z váčku, kdežto p97 s nefunkční ATPázovou aktivitou toho schopná nebyla. Navíc pokud byly DC transfekovány nefunkční p97, byla narušena též zkřížená prezentace OVA. Tato práce tedy ukázala na pravděpodobnou roli dvou komponent ERADu, ATPázy p97 a kanálu Sec61, pro zkříženou prezentaci. Jako u všeho nového je však na místě obezřetnost a proto ještě řada recentnějších článků musela tuto problematiku prověřit, než bylo zapojení této mašinerie ve zkřížené prezentaci obecně přijato.

Jedním z nich je poměrně recentní práce na zkřížené prezentaci dlouhých peptidů (Ménager *et al.*, 2014). Zkoumaný peptid byl fluorescenčně označen, konfokální mikroskopií bylo sledováno jeho pohlcení do časných endosomů a jejich následné dozrávání v pozdní endosomy splynutím s lysosomy u DC. Zpracování těchto peptidů na kratší, vhodné k nasednutí na MHC-I, proběhlo v závislosti na proteazomu a TAP. Zřejmě tedy cytosolickou cestou, pro níž je třeba, aby peptidy opustily fagosom. Umlčení ATPázy p97, jež je důležitou součástí ERADu, vedlo k výraznému narušení zkřížené prezentace, což značí, že se na transportu do cytosolu tato ATPáza podílí. Naopak role Sec61 byla vyvrácena, neb použití jeho inhibitoru ExoA ani jeho umlčení zkříženou prezentaci nijak výrazně neovlivnilo. Podobně ani umlčení proteinu Derlin-1 nemělo na zkříženou prezentaci vliv.

Avšak ještě recentnější studie, která již byla zmíněna v kapitole o cytosolické cestě zkřížené prezentace, na roli Sec61 ukazuje (Zehner *et al.*, 2015). Při použití stejného inhibitoru (ExoA), avšak jiného typu antigenu (solubilní či partikulární OVA) bylo pozorováno výrazné narušení zkřížené prezentace. V dalším kroku byla navíc role Sec61 dokázána natolik elegantním způsobem, že se není třeba obávat ani pleiotropních účinků při jeho inhibici. Rovněž byla analyzována možná role Derlinu-1, která však ani zde nebyla potvrzena. Poslední komponentou ERAD, na kterou se zde zaměřili byla Hrd1. Při jejím umlčení došlo ke snížení exportu antigenu do cytosolu i nižší aktivaci CD8+ T lymfocytů. Bohužel však byla zároveň ovlivněna i prezentace na MHC-II, pro kterou by export do cytosolu neměl hrát žádnou roli. Není tudíž jasné, zda snížení účinnosti zkřížené prezentace bylo důsledkem nefunkčnosti translokační dráhy, nebo jiného nespecifického efektu při umlčení Hrd1.

Role p97 pro zkříženou prezentaci byla navržena i o něco dříve v souvislosti s polyubikvitinylací manosového receptoru (MR) a zdá se tedy dosti pravděpodobná (Zehner *et al.*, 2011). Jako antigen zde byl použit OVA cílený na MR. OVA byl společně s MR internalizován do časných endosomů, kde následně došlo ke zpracování OVA pro zkříženou prezentaci. V případě, že DC neexprimovaly MR a OVA byl kovalentně připojen k transferrinu, byl OVA dobře internalizován prostřednictvím transferrinového receptoru do stejného časně endosomálního kompartmentu jako prostřednictvím MR. Avšak bez exprese MR nedošlo k účinné zkřížené prezentaci OVA, neb byl narušen přenos OVA do cytosolu. MR má na svém cytosolickém konci lysinový zbytek, který je po vazbě OVA polyubikvitinylován. Po mutaci tohoto lysinu nebyla nijak ovlivněna internalizace OVA, ani jeho zacílení do časných endosomů, ale zkřížená prezentace a export do

cytosolu byly narušeny výrazně. Polyubikvitinylace cytosolické části tohoto receptoru tedy zřejmě hraje pro export OVA z endosomu roli. ATPáza p97 je schopná polyubikvitinylované proteiny vázat prostřednictvím svých kofaktorů a MR by tak mohl prostřednictvím své polyubikvitinylace tento protein přivádět na endosomální membránu a umožňovat tak jeho participaci na exportu antigenů z endosomu. Tato teorie zde byla výsledky potvrzena. Exprese mutantní p97, která nedisponuje ATPázovou aktivitou, výrazně narušila zkříženou prezentaci a export antigenu do cytosolu. ATPasa p97 byla také kolokalizována s endosomy obsahujícími OVA, avšak pouze v případě, kdy se zde také nacházel polyubikvitinylovaný MR.

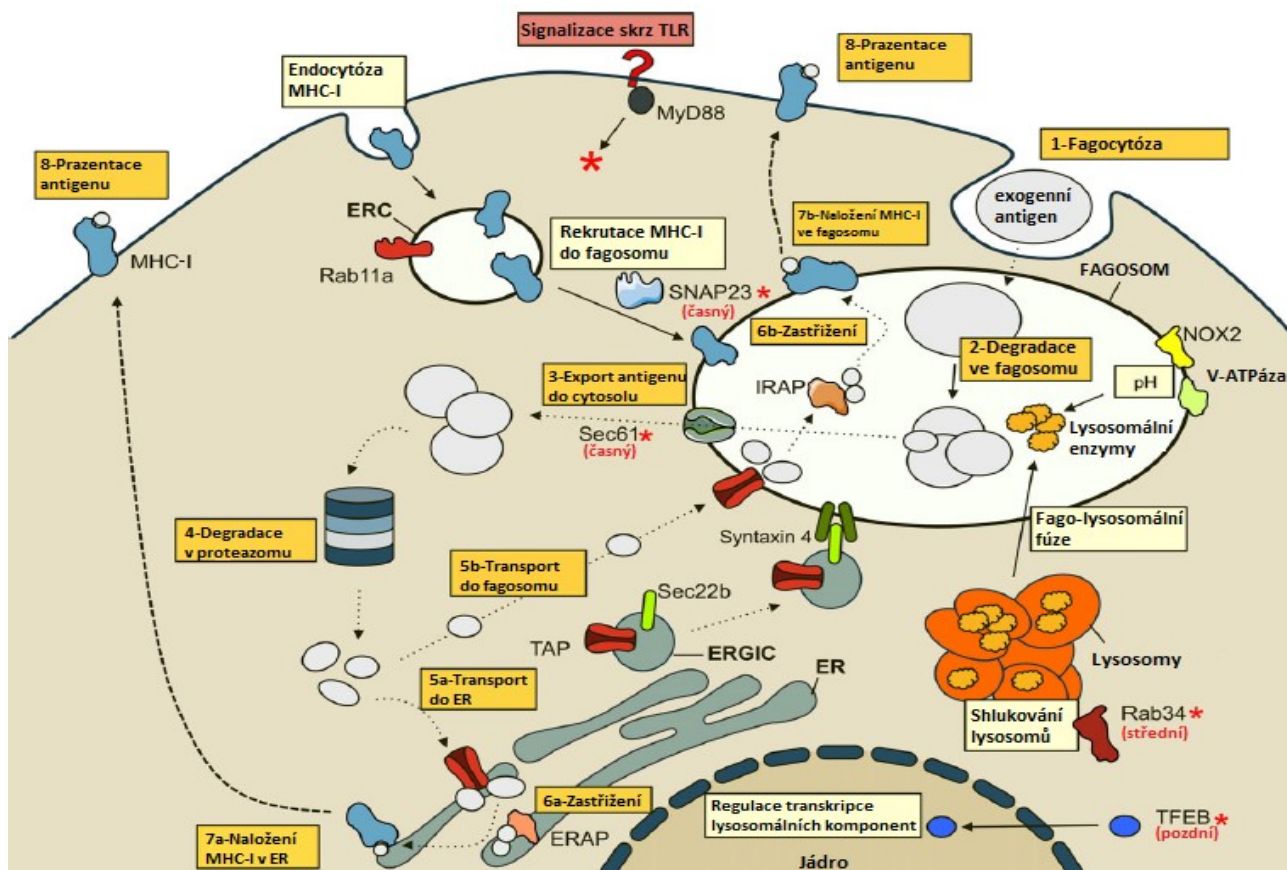
### 7.3 Závěrem kapitoly

Zdá se tedy, že minimálně některé komponenty ERAD mašinérie se zkřížené prezentace vsutku účastní. Z recentních výzkumů vyplývá role hlavně pro Sec61 a ATPázu p97. Význam Hrd1 je nutné ověřit. Z pohledu exportu antigenu do cytosolu je tedy k dispozici kanál i pohonný mechanismus k protažení antigenů skrze něj. V ER je však mechanismus prostupu proteinů do cytosolu mnohem komplexnější. Dá se proto předpokládat, že ještě několik komponent v rámci fagosomů zbývá nalézt. Nemusí se nutně jednat o proteiny z ER, pravděpodobně jim však budou minimálně funkčně příbuzné. Rovněž je z dosavadního výzkumu zřejmé, že tak jako existuje více mechanismů zkřížené prezentace, tak jsou potřeba různé ERAD faktory v závislosti na konkrétním typu pohlceného antigenu.

## 8 Závěr

V předcházejících kapitolách jsem se věnovala fyziologickému významu a ve větší míře molekulárnímu mechanismu zkřížené prezentace. Fyziologický význam zkřížené prezentující DC v boji proti intracelulárním patogenům, rakovině a autoreaktivním T lymfocytům je poměrně dobře etablován, molekulární podstata zkřížené prezentace však dosud není uspokojivě objasněna. Rovněž propojení mezi molekulárním mechanismem a fyziologickým významem zatím neznáme, tedy není známo, jak konkrétně probíhá zkřížená prezentace při navození tolerance oproti procesu navození aktivace u T lymfocytů.

Diskutované molekulární mechanismy zkřížené prezentace jsou pro přehlednost shrnuty na Obr. 9. Pomocí čísel a šipek je zde naznačen sled událostí od pohlcení exogenního antigenu až po prezentaci od něj odvozených peptidů na buněčném povrchu. Struktury ovlivněné signalizací skrze TLR jsou označeny červenou hvězdičkou, kdy v závorce je uvedeno, v jaké fázi dozrávání DC (k tzv. dozrávání dochází právě po stimulaci TLR) se projevují. Například Sec61 se na membrány fagosomů dostává záhy po pohlcení antigenu, naopak TFEB se projevuje až mnohem později a zkříženou prezentaci vlastně zastavuje. Všechny struktury zmíněné na Obr. 9 lze dohledat v rámci jednotlivých kapitol a dozvědět se tak o nich více.



**Obr. 9:** Molekulární mechanismus zkřížené prezentace v detailu (převzato a upraveno z (Alloatti *et al.*, 2016))

Důvodem, proč dosud není mechanismus zkřížené prezentace zcela objasněn, ačkoliv se jím zabývá a zabývala řada laboratoří, je pravděpodobně nesnadnost propojování jednotlivých výsledků v celistvý obrázek, neboť se během celého procesu zkřížené prezentace projevuje spousta různých faktorů. Nejen že záleží na typu antigenu a způsobu jeho pohlcení, ale s mechanismem zkřížené prezentace úzce souvisí problematika dendritických buněk, jejichž podtypů, které se liší svými vlastnostmi a funkcemi, nacházíme v rámci člověka celou řadu (Gutiérrez-Martínez *et al.*, 2015). Přitom mnoho informací o zkřížené prezentaci bylo objeveno na myších DC, které se pravděpodobně od lidských DC liší. Rovněž momentální stav imunitního systému, přítomnost konkrétních cytokinů a patogenních struktur ovlivňuje dendritické buňky společně s procesy, které v nich probíhají. Po stimulaci skrz PRR DC dozrávají a v různých fázích dozrávání vykazují rozmanité vlastnosti i co se zkřížené prezentace týče (Alloatti *et al.*, 2016). Komplexní porozumění problematice zkřížené prezentace a jejímu fyziologickému významu se pravděpodobně neobejde bez využití moderních systémových přístupů, které umožní zohlednit řadu proměnných zároveň. Bylo by skvělé, kdyby jednoho dne bylo možné namodelovat průběh zkřížené prezentace a specificky tak umět stimulovat či tolerizovat příslušné T lymfocyty.

## Seznam použité literatury

- Abbas AK, Murphy KM & Sher A (1996) Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* **383**: 787–793 REVIEW
- Ackerman AL, Giodini A, Cresswell P, Voorden S van, Wiertz E, Rapoport TA, Rapoport TA, Ploegh HL, Shaw J, Yip C & al. et (2006) A role for the endoplasmic reticulum protein retrotranslocation machinery during crosspresentation by dendritic cells. *Immunity* **25**: 607–617
- Ackerman AL, Kyritsis C, Tampé R & Cresswell P (2003) Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 12889–12894
- Alloatti A, Kotsias F, Magalhaes JG & Amigorena S (2016) Dendritic cell maturation and cross-presentation: timing matters! *Immunol. Rev.* **272**: 97–108 REVIEW
- Alloatti A, Kotsias F, Pauwels A-M, Carpier J-M, Jouve M, Timmerman E, Pace L, Vargas P, Maurin M, Gehrman U, Joannas L, Vivar OI, Lennon-Duménil A-M, Savina A, Gevaert K, Beyaert R, Hoffmann E & Amigorena S (2015) Toll-like Receptor 4 Engagement on Dendritic Cells Restrains Phago-Lysosome Fusion and Promotes Cross-Presentation of Antigens. *Immunity* **43**: 1087–1100
- Andersen MH, Schrama D, Thor Straten P & Becker JC (2006) Cytotoxic T cells. *J. Invest. Dermatol.* **126**: 32–41 REVIEW
- Andrews DM, Andoniu CE, Granucci F, Ricciardi-Castagnoli P & Degli-Esposti MA (2001) Infection of dendritic cells by murine cytomegalovirus induces functional paralysis. *Nat. Immunol.* **2**: 1077–1084
- Appelqvist H, Wäster P, Kågedal K & Öllinger K (2013) The lysosome: from waste bag to potential therapeutic target. *J. Mol. Cell Biol.* **5**: 214–226 REVIEW
- Baldridge RD & Rapoport TA (2016) Autoubiquitination of the Hrd1 Ligase Triggers Protein Retrotranslocation in ERAD. *Cell* **166**: 394–407
- Ballesteros-Tato A, León B, Lund FE & Randall TD (2010) Temporal changes in dendritic cell subsets, cross-priming and costimulation via CD70 control CD8+ T cell responses to influenza. *Nat. Immunol.* **11**: 216–224
- Bevan MJ (1976) Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J. Exp. Med.* **143**: 1283–1288
- Bevan MJ (2006) Cross-priming. *Nat. Immunol.* **7**: 363–365 REVIEW
- Bickham K, Goodman K, Paludan C, Nikiforow S, Tsang ML, Steinman RM & Münz C (2003) Dendritic Cells Initiate Immune Control of Epstein-Barr Virus Transformation of B Lymphocytes In Vitro. *J. Exp. Med.* **198**: 1653–1663
- Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL & Wiley DC (1987) Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* **329**: 506–512
- Blander JM (2016) The comings and goings of MHC class I molecules herald a new dawn in cross-presentation. *Immunol. Rev.* **272**: 65–79 REVIEW
- Busche A, Jirmo AC, Welten SPM, Zischke J, Noack J, Constabel H, Gatzke A-K, Keyser KA, Arens R, Behrens GMN & Messerle M (2013) Priming of CD8+ T Cells against Cytomegalovirus-Encoded Antigens Is Dominated by Cross-Presentation. *J. Immunol.* **190**: 2767–2777
- Cebrian I, Croce C, Guerrero NA, Blanchard N & Mayorga LS (2016) Rab22a controls MHC-I intracellular trafficking and antigen cross-presentation by dendritic cells. *EMBO Rep.* **17**: 1753–1765
- Cebrian I, Visentin G, Blanchard N, Jouve M, Bobard A, Moita C, Enninga J, Moita LF, Amigorena S & Savina A (2011) Sec22b regulates phagosomal maturation and antigen crosspresentation by dendritic cells. *Cell* **147**: 1355–1368
- Cruvinel W de M, Mesquita D, Araújo JAP, Catelan TTT, de Souza AWS, da Silva NP & Andrade LEC (2010) Immune system - part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. *Rev. Bras. Reumatol.* **50**: 434–461 REVIEW
- Dantuma NP, Groothuis TAM, Salomons FA & Neefjes J (2006) A dynamic ubiquitin equilibrium couples proteasomal activity to chromatin remodeling. *J. Cell Biol.* **173**: 19–26
- Dasari V, Rehan S, Tey S-K, Smyth MJ, Smith C & Khanna R (2016) Autophagy and proteasome interconnect to coordinate cross-presentation through MHC class I pathway in B cells. *Immunol. Cell Biol.* **94**: 964–974
- Delamarre L, Pack M, Chang H, Mellman I & Trombetta ES (2005) Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science* **307**: 1630–1634
- Dustin ML (2014) The immunological synapse. *Cancer Immunol. Res.* **2**: 1023–1033 REVIEW
- van Endert P (2016) Intracellular recycling and cross-presentation by MHC class I molecules. *Immunol. Rev.* **272**: 80–96 REVIEW
- Goldberg AC & Rizzo LV (2015a) MHC structure and function – antigen presentation. Part 1. *Einstein (Sao Paulo)*. **13**: 153–156 REVIEW
- Goldberg AC & Rizzo LV (2015b) MHC structure and function - antigen presentation. Part 2. *Einstein (Sao Paulo)*. **13**: 157–162 REVIEW
- Grommé M, Uytendaele FG, Janssen H, Calafat J, van Binnendijk RS, Kenter MJ, Tulp A, Verwoerd D & Neefjes J (1999)

- Recycling MHC class I molecules and endosomal peptide loading. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**: 10326–10331
- Grotzke JE, Lu Q & Cresswell P (2013) Deglycosylation-dependent fluorescent proteins provide unique tools for the study of ER-associated degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**: 3393–3398
- Guermonprez P, Saveanu L, Kleijmeer M, Davoust J, Van Endert P & Amigorena S (2003) ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* **425**: 397–402
- Gutiérrez-Martínez E, Planès R, Anselmi G, Reynolds M, Menezes S, Adiko AC, Saveanu L & Guermonprez P (2015) Cross-presentation of cell-associated antigens by MHC class I in dendritic cell subsets. *Front. Immunol.* **6**: 363 REVIEW
- Houde M, Bertholet S, Gagnon E, Brunet S, Goyette G, Laplante A, Princiotta MF, Thibault P, Sacks D & Desjardins M (2003) Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* **425**: 402–406
- Huang AY, Bruce AT, Pardoll DM & Levitsky HI (1996) In vivo cross-priming of MHC class I-restricted antigens requires the TAP transporter. *Immunity* **4**: 349–355
- Huang AY, Golumbek P, Ahmadzadeh M, Jaffee E, Pardoll D & Levitsky H (1994) Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. *Science* **264**: 961–965
- Huyer G, Piluek WF, Fansler Z, Kreft SG, Hochstrasser M, Brodsky JL & Michaelis S (2004) Distinct machinery is required in *Saccharomyces cerevisiae* for the endoplasmic reticulum-associated degradation of a multispinning membrane protein and a soluble luminal protein. *J. Biol. Chem.* **279**: 38369–38378
- Chatterjee B, Smed-Sørensen A, Cohn L, Chalouni C, Vandlen R, Lee B-C, Widger J, Keler T, Delamarre L & Mellman I (2012) Internalization and endosomal degradation of receptor-bound antigens regulate the efficiency of cross presentation by human dendritic cells. *Blood* **120**: 2011–2020
- Iwasaki A & Medzhitov R (2015) Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat. Immunol.* **16**: 343–353 REVIEW
- Jancic C, Savina A, Wasmeier C, Tolmachova T, El-Benna J, Dang PM-C, Pascolo S, Gougerot-Pocidallo M-A, Raposo G, Seabra MC & Amigorena S (2007) Rab27a regulates phagosomal pH and NADPH oxidase recruitment to dendritic cell phagosomes. *Nat. Cell Biol.* **9**: 367–378
- de Jersey J, Snelgrove SL, Palmer SE, Teteris SA, Mullbacher A, Miller JFAP & Slattery RM (2007) Beta cells cannot directly prime diabetogenic CD8 T cells in nonobese diabetic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 1295–1300
- Joffre OP, Segura E, Savina A & Amigorena S (2012) Cross-presentation by dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* **12**: 557–569 REVIEW
- Jung S, Unutmaz D, Wong P, Sano G-I, De los Santos K, Sparwasser T, Wu S, Vuthoori S, Ko K, Zavala F, Pamer EG, Littman DR & Lang RA (2002) In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* **17**: 211–220
- Van Kaer L, Ashton-Rickardt PG, Ploegh HL & Tonegawa S (1992) TAP1 mutant mice are deficient in antigen presentation, surface class I molecules, and CD4-8+ T cells. *Cell* **71**: 1205–1214
- Knolle PA, Limmer A, Ohl J, Kurts C, Ljunggren H-G, Reiss Y, Groettrup M, Momburg F & Arnold B (2000) Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat. Med.* **6**: 1348–1354
- Kovacovics-Bankowski M & Rock KL (1995) A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* **267**: 243–246
- Kurts C, Cannarile M, Klebba I & Brocker T (2001) Dendritic cells are sufficient to cross-present self-antigens to CD8 T cells in vivo. *J. Immunol.* **166**: 1439–1442
- Kurts C, Heath WR, Carbone FR, Allison J, Miller JF & Kosaka H (1996) Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens in vivo. *J. Exp. Med.* **184**: 923–930
- Kurts C, Kosaka H, Carbone FR, Miller JF & Heath WR (1997) Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells. *J. Exp. Med.* **186**: 239–245
- Kurts C, Robinson BWS & Knolle PA (2010) Cross-priming in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **10**: 403–414 REVIEW
- Lloyd DJ, Wheeler MC & Gekakis N (2010) A point mutation in Sec61alpha1 leads to diabetes and hepatosteatosis in mice. *Diabetes* **59**: 460–470
- Luckashenak N, Schroeder S, Endt K, Schmidt D, Mahnke K, Bachmann MF, Marconi P, Deeg CA & Brocker T (2008) Constitutive Crosspresentation of Tissue Antigens by Dendritic Cells Controls CD8+ T Cell Tolerance In Vivo. *Immunity* **28**: 521–532
- Lyman MA, Aung S, Biggs JA & Sherman LA (2004) A spontaneously arising pancreatic tumor does not promote the differentiation of naive CD8+ T lymphocytes into effector CTL. *J. Immunol.* **172**: 6558–6567
- Ma W, Zhang Y, Vigneron N, Stroobant V, Thielemans K, van der Bruggen P & Van den Eynde BJ (2016) Long-Peptide Cross-Presentation by Human Dendritic Cells Occurs in Vacuoles by Peptide Exchange on Nascent MHC Class I Molecules. *J. Immunol.* **196**: 1711–1720
- Mantegazza AR, Savina A, Vermeulen M, Pérez L, Geffner J, Hermine O, Rosenzweig SD, Faure F & Amigorena S (2008) NADPH oxidase controls phagosomal pH and antigen cross-presentation in human dendritic cells. *Blood* **112**: 4712–4722

- Mehnert M, Sommer T & Jarosch E (2014) Der1 promotes movement of misfolded proteins through the endoplasmic reticulum membrane. *Nat. Cell Biol.* **16**: 77–86
- Ménager J, Ebstein F, Oger R, Hulin P, Nedellec S, Duverger E, Lehmann A, Kloetzel P-M, Jotereau F & Guilloux Y (2014) Cross-presentation of synthetic long peptides by human dendritic cells: a process dependent on ERAD component p97/VCP but Not sec61 and/or Derlin-1. *PLoS One* **9**
- Merzougui N, Kratzer R, Saveanu L & van Endert P (2011) A proteasome-dependent, TAP-independent pathway for cross-presentation of phagocytosed antigen. *EMBO Rep.* **12**: 1257–1264
- Nair-Gupta P, Baccharini A, Tung N, Seyffer F, Florey O, Huang Y, Banerjee M, Overholtzer M, Roche PA, Tampé R, Brown BD, Amsen D, Whiteheart SW & Blander JM (2014) TLR signals induce phagosomal MHC-I delivery from the endosomal recycling compartment to allow cross-presentation. *Cell* **158**: 506–521
- Neefjes J, Jongsma MLM, Paul P & Bakke O (2011) Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* **11**: 823–836 REVIEW
- Pfeifer JD, Wick MJ, Roberts RL, Findlay K, Normark SJ & Harding C V. (1993) Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature* **361**: 359–362
- Di Pucchio T, Chatterjee B, Smed-Sørensen A, Clayton S, Palazzo A, Montes M, Xue Y, Mellman I, Banchereau J & Connolly JE (2008) Direct proteasome-independent cross-presentation of viral antigen by plasmacytoid dendritic cells on major histocompatibility complex class I. *Nat. Immunol.* **9**: 551–557
- Rapoport TA (2007) Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature* **450**: 663–669 REVIEW
- Redmond WL & Sherman LA (2005) Peripheral Tolerance of CD8 T Lymphocytes. *Immunity* **22**: 275–284 REVIEW
- Reis e Sousa C & Germain RN (1995) Major histocompatibility complex class I presentation of peptides derived from soluble exogenous antigen by a subset of cells engaged in phagocytosis. *J. Exp. Med.* **182**: 841–851
- Rock KL, Sigal LJ, Crotty S & Andino R (1999) Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen. *Nature* **398**: 77–80
- Römisch K (2017) A Case for Sec61 Channel Involvement in ERAD. *Trends Biochem. Sci.* **42**: 171–179 REVIEW
- Rybicka JM, Balce DR, Chaudhuri S, Allan ERO & Yates RM (2012) Phagosomal proteolysis in dendritic cells is modulated by NADPH oxidase in a pH-independent manner. *EMBO J.* **31**: 932–944
- Rybicka JM, Balce DR, Khan MF, Krohn RM & Yates RM (2010) NADPH oxidase activity controls phagosomal proteolysis in macrophages through modulation of the luminal redox environment of phagosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**: 10496–10501
- Samie M & Cresswell P (2015) The transcription factor TFEB acts as a molecular switch that regulates exogenous antigen-presentation pathways. *Nat. Immunol.* **16**: 729–736
- Saveanu L, Carroll O, Weimershaus M, Guermonprez P, Firat E, Lindo V, Greer F, Davoust J, Kratzer R, Keller SR, Niedermann G & van Endert P (2009) IRAP identifies an endosomal compartment required for MHC class I cross-presentation. *Science* **325**: 213–217
- Savina A, Jancic C, Hugues S, Guermonprez P, Vargas P, Moura IC, Lennon-Duménil A-M, Seabra MC, Raposo G, Amigorena S & al. et (2006) NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells. *Cell* **126**: 205–218
- Savina A, Peres A, Cebrian I, Carmo N, Moita C, Hacohen N, Moita LF, Amigorena S, Derrow CW, Harris C & al. et (2009) The small GTPase Rac2 controls phagosomal alkalization and antigen crosspresentation selectively in CD8(+) dendritic cells. *Immunity* **30**: 544–555
- Shen L, Sigal LJ, Boes M & Rock KL (2004) Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crosspresentation in vivo. *Immunity* **21**: 155–165
- Schnorrer P, Behrens GMN, Wilson NS, Pooley JL, Smith CM, El-Sukkari D, Davey G, Kupresanin F, Li M, Maraskovsky E, Belz GT, Carbone FR, Shortman K, Heath WR & Villadangos JA (2006) The dominant role of CD8+ dendritic cells in cross-presentation is not dictated by antigen capture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 10729–10734
- Song R & Harding C V (1996) Roles of proteasomes, transporter for antigen presentation (TAP), and beta 2-microglobulin in the processing of bacterial or particulate antigens via an alternate class I MHC processing pathway. *J. Immunol.* **156**: 4182–4190
- Steele LN, Balsara ZR & Starnbach MN (2004) Hematopoietic cells are required to initiate a Chlamydia trachomatis-specific CD8+ T cell response. *J. Immunol.* **173**: 6327–6337
- Stein A, Ruggiano A, Carvalho P & Rapoport TA (2014) Key steps in ERAD of luminal ER proteins reconstituted with purified components. *Cell* **158**: 1375–1388
- Sutherland RM, Zhan Y, Carrington EM, Londrigan SL & Lew AM (2011) Selective Depletion of Cross-Presenting Dendritic Cells Enhances Islet Allograft Survival. *Cell Transplant.* **20**: 467–474
- The MHC sequencing consortium (1999) Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. The MHC sequencing consortium. *Nature* **401**: 921–923

- Tzelepis F, Verway M, Daoud J, Gillard J, Hassani-Ardakani K, Dunn J, Downey J, Gentile ME, Jaworska J, Sanchez AMJ, Nédélec Y, Vali H, Tabrizian M, Kristof AS, King IL, Barreiro LB & Divangahi M (2015) Annexin1 regulates DC efferocytosis and cross-presentation during Mycobacterium tuberculosis infection. *J. Clin. Invest.* **125**: 752–768
- Wang Y, Wang L, Hu Z, Ji Y, Lin Z, Yuan H, Ji M & Lou H (2013) A novel derivative of riccardin D induces cell death through lysosomal rupture in vitro and inhibits tumor growth in vivo. *Cancer Lett.* **329**: 207–216
- Wearsch PA & Cresswell P (2008) The quality control of MHC class I peptide loading. *Curr. Opin. Cell Biol.* **20**: 624–631  
REVIEW
- Wei ML & Cresswell P (1992) HLA-A2 molecules in an antigen-processing mutant cell contain signal sequence-derived peptides. *Nature* **356**: 443–446
- Weihofen A, Binns K, Lemberg MK, Ashman K & Martoglio B (2002) Identification of Signal Peptide Peptidase, a Presenilin-Type Aspartic Protease. *Science* **296**: 2215–2218
- Weimershaus M, Maschalidi S, Sepulveda F, Manoury B, van Endert P & Saveanu L (2012) Conventional Dendritic Cells Require IRAP-Rab14 Endosomes for Efficient Cross-Presentation. *J. Immunol.* **188**: 1840–1846
- Wheeler MC & Gekakis N (2012) Defective ER associated degradation of a model luminal substrate in yeast carrying a mutation in the 4th ER luminal loop of Sec61p. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **427**: 768–773
- Wieczorek M, Abualrous ET, Sticht J, Álvaro-Benito M, Stolzenberg S, Noé F & Freund C (2017) Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation. *Front. Immunol.* **8**: 292  
REVIEW
- Willer M, Forte GMA & Stirling CJ (2008) Sec61p is required for ERAD-L: genetic dissection of the translocation and ERAD-L functions of Sec61P using novel derivatives of CPY. *J. Biol. Chem.* **283**: 33883–33888
- Xie S, Bahl K, Reinecke JB, Hammond GR V, Naslavsky N & Caplan S (2016) The endocytic recycling compartment maintains cargo segregation acquired upon exit from the sorting endosome. *Mol. Biol. Cell* **27**: 108–126
- Zattas D & Hochstrasser M (2015) Ubiquitin-dependent protein degradation at the yeast endoplasmic reticulum and nuclear envelope. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **50**: 1–17  
REVIEW
- Zehner M, Chasan AI, Schuette V, Embgenbroich M, Quast T, Kolanus W & Burgdorf S (2011) Mannose receptor polyubiquitination regulates endosomal recruitment of p97 and cytosolic antigen translocation for cross-presentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**: 9933–9938
- Zehner M, Marschall ALL, Bos E, Schloetel J-GG, Kreer C, Fehrenschild D, Limmer A, Ossendorp F, Lang T, Koster AJJ, Dübel S & Burgdorf S (2015) The Translocon Protein Sec61 Mediates Antigen Transport from Endosomes in the Cytosol for Cross-Presentation to CD8+ T Cells. *Immunity* **42**: 850–863
- Zou L, Zhou J, Zhang J, Li J, Liu N, Chai L, Li N, Liu T, Li L, Xie Z, Liu H, Wan Y & Wu Y (2009) The GTPase Rab3b/3c-positive recycling vesicles are involved in cross-presentation in dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 15801–15806