

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a žádám, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně citovat.

UNIVERSITÄT
München
Fakultät für Biologie
Prüfungsausschuss
18044, München, Germany

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Vývoj virových a bakteriálních nosičů pro dopravu
antigenů do savčích buněk a charakterizace
jejich imunogenních vlastností**

Martin M A R E K

30. dubna 2007, Praha

Vedoucí diplomové práce:

Doc. RNDr. Jitka Forstová, CSc.

Vedoucí Laboratoře virologie
Katedra genetiky a mikrobiologie
Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze
Viničná 5, 128 44 PRAHA 2

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně, pod vedením vedoucí diplomové práce a s použitím citované literatury.

V Praze dne 30.4. 2007


Martin MAREK

Motto:

„Virus, to je špatná zpráva v proteinové obálce“

Sir Peter Medewar (1960)

„Umělé virové částice, to jsou proteinové obálky zbavené zákeřných psaníček v podobě genetické informace, avšak oplývající řadou unikátních vlastností“

Martin Marek (2007)

Poděkování

Nejdříve bych chtěl poděkovat vedoucí mé diplomové práce **Doc. RNDr. Jitce Forstové, CSc.** za to, že mi umožnila připojit se k její pracovní skupině, za její odborné vedení, všestrannou pomoc, otevřenost a vytváření přátelské atmosféry v laboratoři. Strávené tři roky dobrodružného objevování tajů virologie byly skutečně nádherné!

Dále bych chtěl poděkovat **Doc. RNDr. Vladimíru Holáňovi, CSc.** za umožnění provádění imunologických pokusů v jeho laboratořích. Obzvláště pak hluboce děkuji přednímu členovi jeho týmu **Mgr. Janu Fričovi**, za přípravu myeloidních dendritických buněk a provedení série velice náročných imunologických analýz, včetně zabezpečení *in vivo* pokusů a instrumentace průtokové cytometrie.

Též bych velice rád poděkoval velké trojici virologů: **Mgr. Veronice Boháčové, Mgr. Lence Horníkové** a **Mgr. Marianně Stančíkové** za trpělivost, se kterou mi předávali své zkušenosti nejen s ultracentrifugačními metodami a preparací virových částic při mých virologických začátcích. Zejména pak děkuji především **Veronice** za perfektní uvedení do praktické bakulovirologie a klonování DNA.

Za pomoc a zhotovení bezvadných elektron-mikroskopických snímků bych rád poděkoval **Mgr. Vojtěchu Žilovi** a **RNDr. Jitce Štokrové, CSc.**

Rovněž hluboce děkuji všem pracovníkům a studentům z laboratoří 004 a 006 jak za půjčování šamanských roztoků a laboratorního materiálu, tak i za vytváření příjemného pracovního prostředí.

V neposlední řadě bych chtěl poděkovat své přítelkyni **Ing. Jitce Eberové, Ph.D.** za nastrčení do světa virů, dále pak za pochopení, trpělivost a toleranci, ale také za rady a doporučení při klonování a sekvencování DNA.

Srdečně děkuji svým rodičům za podporu, kterou mi věnovali v průběhu studia.

Předkládaná diplomová práce vznikla v letech 2004–2007 za podpory grantu Centrum 1M138896301 "Nová antivirotika a antineoplastika", ID 1M0508 (podporováno MŠMT).

Development of viral and bacterial vehicles for antigen delivery into mammalian cells

Abstract

We have recently developed an antigen delivery vehicle based on the mouse polyomavirus-like particles, produced in baculovirus expression system, and carrying EGFP model protein inside pseudocapsids (EGFP-VLPs). Chimeric EGFP-VLPs entered mouse and human epithelial cells, fibroblasts and human and mouse dendritic cells efficiently (Bouřa et al., 2005). The role of viral structural proteins in the induction of adaptive immune responses is poorly understood. To address this issue, we focused on the effect of VP1 and chimeric "green" polyomavirus-like particles on mouse bone marrow-derived dendritic cell (BMDCs) activation. In vitro, VP1 VLPs, as well as EGFP-VLPs caused upregulation of phenotypic markers – MHCgp II and co-stimulatory molecules CD80 and CD86 in dose-dependent manner. Moreover, exposure to polyomavirus-like particles effectively induced a strong proinflammatory cytokine IL-12 secretion by BMDCs.

Here, we also show that BMDCs loaded by EGFP-VLPs are able to induce proliferation of both antigen-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells, in contrast to naive T cells. Indeed, the induction of IL-2 and INF- γ production by T cells after *ex vivo* restimulation with EGFP-VLP-loaded BMDCs was demonstrated by quantitative enzyme-linked immunosorbent assay. In parallel experiments, rEGFP-loaded BMDCs recognized EGFP-specific T cell immunity in mice immunized by EGFP-VLPs. On the other hand, the EGFP-VLPs applied by intranasal administration also caused the induction of systemic neutralizing anti-VP1 antibodies. However, production of antibodies against transported cargo (anti-EGFP) was not detected. We also showed that BMDCs pulsed with EGFP-VLPs and simultaneously treated with endosomal acidification or proteasome inhibitors were not capable to activate T cell proliferation. These results, supported also by confocal microscopy, indicate that murine BMDCs can process and cross-present EGFP-VLPs using an endosome-to-cytosol pathway. Furthermore, we observed moderate decrease of the number of splenic CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in immunized mice. No reduction of Treg cells was observed in lymph nodes.

More recently, we have worked on construction of an alternative antigen carrier derived from cholera holotoxin. Cholera holotoxin-like protein complex carrying EGFP fused with C-terminal domain of CTA2 subunit, instead of catalytic (toxic) A1 subunit, have been prepared and analyzed for their potential production in insect cells. Immunofluorescent microscopy and Western-blot analyses proved efficient production both CTB and EGFP-CTA2 proteins in insect cells. CTB molecule was found to form a pentamers. For the present, purification of cholera holotoxin-like molecules using D-galactose affinity chromatography did not give satisfactory yield.

OBSAH

KAPITOLA 1: ÚVOD	1
KAPITOLA 2: LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
2.1 STRATEGIE A PŘÍSTUPY VE VÝVOJI NOVÝCH TYPŮ VAKCÍN	3
2.1.1 Pozadí vývoje vakcín proti virovým infekcím a nádorovým onemocněním	3
2.1.2 Princip a perspektivy vakcín založených na dendritických buňkách	5
2.2 UMĚLÉ VIROVÉ ČÁSTICE: STRUKTURA, VLASTNOSTI A (NANO)BIOTECHNOLOGICKÉ APLIKACE	7
2.2.1 Rekombinantní virové částice malých nádorových DNA virů	8
2.2.1.1 Struktura a architektura polyomavirových nanočástic	8
2.2.1.2 Vstup polyomavirů do savčí buňky a jejich pohyb k buněčnému jádru	11
2.2.1.3 Polyomavirové nanočástice jako nosiče nukleových kyselin, polypeptidů a nízkomolekulárních sloučenin	13
2.2.2 Imunogenní vlastnosti umělých virových částic a jejich modulace	17
2.2.3 Umělé virové částice jako stavební materiál pro nanotechnologie	19
2.3 BAKTERIÁLNÍ NOSIČE ANTIGENŮ A IMUNOMODULÁTORY	21
2.3.1 Bakteriální enterotoxiny a jejich imunomodulační vlastnosti	21
2.3.1.1 Struktura a biologické funkce cholerového toxinu	22
2.3.1.2 Endocytosa a směr vnitrobuněčného transportu	24
2.3.1.3 Translokace katalytické podjednotky do cytosolu	26
2.3.1.4 Vazba na GM1 gangliosidy a její vliv na toxicitu	27
2.3.1.5 Imunomodulační vlastnosti ADP-ribosylačních enterotoxinů	28
2.3.1.6 Příprava netoxických forem pro účely vakcinace	29
2.3.1.7 Imunostimulační atributy intaktní B podjednotky cholerového toxinu	30
2.3.2 Oligonukleotidy obsahující nemetylované CpG motivy	31
2.3.2.1 Mechanismus interakce s imunocyty	31
2.3.2.2 Aplikace CpG ODN při vývoji nových typů vakcín	32
2.3.3 Mofosforyl lipid A je dalším efektivním imunomodulátorem	33
2.4 NĚKTERÉ DALŠÍ BIOMOLEKULY A PŘÍSTUPY V MODULACI IMUNITNÍCH ODPOVĚDÍ	34
2.5 HMYZÍ VIRY VE SLUŽBÁCH MOLEKULÁRNÍCH BIOLOGŮ A BIOTECHNOLOGICKÝCH SPOLEČNOSTÍ	35
2.5.1 Životní cyklus a strategie bakulovirů	36
2.5.2 Letmý pohled do struktury biologie bakulovirů	38
2.5.2.1 Hlavní obalový glykoprotein gp64	39
2.5.3 Od perspektivních biopesticidů ke genové terapii	40
2.5.4 Historie bakulovirových expresních systémů	42
2.5.4.1 Původní strategie přípravy rekombinantních bakulovirů	42
2.5.4.2 Bakulovirové expresní systémy nové generace	43
2.5.4.3 Některé výhody, ale i omezení produkce proteinů v hmyzích buňkách	44
KAPITOLA 3: CÍLE DIPLOMÉ PRÁCE	46
KAPITOLA 4: MATERIÁL A METODY	48
4.1 POUŽITÉ BAKULOVIRY A JEJICH CHARAKTERISTIKA	48
4.2 BAKTERIÁLNÍ KMENY	49
4.3 HMYZÍ A SAVČÍ BUNĚČNÉ LINIE A PRIMÁRNÍ KULTURY	49
4.4 KLONOVACÍ, EXPRESNÍ A DONOROVÉ VEKTORY	50
4.5 PROTILÁTKY	51
4.5.1 Primární protilátky	51
4.5.2 Sekundární protilátky	52
4.6 PŘEPARACE, AMPLIFIKACE A MODIFIKACE MOLEKUL DNA	53
4.6.1 Izolace plasmidové DNA alkalickou lyzí (Sambrook et al., 1989)	53
4.6.2 Vyhledávání rekombinantních klonů <i>E. coli</i> restrikční analýzou	54
4.6.3 Odstranění molekul RNA ze vzorku plasmidové DNA	54
4.6.4 Preparace bacmidové DNA	55
4.6.5 Izolace fragmentů DNA z agarosového gelu	55
4.6.6 Separace a vizualizace molekul DNA v agarosovém gelu	55
4.6.7 Definované stěpení DNA restrikčními endonuklesami	56
4.6.8 Defosforylace plasmidové DNA	57
4.6.9 Rekombinace DNA <i>in vitro</i> – ligace	57

4.6.10	Protokol PCR amplifikace a používané oligonukleotidy	57
4.6.11	Purifikace PCR produktů na chromatografických kolonkách	58
4.6.12	Identifikace bakteriálních klonů pomocí PCR (Gussow a Clackson, 1989)	58
4.6.13	Stanovení nukleotidové sekvence DNA	59
4.7	PURIFIKACE A CHARAKTERIZACE REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ A PSEUDOKPESID	59
4.7.1	Izolace umělých virových částic z hmyzích buněk	59
4.7.1.1	Příprava lyzátů infikovaných hmyzích buněk	59
4.7.1.2	Centrifugace přes polštář sacharosy	60
4.7.1.3	Isopyktnická centrifugace v gradientu CsCl	60
4.7.1.4	Isokinetická centrifugace v gradientu sacharosy	60
4.7.2	Afinitní chromatografie	61
4.7.3	Dialýza	61
4.7.4	Imunodot-blot	61
4.7.5	SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE)	61
4.7.6	Přenos proteinů na nitrocelulosovou membránu (Western blot)	62
4.7.7	Imunochemická detekce proteinů	62
4.7.8	Stanovení koncentrace proteinů dle Bradfordové	63
4.8	<i>Escherichia coli</i> – KULTIVACE, TRANSFORMACE A UCHOVÁVÁNÍ	63
4.8.1	Kultivace <i>E. coli</i>	63
4.8.2	Vnesení plasmidové DNA do bakteriálních buněk	63
4.8.2.1	Příprava kompetentních buněk pomocí CaCl ₂	64
4.8.2.2	Pracovní postup transformace <i>E. coli</i> DH5α buněk teplotním šokem	64
4.8.2.3	Příprava kompetentních buněk <i>E. coli</i> DH10 Bac pro transformaci teplotním šokem	65
4.8.2.4	Transformace <i>E. coli</i> DH10 Bac metodou teplotního šoku	65
4.8.2.5	Příprava kompetentních buněk pro elektroporaci	66
4.8.2.6	Transformace <i>E. coli</i> pomocí elektroporace	66
4.8.3	Dlouhodobé skladování bakteriálních <i>E. coli</i> buněk	67
4.9	BAKULOVÍROVÝ EXPRESNÍ SYSTÉM	67
4.9.1	Pasážování hmyzích buněk	67
4.9.2	Infekce hmyzích buněk rekombinantním bakulovirem	67
4.9.3	Plaková analýza	68
4.9.4	Transfekce hmyzích buněk	68
4.9.5	Fixace hmyzích buněk pro účely imunofluorescenční mikroskopie	68
4.9.6	Schématický postup purifikace polyomavírových pseudokapsid z hmyzích buněk	69
4.10	NEPŘÍMÁ IMUNOFLUORESCENCE	69
4.11	IMUNOLOGICKÉ ANALÝZY A PŘÍSTUPY	70
4.11.1	Imunizační schéma	70
4.11.2	Příprava myeloidních dendritických buněk	70
4.11.3	Pseudoinfekce dendritických buněk a měření fenotypových znaků jejich maturace	70
4.11.4	Stanovení proliferace T buněk a jejich produkce IL-2 a INF-γ	71
4.11.4.1	Příprava antigen prezentujících buněk	71
4.11.4.2	Inhibice zpracování a prezentace antigenu	71
4.11.4.3	Vybití CD4 ⁺ nebo CD8 ⁺ T buněk	71
4.11.4.4	Fluorescenční značení T buněk	72
4.11.4.5	Vlastní stanovení specifické proliferace T buněk a jejich produkce IL-2 a INF-γ	72
4.11.5	Neradioaktivní <i>in vivo</i> cytotoxický test	73
4.11.6	Stanovení počtu Foxp3 ⁺ regulačních T buněk	73
4.11.7	ELISA – nepřímé provedení	73
4.11.8	Průtoková cytometrie	74
KAPITOLA 5: VÝSLEDKY	75
5.1	EXPRESNÍ PURIFIKACE A CHARAKTERIZACE VPIA "ZELENÝCH" POLYOMAVÍROVÝCH PSEUDOKAPESID	75
5.2	INTERAKCE CHIMERICKÝCH POLYOMAVÍROVÝCH NANOČÁSTIC S MYŠÍMI IMUNOCYTY	80
5.2.1	Stanovení hladiny aktivace vybraných fenotypových a funkčních znaků maturace dendritických buněk	80
5.2.2	Chimerické polyomavírové částice indukují <i>ex vivo</i> proliferaci T lymfocytů a jejich produkci IL-2 a INF-γ buněk	84
5.2.3	Imunizace "zelenými" polyomavírovými částicemi indukuje tvorbu EGFP-specifických T lymfocytů	87
5.2.4	V imunizovaných myších nevznikají neutralizační protilátky proti přepravovanému antigenu	88

5.2.5	Polyomavírové částice ovlivňují hladinu CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ regulačních T (Treg) buněk	88
5.2.6	Cytotoxický test <i>in vivo</i>	92
5.2.7	Rozplétání mechanismů zpracování a prezentace antigenních peptidů odvozených od polyomavírových nanočástic	93
5.3	KONSTRUKCE EXPRESNÍ KAZETY PRO SIMULTÁNNÍ PRODUKCI PROTEINŮ VP1 A t-VP3 MYŠÍHO POLYOMAVIRU	98
5.4	PŘÍPRAVA ANTIGENNÍHO NOSIČE NA BÁSI NETOXICKÉ FORMY CHOLEROVÉHO TOXINU	101
5.4.1	Struktura expresní kazety pro produkci cholerového toxinu	101
5.4.2	Produkce, purifikace a charakterizace "zeleného" (netoxického) cholerového toxinu ..	107
KAPITOLA 6: DISKUSE	111
6.1	INTERAKCE UMĚLÝCH VIROVÝCH ČÁSTIC MALÝCH NEOBALENÝCH DNA VIRŮ S DENDRITICKÝMI BUŇKAMI	111
6.2	NOSIČE ANTIGENŮ ODVOZENÉ OD MYŠÍHO POLYOMAVIRU A JEJICH IMUNOTERAPEUTICKÉ APLIKACE	116
6.3	PATOGENNÍ MIKROORGANISMY A REGULAČNÍ T BUŇKY	118
6.4	PRODUKCE NETOXICKÉ FORMY CHOLEROVÉHO TOXINU V HMYZÍCH BUŇKÁCH	119
KAPITOLA 7: SOUHRN	121
7.1	INTERAKCE UMĚLÝCH POLYOMAVIROVÝCH ČÁSTIC S MYŠÍMI DENDRITICKÝMI BUŇKAMI	121
7.2	CHOVÁNÍ "ZELENÝCH" POLYOMAVIROVÝCH ČÁSTIC V TĚLECH IMUNIZOVANÝCH MYŠÍ	121
7.3	PŘÍPRAVA EXPRESNÍ KAZETY PRO SIMULTÁNNÍ PRODUKCI VP1 A t-VP3 PROTEINŮ MYŠÍHO POLYOMAVIRU	122
7.4	EXPRESNÍ A CHARAKTERIZACE NETOXICKÉ "ZELENÉ" FORMY CHOLEROVÉHO TOXINU V HMYZÍCH BUŇKÁCH	122
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	124
9. PUBLIKACE A PŘÍSPĚVKY NA KONFERENCÍCH	133

Seznam použitých zkratk

zkratka	anglický název	český název
ADP	adenosine diphosphate	adenosin difosfát
APC	antigen-presenting cell	buňka předkládající antigen
BSA	bovine serum albumin	hovězí sérový albumin
bp	pair of bases	pár bází
cAMP	cyclic adenosine-3',5'-monophosphate	cyklický adenosin-3',5'-monofosfát
CD	cluster of differentiation	diferenční antigen
CD-40L	CD40 ligand	CD40 ligand
CT	cholera toxin	cholery toxín
CTA2	cholera toxin A2 subunit	A2 podjednotka cholery toxínu
CTB	cholera toxin B subunit	B podjednotka cholery toxínu
CTL	cytotoxic T cell	cytotoxický T lymfocyt
CTLA-4	cytotoxic-T-lymphocyte antigen (CD152)	diferenční antigen cytotoxických T lymfocytů
Da	dalton	dalton
DC	dendritic cell	dendritická buňka
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
ERAD	endoplasmic reticulum associated degradation system	systém degradace proteinů spojený s endoplasmatickým retikulem
ERK	extracellular signal-regulated kinase	kinasa s funkcí a aktivitou MAPK kinasy
FCS	fetal calf serum	fetální telecí sérum
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů
gp	glycoprotein	glykoprotein
GTP	guanosine triphosphate	guanosen trifosfát
h	hour	hodina
HaPyV	hamster polyomavirus	křeččí polyomavirus
HIV	human immunodeficiency virus	virus lidské imunodeficiency
HPV	human papillomavirus	lidský papilomavirus
HSP	heat shock protein	protein tepelného šoku
IL	interleukin	interleukin
INF	interferon	interferon
KDEL	Lys-Asp-Glu-Leu motif	Lys-Asp-Glu-Leu motiv
LTI	<i>Escherichia coli</i> heat-labile type I toxin	<i>Escherichia coli</i> teplotně labilní toxin typu I
LTH	<i>Escherichia coli</i> heat-labile type II toxin	<i>Escherichia coli</i> teplotně labilní toxin typu II
LTB	<i>Escherichia coli</i> heat-labile toxin B subunit	B podjednotka <i>Escherichia coli</i> teplotně labilního toxinu
MAPK	mitogen-activated protein kinase	proteinkinasa aktivovaná mitogenem
MHC	major histocompatibility complex	hlavní histokompatibilní komplex
min	minute	minuta
MIP	macrophage inflammatory protein	chemotaktický faktor pro monocyty
MLP	monophosphoryl lipid A	monofosforyl lipid A
MPyV	mouse polyomavirus	myší polyomavirus
NAD ⁺	nicotinamide adenine dinucleotide	nikotinamid adenin dinukleotid
NF κ B	nuclear factor κ chain transcription in B cells	transkripční faktor NF κ B zapínající v B buňkách transkripci genů pro κ řetězců imunoglobulinů
NK	natural killer	přirozený zabíječ
ODN	oligodeoxynucleotides	oligodeoxynukleotidy

PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis	polyakrylamidová gelová elektroforéza
PAMP	pathogen-associated molecular pattern	struktury charakteristické pro patogenní mikroorganismy
PCR	polymerase chain reaction	polymerasová řetězová reakce
PDI	protein disulfide isomerase	protein disulfid isomerasa
p.i.	post infection	po infekci
PIP₂	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
RANK-L	ligand to receptor activator of NF κ B	ligand receptorového aktivátoru dráhy NF κ B
RANTES	regulated upon activation normal T cell expressed and secreted	chemotaktický faktor, chemokin
rBac	recombinant baculovirus	rekombinantní bakulovirus
RNA	ribonucleic acid	ribonukleová kyselina
rpm	rounds per minute	otáčky za minutu
s	second	sekunda
SDS	sodium dodecyl sulphate	dodecylsulfát sodný
SIV	simian immunodeficiency virus	virus opičí imunodeficiency
TAP	transporter associated with antigen processing	peptidový transportér
Tc	cytotoxic T cell	cytotoxický T lymfocyt
TGF	transforming growth factor	transformující růstový faktor
Th	helper T cell	pomocný T lymfocyt
TLR	Toll-like receptors	receptory odvozené od Toll receptoru Drosophily
TNF	tumour necrosis factor	faktor nekrotizující nádory
Treg	regulatory T cell	regulační T buňka
VLP	virus-like particle	částice podobná virionu, pseudokapsida, umělá virová částice, virová nanočástice, VLP struktura
VP1	viral protein 1	virový (majoritní kapsidový) protein 1
VP3	viral protein 3	virový (minoritní kapsidový) protein 3
t-VP3	truncated-viral protein 3	zkrácený virový (minoritní kapsidový) protein 3

Kapitola 1

ÚVOD

Evoluce společenstev organismů vyústila v průběhu miliónů let v mnoho typů mezidruhových interakcí, od neutralismu, oddělené ko-existence až po velice těsné symbiotické nebo parazitické vztahy. Některé parazitické organismy vyvinuly velice sofistikované mechanismy interakce s jejich hostiteli, a tak „uzavřely“ vzájemný a trvalý svazek s hostitelským organismem. Typicky obligatorními parazity jsou – viry, které se odlišují od buněčných organismů především jednoduchostí své organizace. Na straně druhé mají viry s buněčnými organismy řadu vlastností natolik společných, že slouží i jako modelové systémy pro poznávání elementárních procesů a mechanismů probíhajících v buňce. Za zmínku stojí například objevy procesů replikace DNA na modelu bakteriofága $\Phi X174$, mechanismu sestřihu pre-mRNA molekul u eukaryotických organismů při zkoumání pozdní transkripce adenovirů, či onkogenní působení polyomavirů umožnilo nahlédnout do regulace soustrojí bučného cyklu. Kromě toho objev reversní transkripce, tj. přenos genetické informace z RNA do DNA, který do určité míry poopravil centrální dogma molekulární biologie o jednosměrném přenosu informace DNA \rightarrow RNA \rightarrow protein, byl učiněn taktéž právě u virů.

Studium molekulárních mechanismů morfogenese virů má obrovský význam i pro aplikované biologické obory, včetně potenciálu komerčního využití ve farmaceutickém průmyslu a biotechnologiích. V současné době je celosvětově vynakládáno velké úsilí pro přípravu účinných rekombinantních vakcín založených na umělých virových částicích, jejichž molekulární struktura byla v průběhu evoluce dokonale „vyladěna“ pro úspěšnou interakci a vstup viru do hostitelské buňky. Takto genově inženýrsky připravené virové partikule, lze použít buď nativní nebo je možné provést jejich různé strukturální modifikace za účelem zvýšení imunogenicity, presentace cizích epitopů, případně je plnit *in vitro* genovými konstrukty pro potřeby genové terapie. V návaznosti probíhá

intenzivní příprava a testování transgenních rostlin produkujících antigeny lidských virů, které by pak byly použitelné pro velmi příjemný způsob perorální imunizace jako tzv. jedlé vakcíny. Jiným, neméně zajímavým nanotechnologickým využitím je konstrukce jakýchsi supramolekulárních generátorů, kde by měly geometricky pravidelné virové částice sloužit jako lešení pro navěšování a multivalentní presentaci funkčních ligandů. Nicméně, tyto snahy se prozatím potýkají s řadou komplikací a neobjasněných mechanismů, jejichž detailní porozumění je nezbytným předpokladem úspěšného využití všech výše nastíněných terapeutických a (nano)biotechnologických potenciálů heterologně produkovaných virových částic.

Kapitola 2

LITERÁRNÍ PŘEHLED

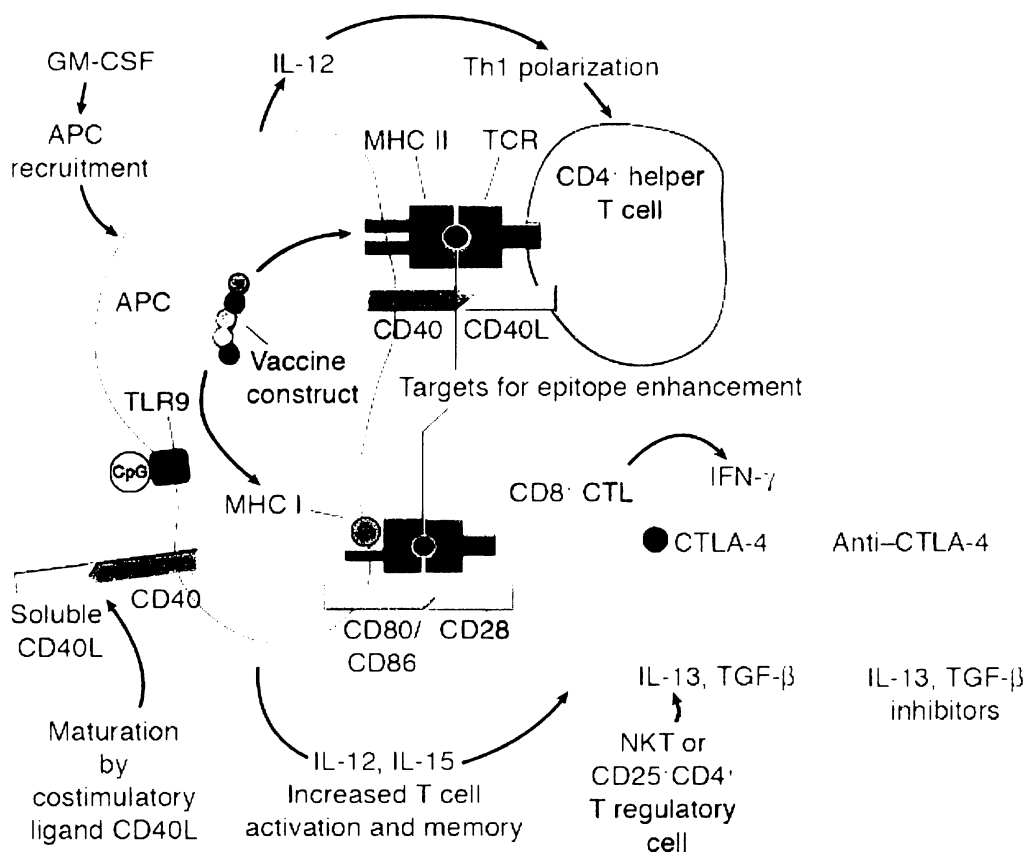
2.1 Strategie a přístupy ve vývoji nových typů vakcín

Vztah parazit-hostitel je do určité míry asymetrický, jelikož hostitel má zájmy zcela protichůdné zájmům parazita. Naproti tomu parazit, tím že potřebuje živého hostitele jako své životní prostředí, má alespoň částečně shodné zájmy shodné se zájmy hostitelského organismu – parazitovaný hostitel musí přinejmenším určitou dobu přežít a v některých případech se pokud možno i rozmnožovat. Tato skutečnost, spolu s nutností vyvinout mechanismy schopné překonávat systémy specifické fyziologické obrany hostitele, vyžaduje rozsáhlá a velmi těsná evoluční přizpůsobení parazita hostiteli. Hostitelský organismus na tato přizpůsobení evolučně reaguje, vytváří příslušná protiopatření, takže evoluce parazita má spíše charakter ko-evoluce dvojice parazit-hostitel. Mikroorganismy byly patrně hlavní příčinou vzniku imunitního obranného systému ve fylogenesi a významnou měrou ovlivňují vyhrávaní imunitního systému i v průběhu postnatálního ontogenetického vývoje.

2.1.1 Pozadí vývoje vakcín proti virovým infekcím a nádorovým onemocněním

Ačkoliv pokroky v molekulární biologii podpořily naději na vývoj nových typů efektivních vakcín proti virovým infekcím a hodně úsilí bylo celosvětově vynaloženo na tomto poli výzkumu, donedávna pouze jedna rekombinantní vakcína založená na povrchovém antigenu viru hepatitidy B získala licenci a je úspěšně používána již 20 let (Hilleman, 2001). V průběhu posledních let však byla navrhována celá řada nových strategií ve vývoji vakcín, jež jsou založeny na nejnovějších poznatcích složek imunitního systému, některé z nich již dospěly do stádia klinických zkoušek. Většina těchto strategií je zamě-

řena na lepší **indukci produkce různých typů protilátek**, které poté mohou působit preventivně proti infekcím, když jsou přítomny v dostatečném množství a na správném místě v době infekce. Terčem zájmu je taktéž **indukce efektorových cytotoxických CD8⁺ T buněk (Tc, CTL)**, které dokáží rozpoznat a cíleně zabít buňky infikované příslušným virem, což významně napomáhá totální likvidaci infekce (Berzofsky et al., 2004b). Takto indukované CTL dokáží detekovat jakékoliv virové proteiny syntetizované uvnitř infikovaných buněk, které jsou proteosomálně štěpeny na peptidové fragmenty, transportovány do endoplasmatického retikula a odtud nesený na komplexech MHC gp I na buněčný povrch. Antigenní peptidy takto presentované na povrchu **profesionálních buněk předkládajících antigen (angl. antigen-presenting cell, APC)**, především dendritických buněk ve vazbě s MHC gp I jsou rozpoznávány antigenně specifickými receptory prekurzorových Tc lymfocytů. Tato interakce má charakter prvního signálu. Profesionální antigen předkládající buňky musí mít rovněž patřičné adhezivní molekuly a kostimulační molekuly (CD80, CD86; ligandy receptoru CD28), aby poskytly prekurzorové Tc buňce i druhý signál nutný pro její indukci. Ukazuje se, že k tomu, aby dendritická buňka byla schopna stimulovat dělení a diferenciaci antigenně specifických klonů Tc buněk, musí být nejprve sama stimulována kontaktem s Th buňkami. Při této přeměně dendritických buněk na dobré stimulatory Tc buněk hraje zásadní úlohu **pár adhezivních a signalizačních molekul CD40-L na povrchu aktivované Th buňky a CD40 na povrchu dendritické buňky**. Signály, které dostane dendritická buňka přes receptor CD40 ji stimulují k expresi kostimulačních povrchových molekul (CD80, CD86) a k sekreci cytokinů (IL-1, IL-12, IL-15) účastnících se potom stimulace Tc buněk. Tato vzájemná stimulace Th a dendritických buněk je velmi důležitá při přeměně klidových APC v aktivované APC, které jsou teprve plně funkční při stimulaci dělení a diferenciaci Th i Tc buněk. Efektorové Tc jsou poté roznášeny krevním oběhem do tkání, kde mohou začít eliminaci různých typů infikovaných buněk působením perforinů, granzymů, Fas-L a dalších mechanismů (Hořejší a Bartůňková, 2002). Detailní model interakce a vzájemné aktivace T lymfocytů a dendritických buněk je znázorněn na obr. 2.1.



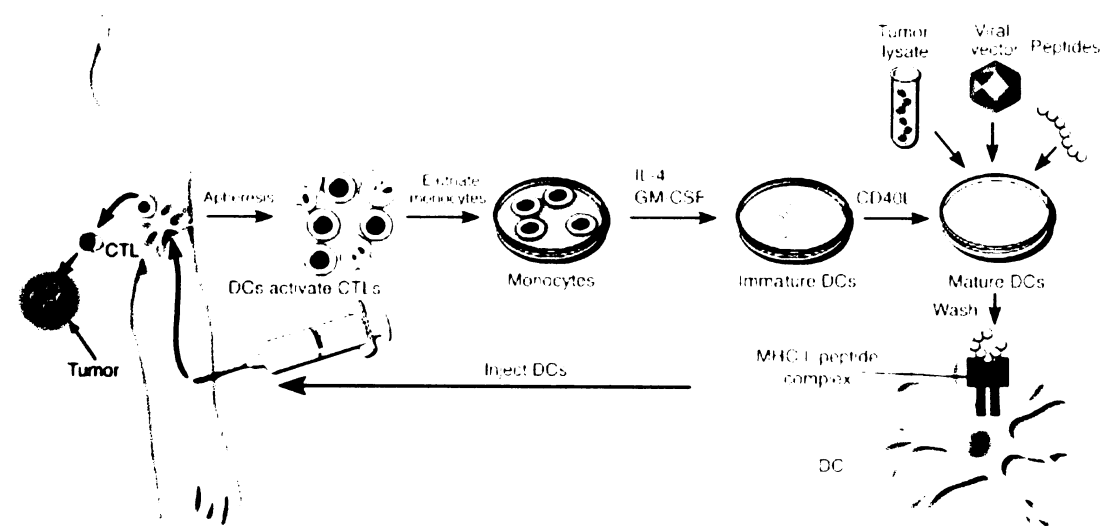
Obr. 2.1. Nové strategie ve vývoji vakcín založené na buněčné imunitě. CD4⁺ Th buňky dokážou maturovat a aktivovat antigen prezentující buňky přes rozpoznání specifického epitopu vystaveného na molekulách MHC gp II pomocí svého receptoru TCR a interakcí mezi CD40 a CD40 ligand (CD40L). Interakce CD40-CD40L způsobí jak zvýšení exprese kostimulačních molekul CD80 a CD86, tak zvýšení sekrece cytokinu IL-12 a IL-15. Tyto kostimulační molekuly reagují s molekulami CD28 po povrchu CD8⁺ cytotoxických T buněk, aby jim udělily druhý aktivační signál, první signál je zprostředkován přes receptor TCR rozeznávající antigenní peptid prezentovaný na komplexu MHC gp I. Cytokin IL-12 výrazně přispívá k aktivaci CTL a ovlivňuje Th buňky ve směru produkce Th1 cytokinu, např. INF- γ . Cytokin IL-15 přispívá k indukci a dlouhodobému udržení paměťových CTL. Regulační T buňky, jako třeba NK T buňky a CD25⁺CD4⁺ T buňky mohou utlumovat nebo zcela inhibovat funkce CTL z důvodu prevence autoimunitních reakcí. Tím zároveň snižují úroveň imunitní odpovědi vůči vakcínám. Různé strategie mohou být použity pro zvýšení efektivity imunitní odpovědi založené na T buňkách. Jednou z nich je modifikace epitopu za účelem zvýšení afinity k MHC gp I nebo MHC gp II molekulám, což zvýší imunogenicitu peptidu. Modulace pomocí aplikace různých cytokinů, jako např. IL-15 pro vytvoření více paměťových CTL, IL-12 pro řízení populace Th buněk do typu Th1 imunitní odpovědi, GM-CSF pro vznik většího množství dendritických buněk nebo kostimulační ligandy jako CD40L pro aktivaci a indukci maturace dendritických buněk. Kromě toho, např. oligonukleotidy obsahující nemetylované CpG motivy mohou aktivovat dendritické buňky interakcí přes receptory TLR-9. Vyšší úroveň exprese kostimulačních molekul může selektivně zvýšit aviditu CTL, jež jsou klíčové pro likvidaci virových infekcí. Taktéž strategie založená na blokování faktorů uvolňovaných regulačními T buňkami, jakými jsou např. IL-13 a TGF- β , může mít synergistický vliv na vyjádření plného potenciálu CTL. Podobně, blokování inhibičních receptorů, např. CTLA-4, na povrchu T buněk může zefektivnit imunitní odpovědi založené na T buňkách. (převzato z Berzofsky et al., 2004b)

2.1.2 Princip a perspektivy vakcín založených na dendritických buňkách

V současné době jsou v klinických pokusech zkoušeny vakcíny z dendritických buněk, které byly aktivovány různými antigeny. Cílem použití takových vakcín je obejít nedostatečnost počtu a funkce dendritických buněk pacienta a poruchy mechanismu zpracování antigenů.

vání antigenu v dendritických buňkách. Celá strategie je principiálně založena na explantaci prekurzorů dendritických buněk, které se *in vitro* cíleně diferencují a namnoží kultivací v médiu obohaceném o potřebné diferenciační faktory, GM-CSF a IL-4. Takto připravené dendritické buňky se přímo inkubují s připravenými syntetickými peptidy, virovým vektorem či nádorovými lysáty viz obr. 2.2. Případně se dendritické buňky mohou transfekovat molekulami nukleových kyselin, které kódují příslušné antigenní peptidy (Berzofsky et al., 2004a).

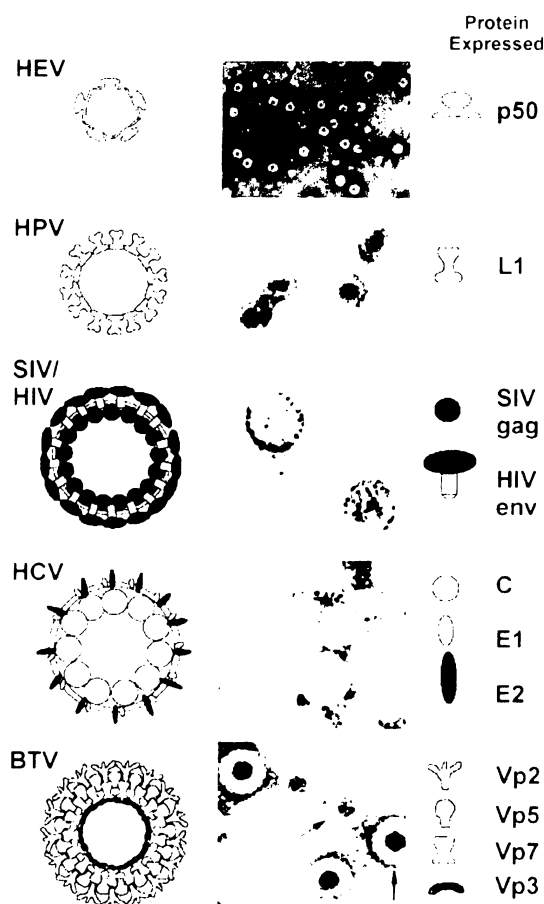
Je nutné podotknout, že příprava vakcín na bázi dendritických buněk je velice komplikovaná. Při aktivaci a maturaci dendritických buněk vstupuje do hry celá řada faktorů, z nichž mnohé ještě nebyly zcela probádány. Tyto faktory rozhodují o úrovni maturace a typu imunitní odpovědi, případně i imunitní toleranci (Kalinski et al., 1999). V současné době se ověřují alternativní přístupy, které by umožnily efektivněji stimulovat funkce dendritických buněk.



Obr. 2.2. Znárodnění procesu přípravy protinádorové vakcíny založené na dendritických buňkách odvozených z monocyfů periferní krve. Isolované monocyty periferní krve jsou kultivovány s cytokiny GM-SCF a IL-4, tak aby se z nich vyvinuly dendritické buňky. Takto připravené dendritické buňky jsou poté maturovány pomocí CD40L nebo i jiných typů molekul, za současného vpravení antigenního peptidu nebo nádorového lysátu, případně virového expresního vektoru. Maturované dendritické buňky, které předkládají příslušný antigen na svých MHC gp I molekulách jsou vpraveny do těla pacienta jako autologní vakcína pro navození protinádorové imunitní odpovědi založené na T buňkách. (převzato z Berzofsky et al., 2004a)

2.2 Umělé virové částice: struktura, vlastnosti a (nano)biotechnologické aplikace

V posledních letech je věnováno velké úsilí přípravě rekombinantních nosičů pro dopravu nukleových kyselin, polypeptidů a nízkomolekulárních sloučenin na bázi umělých virových částic neboli pseudokapsid, které jsou podobné virionům příslušného viru (**angl. virus-like particles, VLP¹**). Příčinnou tohoto fenoménu je schopnost kapsidových proteinů uspořádat se do struktury VLP, když jsou produkovány v různých heterologních systémech. Jelikož tyto struktury představují natolik věrné kopie intaktních virionů, zpravidla vstupují do cílových buněk stejným mechanismem jako přirozený virus. Důležité je, že takto připravené umělé virové částice neobsahují nukleovou kyselinu viru, tudíž jejich aplikace nemůže způsobit produktivní infekci. Tvorba umělých virových částic byla dříve popsána u myšího polyomaviru (Montross et al., 1991), lidských



papillomavirů (Hagensee et al., 1993) a parvovirů (Sedlik et al., 1997). V poslední době byly připraveny umělé částice obalených virů, jejichž genomem je RNA, např. u retrovirů SIV a HIV (Yao et al., 2000). Rovněž se již dříve podařilo připravit umělé částice odvozené od některých zástupců čeledi *Reoviridae*, jejichž pseudokapsidy jsou formovány ze čtyř nezávislých strukturálních proteinů (French, 1990).

Obr. 2.3. Přehled struktur umělých virových částic pro různé skupiny viru. Na obrázku jsou zachyceny morfologie pseudokapsid, jejichž elektronmikroskopické snímky a spektrum strukturálních proteinů, které je vytváří. Zkratky: BTV, bluetongue virus, HCV, hepatitis C virus, HEV, hepatitis E virus, HPV, human papillomavirus, SIV/HIV, hybridní částice odvozené od simian immunodeficiency virus *gag* a human immunodeficiency virus *env*. (převzato a upraveno z Noad a Roy, 2003).

¹ V této práci jsou pro označení anglického ekvivalentu "virus-like particle" používány tyto termíny: umělá virová částice, pseudokapsida či virová nanočástice.

2.2.1 Rekombinantní virové částice malých nádorových DNA virů

Virové genomy jsou v přírodě chráněny a zabaleny do proteinových kapsid, jejichž strukturální proteiny mají obvykle bazické domény orientované právě do interiéru kapsid. Tyto domény zcela neutralizují záporný náboj cukr-fosfátové kostry nukleových kyselin prostřednictvím iontových interakcí. Podobně i malé molekuly s negativním nábojem mohou být enkapsidovány do virových částic. Jedny z nejvíce prostudovaných modelů jsou virové částice odvozené od **polyomavirů**.

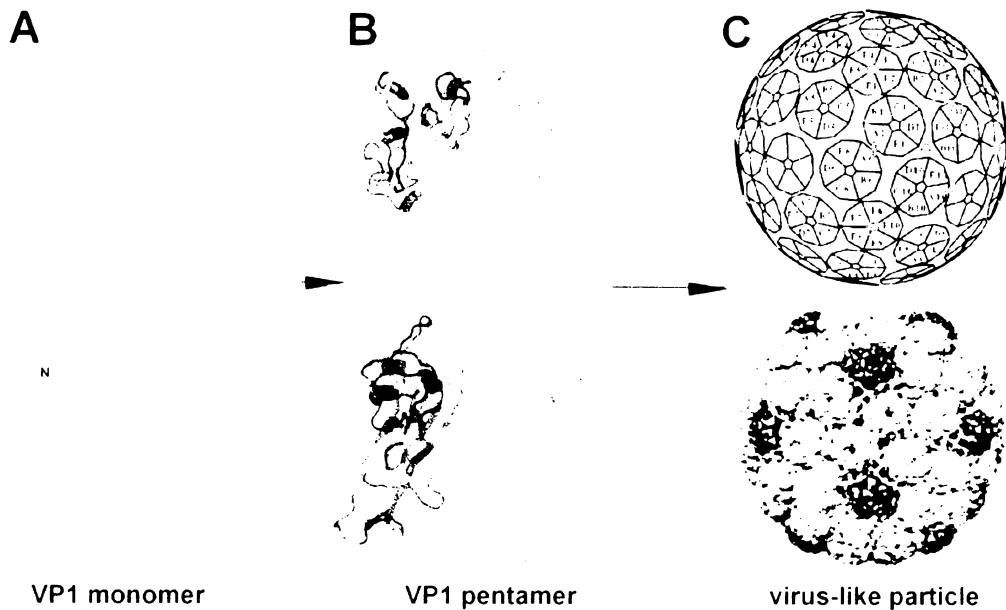
2.2.1.1 Struktura a architektura polyomavirových nanočástic

Polyomaviry jsou malé neobalené DNA viry, které mají tumorogenní potenciál. Mezi nejvíce prostudované polyomaviry z (nano)biotechnologického hlediska patří **myší polyomavirus (angl. mouse polyomavirus, MPyV), křeččí polyomavirus (angl. hamster polyomavirus, HaPyV), SV40 virus, BK virus a JC virus**. Všechny dosud popsané polyomaviry vykazují shodnou morfologii virových částic. Roentgenová krystalografie ukázala, že kapsidy myšího polyomaviru a SV40 viru mají **ikosahedrální symetrii (T=7), průměr kapsid je ~45 nm** (Liddington et al., 1991; Griffith et al., 1992). Kapsidy se skládají ze tří strukturálních proteinů – hlavního strukturálního proteinu VP1 a dvou minoritních proteinů VP2 a VP3. Protein VP1 utváří vysoce stabilní homopentamer, s jehož centrální dutinou asociuje vždy jeden minoritní protein VP2 nebo VP3 (Griffith et al., 1992). Každá kapsida se potom skládá ze **72 kapsomer** (VP1 pentamerů), z nichž 60 je hexavalentních a 12 pentavalentních, jež tvoří vrcholy ikosahedru (Liddington et al., 1991). Proces skládání virových částic polyomavirů je ukázán na obr. 2.4. Uvnitř kapsid se nachází nucleocore tvořené genomovou DNA v komplexu s buněčnými histony H2A, H2B, H3 a H4, avšak není přítomen H1 histon. Genom polyomavirů je tvořen kruhovou kovalentně uzavřenou dsDNA o velikosti ~5,3 kbp.

Hlavní strukturální proteiny VP1 všech polyomavirů mají schopnost se uspořádat do **struktur podobných virionům (VLP struktur, umělých virových částic či pseudokapsid)**, když jsou produkovány v eukaryotických expresních systémech (Montross et al., 1991). Minoritní strukturální proteiny nejsou nutné pro formování VLP struktur, avšak když jsou minoritní proteiny simultánně produkovány s VP1 proteinem jsou rovněž zabudovávány do virových částic. Rovněž ani posttranslační modifikace VP1 proteinu nejsou nutné pro utváření VLP částic. V případě exprese VP1 proteinu v bakteriálních expresních systémech dochází pouze k formování VP1 pentamerů (kapsomer),

keré je však možné *in vitro* složit do VLP struktur v roztocích bohatých na Ca^{2+} ionty (Salunke et al., 1986).

Model assembly of virus-like particle

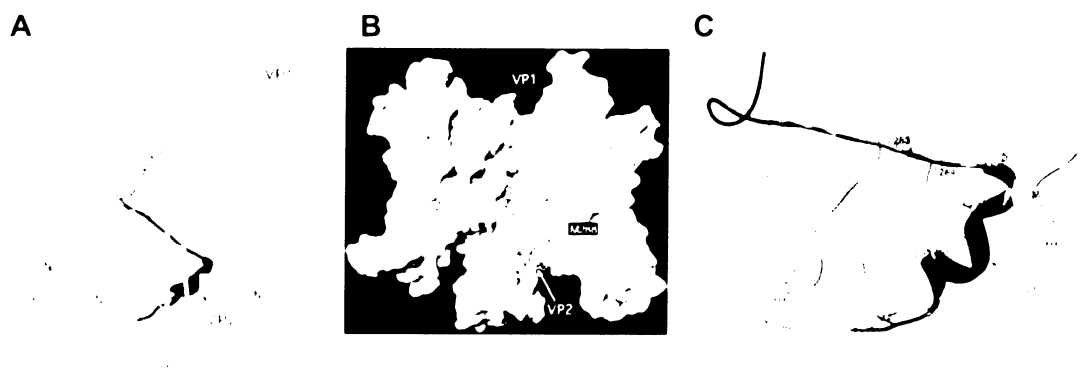


Obr. 2.4. Struktura a architektura polyomavirových nanočástic. (A) 3D model hlavního strukturálního proteinu VP1, (B) který utváří vysoce stabilní pentamer. (C) Každá pseudokapsida je složena ze 72 pentameru proteinu VP1, z nichž 60 je hexavalentních a 12 pentavalentních. (převzato a upraveno z Pattenden et al., 2005)

Na hlavním strukturálním **proteinu VP1** lze najít tři oblasti: **N-koncová, centrální a C-koncová**. Prvních 12 aminokyselin od N-konce obsahuje jaderný lokalizační signál (angl. nuclear localization signal, NLP) a DNA vazebnou doménu, která interaguje s DNA nespecificky (Chang et al., 1993). Posttranslační acetylace některých lysinových zbytků na N-konci VP1 pravděpodobně reguluje funkce jejich domén (Bolen et al., 1981). Centrální oblast je tvořena několika α -helixy a β -listy, které jsou propojeny několika rozvolněnými smyčkami – **BC, DE, HI, EF a FG**. Smyčky BC, DE a HI jsou exponované na povrchu kapsidy a hrají důležitou roli při interakci s receptorem na povrchu hostitelské buňky. C-koncová doména je velice flexibilní a účastní se vazby mezi jednotlivými kapsomerami v rámci kapsidy (Garcea et al., 1987).

Minoritní proteiny VP2 a VP3 jsou součástí virové kapsidy, nicméně jejich biologické funkce jsou rozplétány až v současné době. Nukleotidové sekvence obou proteinů se překrývají a jsou čteny ve stejném čtecím rámci, ale protein VP3 je od N-konce zkrácenou ($\Delta 118$ Amk u SV40 a $\Delta 115$ u MPyV) verzí proteinu VP2. N-koncová doména proteinu VP2 je posttranslačně modifikována myristylací na prvním glycinu. Za in-

terakci VP2/VP3 s dutinou VP1 pentameru je zodpovědná jejich vysoce konzervovaná C-koncová doména, kterou mají oba proteiny shodnou (Barouch a Harrison, 1994).



Obr. 2.5. Struktura proteinového komplexu VP1-VP2. (A) Příčný řez, zachycující C-koncovou doménu proteinu VP2 (červeně) a tři molekuly proteinu VP1 (zeleně střední VP1, modře jsou znázorněny postranní VP1 molekuly), které interagují s VP2 hydrofóbními interakcemi. Dvě zbývající VP1 molekuly, které leží nad rovinou papíru jsou zakryty. Tečkované značení ukazuje část proteinu VP2 (Val₂₆₉-Val₂₇₈), kde nebylo možné z elektronových hustot určit přesné konformace postranních řetězců. Zbylá N-koncová doména proteinu VP2 není zachycena v mapě elektronových hustot a je pouze schématicky znázorněna čárkovanou čarou. (B) Schématické znázornění centrální dutiny proteinového komplexu VP1-VP2. Protein VP2 dokonale kopíruje žlábky a výčnělky na povrchu VP1 pentameru. (C) Hydrofóbní interakce a vodíkové vazby mezi VP1 a VP2 proteiny. Struktura samotného VP1 je zachycena světlo tenkou čarou, což indikuje, že vazba VP2 indukuje malé konformační změny proteinu VP1. Helix VP2 proteinu se vkládá mezi smyčky G2 a G29 sousedního VP1 proteinu. Tyto smyčky jsou tlačeny směrem ven, což způsobuje rozšíření báze pentameru o ~2 Å ve srovnání se samotným VP1 pentamerem. Aminokyselinové zbytky proteinu VP2 jsou černě vyznačeny, zatímco zbytky VP1 oranžově. (převzato a upraveno z Chen et al., 1998).

Tato C-koncová doména rovněž obsahuje jaderný lokalizační signál (Chen et al., 1998). V poslední době bylo bioinformatickými analýzami předpovězeno 5 transmembránových domén u VP2, resp. 4 u VP3 (Daniels et al., 2006b), což souhlasí s produkčními pokusy těchto proteinů v bakteriích, kde tyto proteiny zprostředkovaly příjem jinak membránami neprostupného inhibitoru proteosyntézy hygromycinu (Daniels et al., 2006a). Tato pracovní skupina přímo prokázala, že minoritní proteiny VP2 a VP3 viru SV40 vytváří homo- a heterooligomery, které mohou fungovat jako póry v biologických membránách (**viroporiny**), což má ohromné důsledky v procesu dopravy virového genomu do jádra hostitelské buňky. Tyto funkce minoritních proteinů přicházejí pravděpodobně na řadu v lumen endoplazmatického retikula, kde jsou kapsidy rozvolněny mimo jiné pomocí proteinu Erp29 patřícího do **rodiny protein disulfid isomeras – PDI** (Magnuson et al., 2005). Autoři kromě toho ukázali, že unikátní N-koncová doména proteinu VP2 hraje důležitou roli při interakci s plasmatickou membránou a penetraci viru do buňky.

2.2.1.2 Vstup polyomavirů do savčí buňky a jejich pohyb k buněčnému jádru

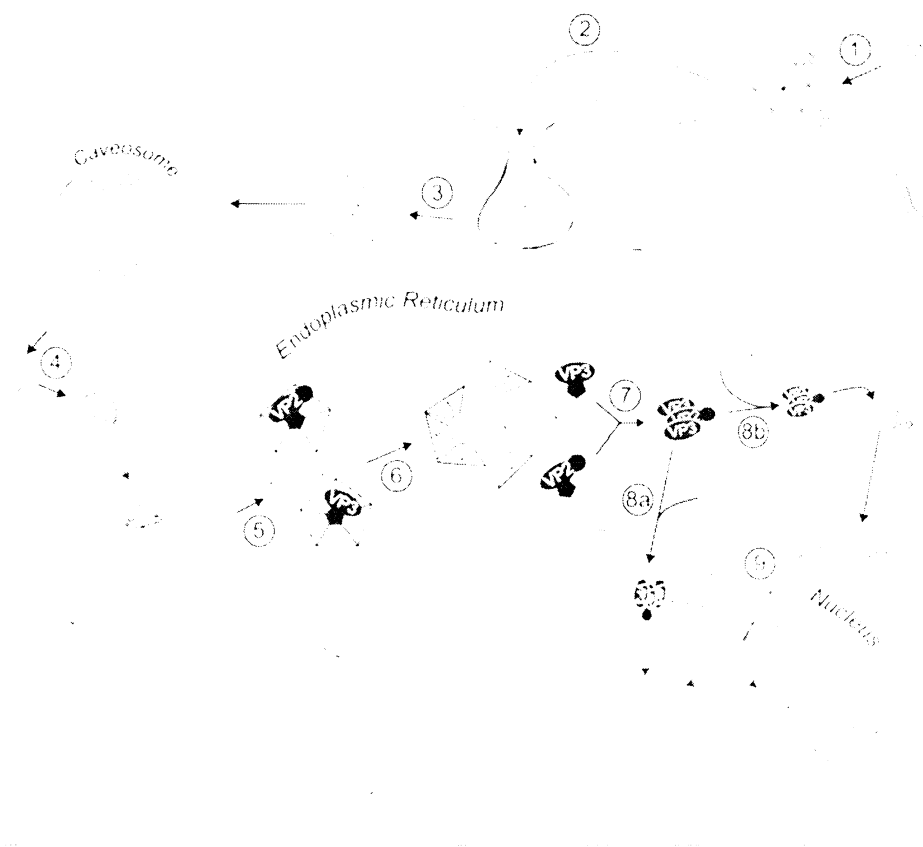
Strukturní kapsidové proteiny neobalených virů byly v průběhu miliónů let evoluce vyladěny pro účely úspěšné přepravy virového genomu přes cytoplasmatickou membránu a dále do jádra hostitelské buňky, kde je realizována virová transkripce a replikace. Polyomaviry vstupují do buněk **receptorem zprostředkovanou endocytosou v hladkých monopinocytických váčcích.**

Obecným znakem buněčných receptorů polyomavirů je přítomnost **kyseliny sialové** v jejich distálních sacharidových doménách. Pro myší polyomavirus byly identifikovány jako receptory **povrchové gangliosidy GD1a a GT1b**, zatímco pro virus SV40 je to gangliosid **GM1** (Tsai et al., 2003; Gilbert a Benjamin, 2004). U myšího polyomaviru byl rovněž popsán koreceptor $\alpha 4\beta 1$ integrin (Caruso et al., 2003). Virus SV40 po vazbě na GM1 receptor vstupuje do buněk v hladkých monopinocytických váčcích **pozitivních na kaveolin-1** (Anderson et al., 1998). Infekce SV40 je citlivá k odstranění cholesterolu z membránových domén a inhibována dominantně negativní mutantou kaveolinu-1 (Pelkmans et al., 2001; Roy et al., 1999). Internalizované viriony SV40 dále byly pozorovány ve větších periferních váčcích bohatých na kaveolin-1 zvaných **kaveosomy**, později po infekci pak v membránových váčcích pohybujících s blízkostí tubulinového cytoskeletu (Pelkmans et al., 2001). Doprava virových částic SV40 do hladkého endoplasmatického retikula je sensitivní vůči ošetření brefeldinem A a je zprostředkována **COPI dráhou** (Norkin et al., 2002; Richard et al., 2002).

Myší polyomavirus také vstupuje do buněk v hladkých monopinocytických váčcích, které mají stejnou morfologii jako v případě SV40. Inhibice infekce MPyV při ošetření methyl- β -cyklodextrinem naznačuje, že v procesu internalizace hrají důležitou roli membránové raftové domény (Richterová et al., 2001). Tito autoři také ukazují na přítomnost kaveolinu-1 v membránových váčcích, ve kterých jsou viriony internalizovány a dále tříděny pro dráhu **zpětného transportu (angl. retrograde transport)**. Existuje však jistý rozpor s pokusy blokace endocytických drah závislých na clathrinu a kaveolinu provedenými autory Gilbert a Benjamin (2000). Tyto pokusy naopak kontroverzně ukáží, že na infekci MPyV nemá vliv negativně dominantní mutantu Dynaminu I, který je esenciální pro generaci clathrinových a kaveolinových váčků. Zároveň tyto autoři pozorovali nízkou hladinu kolokalizace virionů s kaveolinem-1 v časných fázích vstupu viru do buňky. Novější studie prokázaly, že MPyV velice ochotně vstupuje do Jurkat buněk, které neprodukují kaveolin-1 (Liebl et al., 2006). Tito autoři zjistili, že

nadprodukce dominantně negativní mutanty kaveolinu-1 v epiteliálních buňkách nemá vliv na produktivní infekci myším polyomavirem. Na rozdíl od viru SV40, infekce myším polyomavirem je citlivá na kyselé pH v endo-lysosomálních kompartmentech. Obdobně jako viriony myšího polyomaviru byly internalizovány i rekombinantní VP1 částice (Richterová et al., 2001). Kolokalizace VP1 proteinu v pozdějších časech po infekci (3 h p.i.) s tubulinem naznačovala, že myší polyomavirus využívá shodnou retrográdní dráhu do endoplasmaické retikula a perinukleárního prostoru (Richterová et al., 2001). Nicméně pozdější analýzy prokázaly, že infekce myším polyomavirem je necitlivá k aplikaci brefeldinu A a kolokalizace VP1 proteinu s β -COP markerem COPI váčků byla pozorována velmi zřídka (Mannová a Forstová, 2003). Tyto výsledky naznačují, že myší polyomavirus využívá jiné dopravní dráhy do endoplasmatického retikula, resp. do buněčného jádra než SV40 virus. Po 3 hodinách po infekci je frakce polyomavirových částic vidět v endoplasmatickém retikulu, a subpopulace virionů v perinukleárním prostoru. Virové částice nacházející se v perinukleárním prostoru kolokalizují s markery recyklujících endosomů – **Rab11 GTPas a transferinu** (Mannová a Forstová, 2003, Liebl et al., 2006). Viriony, které se dostanou do endoplasmatického retikula jsou rozvolněny pravděpodobně některými **proteiny rodiny protein disulfid isomeras** jako např. **Erp29** (Magnuson et al., 2005). Nejnovější poznatky naznačují, že poté minoritní proteiny VP2 a VP3 asociují (tvorba homo- a heterooligimerů) a vytváří v membránách endoplasmatického retikula póry, kterými je přepraven genom viru přímo do buněčného jádra nebo do cytosolu (Daniels et al., 2006a). Velmi důležitou roli v tomto procesu rovněž hraje protein VP1, který reguluje rozpustnost minoritních proteinů a jejich interakce s membránami. Pomocí fluorescenční in situ hybridizace bylo zjištěno, že do buněčného jádra se dostává velmi málo virových genomů s přihlédnutím k počáteční multiplicitě infekce (Mannová a Forstová, 2003). Většina genomových komplexů se strukturními proteiny se dostává zpět do cytosolu, kde je enzymaticky (proteasom aj.) degradována.

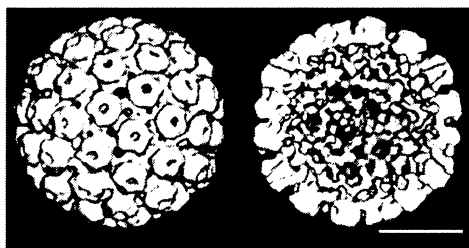
Na rozdíl od virů SV40, BK viru a myšího polyomaviru, virus JC využívá ke svému vstupu do buněk endocytosu závislou na clathrinových váčcích (Pho et al., 2000).



Obr. 2.6. Modelové schéma vstupu a penetrace membrány endoplasmatického retikula viru SV40. (1) Vazba viru SV40 na povrch hostitelské buňky je spoluřízena proteinem VP2. (2) Navázaný virus vstupuje do buňky receptorem (GPI gangliosid) zprostředkovanou endocytosou. (3) Virus je dále přepravován v kaveolinových váčcích do kaveosomu. (4) Virové částice pučí z kaveosomu a jsou dopravovány COPI retrográdní dráhou do endoplasmatického retikula. (5) Jakmile dorazí viriony do ER jsou za pomoci residentních molekulárních chaperonů (Erp29) rozvolňovány. (6) Postupující rozkládání uvolní i minoritní proteiny VP2 a VP3 z komplexu s VP1 pentamerem. (7) Proteiny VP2 a VP3 oligomerizují a vytvářejí v membráně ER multimerní komplexy, které umožňují přepravit virový genom přes tuto membránovou bariéru. (8a) VP2/VP3 komplexy přemostují přímo jadernou membránu a virové genomy tudíž mohou být rovnou dopravovány do buněčného jádra. (8b) Druhou alternativou je možnost transportu virového genomu přes membránu ER do cytosolu. (9) kde jeden ze strukturálních proteinů "VPX" využije svého jaderného lokalizačního signálu a DNA vazebné domény pro účely přepravy virového genomu do buněčného jádra. (převzato z Daniels et al., 2006a)

2.2.1.3 Polyomavirové nanočástice jako nosiče nukleových kyselin, polypeptidů a nízkomolekulárních sloučenin

Za účelem plnění polyomavirových pseudokapsid cizorodou DNA bylo již úspěšně využito několik strategií. První je založena na osmotickém šoku, kdy jsou virové částice vystaveny nízké iontové síle. To má za následek částečné rozvolnění jednotlivých kapsomer od sebe (viz. obr. 2.7.), tudíž cizorodá DNA může být vtažena do vnitřku pseudokapsid. Celý proces je rovněž poháněn elektrostatickými silami, které působí právě mezi bazickými doménami strukturálních proteinů a záporně nabitými nukleovými kyselinami (Barr et al., 1979).



Obr. 2.7. Kryoelektron-mikroskopická rekonstrukce virových nanočástic formovaných v hmyzích buňkách při expresi strukturálního VP1 proteinu myšího polyomaviru. Struktura odráží autenticky povrch virové částice, rozlišení 15 Å. V pravé části je zachycen průřez virovou částicí, kde je možno vidět indukované otvory mezi kapsomerami při hypotonické expanzi těchto částic, těmito prostory mohou vstupovat nukleové kyseliny či nízkomolekulární sloučeniny. Měřítko = 20 nm. (převzato a upraveno z Garcea a Gissmann, 2004)

Další strategie je založena na in vitro formování jednotlivých VP1 pentamerů do virových částic v přítomnosti nukleových kyselin (Braun et al., 1999). Tyto prvotní pokusy ukázaly, že je možné enkapsidovat do virových částic **myšího polyomaviru** dsDNA o velikosti 4 kbp, avšak velmi často docházelo k degradaci této DNA po vystavení působení nukleas. V poslední době byl popsán sbalovací (angl. packaging) in vitro systém u viru **SV40** (Kimchi-Sarfaty et al., 2003). Tito autoři připravili hrubý jaderný extrakt z hmyzích buněk produkujících všechny strukturální proteiny viru SV40 a nechali v in vitro podmínkách sbalovat pseudokapsidy. Při tomto provedení pozorovali, že je možné zabalit do virových částic SV40 plasmidovou DNA délky až 17 kbp. Účinnost transdukce těmito virovými částicemi byla vysoká v in vitro pokusech, prozatím však nebyla prokázána in vivo. Z těchto pokusů vyplynulo, že sbalovací reakce do virových částic je pravděpodobně do jisté míry řízena buněčnými chaperony přítomnými v jaderných extraktech. Forstová et al. (1995) ověřovali možnosti VP1 pseudokapsid myšího polyomaviru produkovaných v hmyzích buňkách jako nosiče heterologní DNA pro účely genové terapie. Ukázali, že tyto částice in vitro enkapsidují příslušné genové konstrukty, jejichž exprese poté byla sledována v cílových buňkách. Zajímavé bylo zjištění, že malá frekvence genových konstruktů se integrovala do genomu buněk. Následně Chromy et al. (2003) ukázali v in vitro pokusech přímé působení **proteinů teplotního šoku (angl. heat shock protein) HSC70** a jejich zprostředkování sbalování polyomavirových pseudokapsid v přítomnosti ATP. Kromě plnění polyomavirových pseudokapsid nukleovými kyselinami, je možné in vitro plnit tyto částice malými molekulami. Například, Goldmann et al. (2000) provedli in vitro disociaci pseudokapsid odvozených od **JC viru** v přítomnosti EGTA a dithiothreitolu (DTT). K suspenzi kapsomer následně přidali roztok propidium jodidu, jehož molekuly byly posléze enkapsidovány do virových částic při převedení do roztoku s obsahem Ca^{2+} iontů a bez redučních podmínek. Takto připravené barevné nanočástice úspěšně vstupovali do savčích buněk, kde byly monitorovány pomocí průtokové cytometrie.

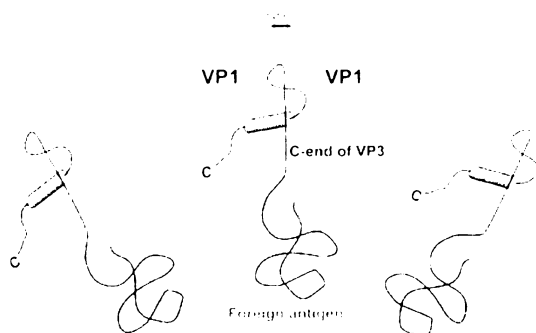
Velkou výhodou polyomavirových a papilomavirových nanočástic je skutečnost, že jejich 3D rekonstrukce strukturních proteinů VP1, resp. L1 byly detailně rozřešeny pomocí roentgenové difrakce. Znalost přesné konformace příslušných strukturních proteinů pseudokapsid umožňuje cíleně modifikovat stávající struktury pomocí technik rekombinantní DNA. Vložением krátkého peptidu do **HI smyčky hlavního strukturního proteinu VP1 myšího polyomaviru** byla zcela zrušena vazba na kyselinu sialovou, která je koncovou molekulou přirozených GD1a a GT1b gangliosidových receptorů tohoto viru (Gleiter et al., 1999). Stejná pracovní skupina později provedla do stejného místa inserce imunoglobulinové domény (6,8 kDa) proteinu Z ze *Staphylococcus aureus* (Gleiter a Lilie, 2001). Tyto modifikace neměly vliv jak na samouspořádávání do VLP struktur, tak i na vazbu DNA. Dále provedla tato pracovní skupina navázání protilátky proti buněčnému receptoru Erb2 ("Herceptin") na povrch těchto virových částic přes exponovanou doménu proteinu Z. Takto připravené chimerické částice byly schopné specificky přenést enkapsidovanou plasmidovou DNA kódující GFP protein do buněk, které produkovaly povrchový receptor Erb2 (Gleiter a Lilie, 2003). Nicméně, praktické zkušenosti z naší laboratoře ukazují, že vkládání cizích epitopů do HI smyčky VP1 proteinu má za následek dramatické snížení stability VLP struktur. Jelikož pracovní skupina S. Gleitera ve svých pracích nikdy nedoložila relevantní elektron-mikroskopické snímky připravených nanočástic, lze se domnívat, že i jejich VLP struktury nepatřily mezi silně stabilní částice. V poslední době byla rovněž prokázána možnost inserce cizích epitopů do jiných povrchových míst VP1 pseudokapsid. Neugebauer et al. (2006) vložili imunodominantní epitopy B buněk (12-14 Amk) do BC2 smyčky VP1 proteinu. Tato inserce neměla vliv na formování VLP struktur a výrazně zvýšila produkci specifických protilátek proti danému epitopu po imunizaci. Tito autoři dále ukazují, že produkce antigen-specifických protilátek byla výrazně větší při imunizaci prostřednictvím chimerických VLP struktur ve srovnání s chimerickými pentamerami VP1 proteinu.

Jinou potenciálně možnou modifikací VP1 proteinu je jeho N-koncová fúze s peptidy či proteiny, aniž by došlo ke ztrátě schopnosti vytvářet VLP struktury. Schmidt et al. (2001) vložili před **N-konec VP1 proteinu** sekvenci kódující WW doménu proteinu vázajícího myší formin (FBP-11). Tato WW doména FBP-11 velice silně váže proteiny bohaté na prolin (angl. prolin-rich ligands), které sdílejí konsenzuální sekvenci PPLP. Metodami molekulárního modelování vypočetali, že fúzní protein VP1-WW by neměl způsobit ztrátu schopnosti utvářet VLP ani správné sbalení WW domény. Teoretickými analýzami dospěli k závěru, že je možné enkapsidovat do jedné poly-

omavirové pseudokapsidy 360 ligandů (globulárních proteinů) o průměrné velikost 17 kDa. Připravené virové nanočástice skutečně enkapsidovaly fluorescečně značené či fúsované (GFP) PPLP domény. Modifikace N konce VP1 proteinu, tak ani následné plnění částic příslušnými ligandy skutečně nemělo vliv na formování VLP struktur, tak ani na jejich vstup do savčích buněk.

Další alternativou modifikace polyomavirových nanopartikulí za účelem přepravy polypeptidů je využití **minoritních VP2 a VP3 proteinů**. Jako první využili této možnosti Abbing et al. (2004), kteří konjugovali s minoritními proteiny nízkomolekulární sloučeniny a protein GFP. Této strategii bylo rovněž využito v naší laboratoři, kdy byl jako modelový antigen fúsován s **C-koncovou doménou minoritního proteinu VP3** protein EGFP (Bouřa et al., 2005). Tato C-koncová doména nově vytvořeného fúsního proteinu má funkci při interakci s VP1 pentamerem viz obr. 2.8. Při této strategii je teoreticky možné zabalit do polyomavirových částic maximálně 72 cizích polypeptidů. Vzniklý chimerický protein se výrazně velikostně neliší od minoritních proteinů. Přítomnost EGFP proteinu neměla zásadní vliv na formování VLP struktur, i když z elektron-mikroskopických snímků je patrné, že tyto chimerické pseudokapsidy nejsou tak geometricky pravidelné ve srovnání s intaktními VP1 VLP částicemi. Minoritních proteinů, konkrétně **proteinu VP2** jako kotvy pro držení cizorodého proteinu využili i Tegerstedt et al. (2005). Tito autoři popisují možnost fúse proteinu VP2 s onkogenním proteinem Her2 (až 683 Amk). Rovněž i při této strategii je možné teoreticky naložit do pseudokapsidy 72 molekul fúsch proteinů. Nicméně velikost tohoto chimerického proteinu výrazně přesahuje velikosti minoritních proteinů, tudíž skutečný počet přepravovaných molekul bude nižší. Zajímavá je skutečnost, že tito autoři nikdy neprezentovali elektron-mikroskopické snímky, které by dokládaly utváření, tvar a stabilitu VLP struk-

tur.



Obr. 2.8. Znázornění možnosti fúse antigenu s C-koncovou doménou minoritních proteinu VP2 nebo VP3. Vlastní znázornění fúse rekombinací proteinu (vyznačeno červeně) s C-koncovou doménou minoritního proteinu VP3 (značeno černě) včetně lokalizace fúsního proteinu v rámci polyomavirové

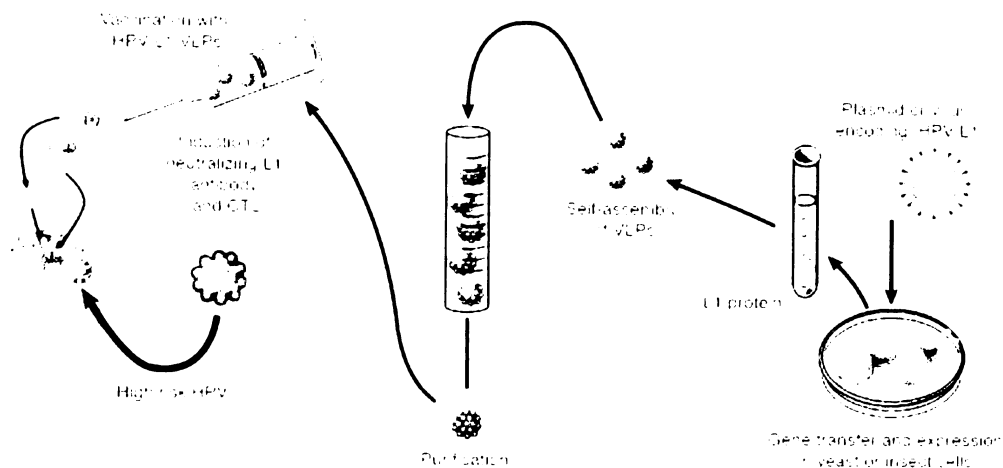
pseudokapsidy. VP1 pentamery jsou vyznačeny zeleně. Tato strategie přípravy chimerických VLP struktur myšího polyomaviru byla použita v práci Bouřa et al. (2005).

2.2.2 Imunogenní vlastnosti umělých virových částic a jejich modulace

Historicky jako první rekombinantní vakcína na bázi virových strukturních proteinů – povrchový antigen viru hepatitidy B, byla zavedena do klinické praxe již před 20 lety (McAleer et al., 1984). Silné imunogenní vlastnosti umělých virových částic jsou pravděpodobně způsobeny jejich interakcemi s profesionálními antigen prezentujícími buňkami, zejména s dendritickými buňkami. Příkladem mohou být VLP struktury odvozené od lidských papilomavirů, které navozují silnou maturaci dendritických buněk vyjádřenou zvýšenou povrchovou expresí komplexů MHC gp I i MHC gp II, dále pak kostimulačních molekul CD80, CD86 a CD40 a produkcí některých cytokinů (Lenz et al., 2001). Podobných rysů aktivace dendritických buněk bylo dosaženo i při aplikaci VLP struktur odvozených od jiných typů virů, např. VLP struktur Ebola viru (Warfield et al., 2003), HIV p55^{gag} VLP (Tsunetsugu-Yokota et al., 2003) aj. Yang et al. (2004) se zaměřili na detailní studium mechanismů aktivace dendritických buněk papilomavirovými VLP částicemi. Expresní analýzou s využitím robustní biočipové technologie zjistili, že v dendritických buňkách dochází ke zvýšení produkce transkriptů α/β interferonů, prozánětlivých cytokinů a chemokinů. Expres na úrovni mRNA byla rovněž potvrzena i imunodetekcí INF- α/β a cytokinu IL-12. Mnohé mikrobiální produkty, které navozují prozánětlivou odpověď jsou rozpoznávány Toll či NOD receptory jako tzv. **molekulární vzory asociované s patogeny (angl. pathogen associated molecular patterns, PAMP)**. Takto aktivované receptory posléze spouštějí signální kaskády přes adaptorový protein **MyD88**, až po aktivaci transkripčních faktorů a ko-aktivátorů **NF κ B**, **NF-AT** a **AP-1**. Pomocí reportérových expresních analýz byla skutečně těmito autory prokázána aktivace transkripce závislá na NF κ B, NF-AT a AP-1 v linii makrofágů RAW264.7 po aplikaci HPV VLP struktur. Následná RNAi analýza prokázala účast MyD88 v aktivaci těchto transkripčních faktorů, která byla dále potvrzena studií s dendritickými buňkami MyD88^{-/-}, které taktéž nevykazovaly žádné rysy aktivace po ošetření HPV VLP. Tyto výsledky jsou do značné míry revoluční, jelikož přímo poukazují na TLR rozpoznávání HPV VLPs struktur. Nicméně naskýtá se několik základních otázek: Jak to ten papilomavirus v přírodě dělá, že dokáže persistovat v epiteliálních tkáních bez jakýkoliv známek zánětu, když v *in vitro* pokusech je tak imunogenní? S jistým vysvětlením přišli Fausch et al. (2003), kteří prokázali rozdílný mechanismus vstupu a zpracování (mimo jiné i odlišné dráhy cross-presentace) HPV VLP struktur v epiteliálních formách dendritických buněk tzv. **Langerhansových buňkách** ve srovnání s myeloidními dendritic-

kými buňkami. Tyto výsledky jinými slovy říkají, že přirozená infekce lidským papilomavirem v epiteliálních tkáních je přehlížena imunitním systémem, zatímco systémová imunizace HPV VLP vyvolává velice silnou imunitní odpověď. S papilomavírovými pseudokapsidy proběhlo několik úspěšných klinických studií (Koutsky et al., 2002), které prokázaly jejich bezpečnost, ale především účinnost. Papilomavírové VLP vyvolávají v těle imunizovaných jedinců jak vysoký titr neutralizačních protilátek, tak i buňčně zprostředkovanou (cytotoxickou) imunitu (Evans et al., 2001). Od roku 2006 jsou již v klinické praxi dvě vakcíny založené na papilomavírových VLP částicích. Tyto vakcíny by měly chránit mladé ženy před infekcí vysokorizikovými typy lidských papilomavirů (HPV-16, HPV-18), které jsou etiologicky svázány s výskytem rakoviny děložního čípku viz obr. 2.9. Za účelem rozšíření účinku byly do sekvence hlavního strukturálního proteinu L1 lidského papilomaviru vloženy imunogenní epitopy onkoproteinu E7 (Greenstone et al., 1998). Výsledné chimérické virové částice, které měly na svém povrchu exponovány tyto cizí epitopy vyvolávaly velmi silnou protinádorovou imunitu vůči onkoproteinu E7.

Záměrně za účelem zvýšení imunogenních vlastností některých virových částic byly ověřovány různé způsoby modulace. Kang et al. (2003) chemicky konjugovali (biotin/streptavidin) rekombinantní SIV VLP s imunoadjuvatní molekulou B podjednotkou cholerového toxinu. Takto modifikované částice indukovaly výrazně vyšší produkci antigen-specifických IgG1 a IgA protilátek i cytotoxických odpovědí ve srovnání s aplikací samotných SIV částic. Dále byla ověřována možnost plnění některých VLP struktur oligonukleotidy s CpG nemetylovanými motivy, jež silně polarizují imunitní odpověď ve směru Th1 (Storni et al., 2004).



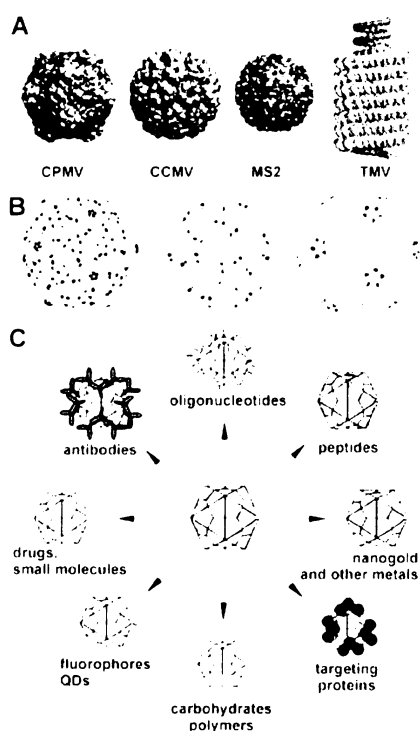
Obr. 2.9. Schéma vakcinace proti infekci lidským papillomavirem založené na přípravě heterologních pseudo-kapsid. Rekombinantní HPV-16 nebo HPV-18 kapsidový protein L1 produkovaný pomocí kvasinkového nebo baktulovirového expresního systému má schopnost se uspořádat do struktur podobných virionům (angl. virus-like particles, VLP). Takto připravené heterologní virové částice vyvolávají v těle silnou indukci tvorby neutralizačních protilátek, ale nejsou neinfekční, jelikož neobsahují DNA viru. Tato strategie vakcinace se zdá velice slibnou pro prevenci HPV infekce, jež je etiologicky svázána s výskytem rakoviny děložního krčku. (převzato z Berzofsky et al., 2004b)

2.2.3 Umělé virové částice jako stavební materiál pro nanotechnologie

Dokonalá symetrie virových kapsid a proteinových domén na jejich povrchu dovoluje provedení celé řady cílených modifikací za účelem přípravy vysoce organizovaných struktur s přesnou geometrií. Nejpokročilejší pokusy v této problematice byly dosaženy s nanočásticemi odvozenými od některých bakteriofágů či rostlinných virů, jejichž třírozměrné struktury byly dokonale vyřešeny. Příkladem může být vložení krátkého peptidu s afinitou pro sulfidy zinku a kadmia do strukturního proteinu gP8 filamentárního **fága M13**, kdy byly vytvořeny vláknité struktury silně vázající příslušné kovy. Po tepelné destrukci (400-500 °C) organických lešení zbyla pouze jednotlivá krystalická nanovlákná (Mao et al., (2004).

Virus mozaiky vigny (angl. cowpea mosaic virus, CPMV) patří do skupiny Comovirů je jedním z nejlépe prostudovaných rostlinných virů z hlediska nanotechnologických aplikací. Tento virus infikuje rostliny druhu *Vigna unguiculata*, z nichž může být izolován ve velkém množství dosahujícím až 0,8-1 mg/g listové hmoty (Porta et al., 2003). Genomem tohoto viru jsou dvě pozitivní +ssRNA molekuly. V současné době jsou k dispozici infekční cDNA klony pod kontrolou silného 35S promotoru, které lze dále geneticky modifikovat (Dessens a Lomonossoff, 1993). Strukturní proteinové pod-

jednotky S a L vytváří asymetrické jednotky, z nichž se buduje ikosahedrální kapsida (60 jednotek) o průměru 30 nm. Třírozměrná struktura virové kapsidy již byla vyřešena s rozlišením 2,8 Å. Pomocí cílené mutagenese se podařilo připravit modifikované pseudokapsidy, které nesly cysteinové zbytky přesně rozmístěné na svém povrchu. Následnými reakcemi těchto struktur s chemickými (fluorescenční molekuly, částice koloidního zlata) deriváty maleimidu vedly k přípravě přesně uspořádaných matic s těmito substituenty. Ohromnou výhodou nanočástic odvozených od CPMV je rovněž jejich vysoká stabilita ve velkých rozmezích teplot, pH a iontových sil. Takto připravené modifikované pseudokapsidy jsou velice slibnou platformou pro navěšování chemických ligandů v přesném rozmístění na ikosahedrálním templátu (Wang et al., 2002).



Obr. 2.10. (A) Příklady kandidátních virových částic pro nanotechnologické aplikace. Zkratky včetně průměru příslušných nanočástic: CPMV, cowpea mosaic virus (30 nm); CCMV, cowpea chlorotic mottle virus (27,8 nm); MS2, bakteriofág MS2 (26,8 nm) a TMV, tobacco mosaic virus (délka 300 nm, šířka 18 nm). **(B) Distribuce přirozeně se vyskytujících lysinových zbytků na povrchu pseudokapsid CPMV.** Na levém schématu, zbylé dva obrazy ukazují geneticky modifikované pseudokapsidy vystavující zavedené cysteinové zbytky na velké L podjednotce anebo na malé S podjednotce. Na lysinové zbytky lze navěšovat ligandy přes NHS-estery, zatímco na cysteinové zbytky reakcí chemických derivátů maleimidu. **(C) Možnosti nanotechnologických aplikací virových částic.** Virové částice zde slouží jako platformy pro navěšování tkáňově specifických ligandů či jiných molekul – oligonukleotidů, peptidů, protilátek, glykoproteinu, fluoroforu, či různých kovů. (převzato a upraveno ze Singh et al., 2006)

Kromě biokonjugací molekul s virovými částicemi přes thiolové můstky, lze využít i lysinových zbytků. Na povrchu jednotlivých stavebních jednotek pseudokapsid CPMV je vystaveno pět velice dobře přístupných lysinových zbytků.

Teoreticky lze tudíž navěsit až 300 molekul na jednu virovou částici, avšak praktické pokusy ukázaly, že tento počet je ve skutečnosti menší 60-120 molekul (Wang et al., 2002). Dalším nanotechnologicky intenzivně studovaným rostlinným virem je **virus chlorotické žilkovitosti viny (angl. cowpea chlorotic mottle virus)** patřící do čeledi *Bromoviridae*. Tento třísložkový virus má segmentovaný genom složený ze čtyř molekul +ssRNA, z nichž RNA1 a RNA2 jsou enkapsidovány individuálně každá do jedné kapsidy, zatímco RNA3 a RNA4 jsou společně plněny do jedné kapsidy. Všechny tři typy virových částic mají stejnou morfologii a všechny jsou nutné pro infekci. Kapsida (\varnothing 28 nm) je tvořena 180 identickými podjednotkami kapsidového proteinu (Speir et al., 1995). V závislosti na přítomnosti iontů

kovů prodělávají pseudokapsidy tohoto viru transici z uzavřené konformace do konformace se 60 póry o průměru přibližně 2 nm, rozmístěnými v přesné geometrii (Schneemann a Young, 2003).

Mezi další velice vhodné platformy využitelné v nanotechnologiích patří např. částice odvozené od **bakteriofága MS2** (Brown et al., 2002) či **viru mozaiky tabáku (angl. tobacco mosaic virus) vyznačujícího se perfektní helikální symetrií** (Schlick et al., 2005). Velké naděje jsou vkládány do nanočástic připravených ze strukturních proteinů bakteriofágů napadajících termofilní bakterie rodu *Sulfolobus*, které žijí v extrémních teplotních podmínkách. Umělé virové částice odvozené od těchto bakteriofágů vykazují vysokou stabilitu při velmi vysokých teplotách (Rice et al., 2004).

2.3 Bakteriální nosiče antigenů a imunomodulátory

Různé strategie byly vyvinuty za účelem zesílení a modulace imunitních odpovědí vůči heterologním antigenům. Mezi tyto můžeme zahrnout použití atenuovaných mutant bakterií (např. *Salmonella* spp., *Shigella* spp.) jako nosičů heterologních antigenů, přípravu různých typů liposomů, adsorpci antigenních peptidů na nanočástice, lipofilní imunostimulační komplexy a některé bakteriální produkty se známými imunomodulačními vlastnostmi. Tři typy bakteriálních produktů s nejsilnějším potenciálem vakcinačního adjuvans jsou **ADP-ribosylační enterotoxiny** – cholerový toxin (Elson, 1989) a teplotně labilní toxin (Clements et al., 1988), **syntetické oligodeoxynukleotidy obsahující nemetylované CpG dinukleotidové motivy** (Krieg et al., 1998) a **monophosphoryl lipid A** (Carozzi et al., 1989). Nicméně, imunomodulační vlastnosti má řada dalších molekul jako jsou různé cytokiny, chemokiny, apod.

2.3.1 Bakteriální enterotoxiny a jejich imunomodulační vlastnosti

Proteinové toxiny typu AB se skládají ze dvou strukturně nezávislých komponent, enzymatické podjednotky A a jedné nebo více kopií B podjednotky rozpoznávající receptor na buněčném povrchu. Jelikož substráty enzymatické podjednotky A se nacházejí v cytoplazmě musí být přinejmenším tato podjednotka úspěšně transportována přes bariéry buněčných membrán do nitra buňky. Tento proces zahrnuje endocytosu a membránový transport cílovou buňkou. Některé toxiny, jako například diphtheria toxin a anthrax toxin penetrují endosomální membránu krátce po endocytose a vstupují tak bezprostředně do cytoplasmy. Avšak, ostatní toxiny zahrnující třeba cholerový toxin

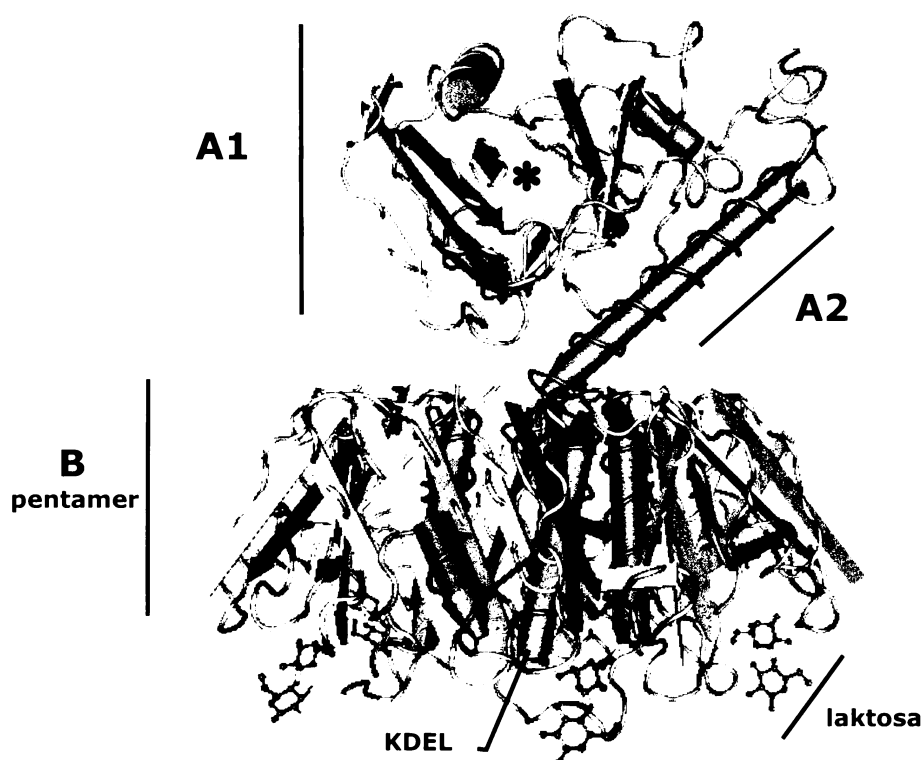
(Lencer a Tsai, 2003), ricin (Sandvig a van Deurs, 2002), *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A (Jackson et al., 1999) jsou před vstupem do cytoplazmy nejprve dopraveny do endoplasmatického retikula prostřednictvím mechanismu zpětného transportu (angl. retrograde transport).

2.3.1.1 Struktura a biologické funkce cholerového toxinu

Cholerový toxin (CT) je produkován patogenními bakteriemi *Vibrio cholerae* jako faktor virulence zodpovědný za masivní uvolnění tekutin do lumen střeva. Strukturně se jedná o heterohexamerní AB₅ komplex ($M_r = 85\,620$), **který se váže přes pentamer B podjednotek na GM1 gangliosidy**. Tyto glykolipidy se vyskytují na povrchu většiny buněk těla, včetně leukocytů. Strukturně nezávislé podjednotky A a B mají charakteristické funkce. Zatímco podjednotka A vykazuje enzymatickou aktivitu, podjednotky B jsou zodpovědné za specifickou interakci s receptory hostitelských buněk. Podjednotky B (~11 kDa) mají schopnost se samovolně uspořádat do struktury vysoce stabilního pentameru (~55 kDa), označovaného jako cholergenoid, vyznačující se dokonalou pětičetnou osou symetrie. Centrální pór (průměr 1,1 nm × délka 4 nm) je lemován pěti amfipatickými α -helixy, které jsou zodpovědné za stabilizaci pentameru. Pentamer obsahuje pět ekvivalentních GM1 vázajících míst se známými disociačními konstantami od 10^{-9} do 10^{-7} M (Fishman et al., 1979). Na základě analýz rentgenové difrakce bylo zjištěno, že negativně nabitý koncový pentasacharid GM1 gangliosidů [Gal- β 1-3-GalNAc- β 1-(NeuAc- α 2-3)-4-Gal- β 1-4-Glc-1-ceramid] směřující od buněčné membrány dosahuje vzdálenosti 2,1 nm od rozhraní lipid/voda (McDaniel a McIntosh, 1986). Z připravených ko-krystalů CTB pentamerů a molekul laktosy bylo určeno, že aminokyselina Trp₈₈ a její bezprostřední okolí je pravděpodobné místo vazby distálních molekul sacharidů GM1 gangliosidů (Sixma et al., 1992).

Podjednotka A je syntetizována na ribosomech jako polypeptid dlouhý 240 aminokyselin, který je však post-translačně štěpen bakteriální endoproteasou na dvě části – A1 a A2. Obě části jsou chemicky propojeny disulfidickým můstkem mezi aminokyselinami Cys₁₈₇ a Cys₁₉₉, rovněž nekovalentní interakce se významně podílejí na stabilizaci výsledné konformace. Pro úplnou aktivaci toxinu je nezbytná redukce právě této disulfidové vazby a disociace enzymatické části A1, čehož je dosaženo enzymem protein disulfid isomerasou v endoplasmatickém retikulu (Tsai et al., 2001). Uvolněný peptid A1 (~22 kDa) je poté retro-translokován do cytoplazmy, kde **váže NAD⁺ a katalyzuje**

ADP-ribosylaci² trimerního stimulačního G proteinu ($G_{s\alpha}$). Tento GTP vázající regulační protein je asociovaný s adenylát cyklasou, enzymem syntetizujícím signální molekulu cAMP (Kahn a Gilman, 1984). Přenesení ADP-ribosylu způsobí neschopnost $G_{s\alpha}$ podjednotky hydrolysovat navázaný GTP, v důsledku toho dochází k nepřetržité stimulaci adenylát cyklyasy (Scott, 2003). Výsledkem je zvýšená vnitrobuněčná hladina cAMP, který prostřednictvím cAMP dependentní protein kinasy aktivuje sodíkové pumpy v membráně buněk střevního epitelu. Fenotypovým projevem je pak masivní uvolnění vody a solí do lumen střeva a následná dehydratace hostitelského organismu (Spangler, 1992).



Obr. 2.11. Počítačový model krystalové struktury cholera toxinu. Báze pentameru B podjednotek společně s KDEL sekvencí na C-konci peptidu A2 vytváří rozhraní s receptory v membráně cílových buněk. Pro ilustraci je znázorněna vazba s molekulou laktosy, jež zde simuluje koncové struktury přirozených receptorů, tj. GM1 gangliosidů. *, aktivní místo katalytické podjednotky A1.

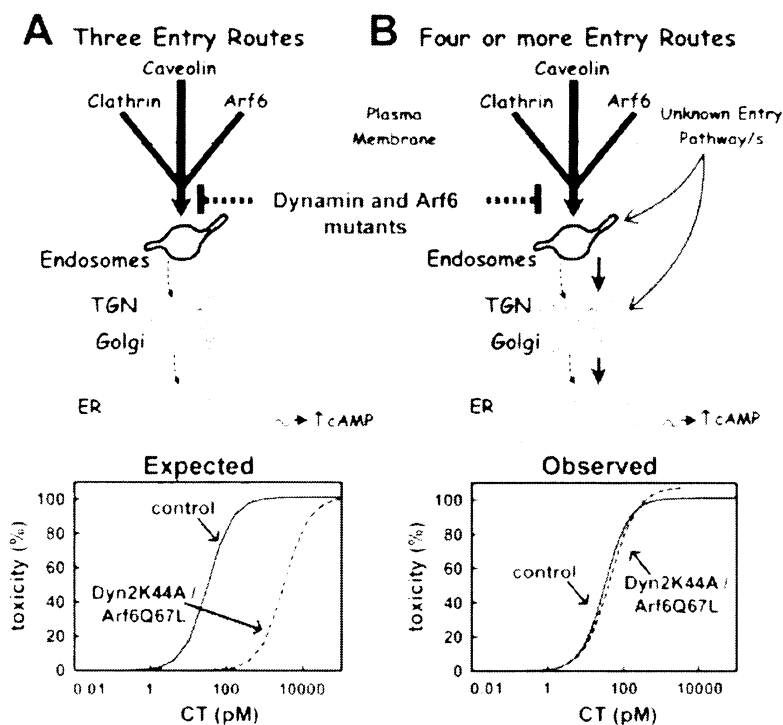
Nejdůležitější funkcí segmentu A2 (~5 kDa) je kotvení enzymatické A1 části k pentameru tvořenému B podjednotkami. Peptid A2 je svým C-koncem zanořen do centrálního póru pentameru, kde prostřednictvím hydrofobních interakcí a několika specifických vodíkových vazeb interaguje se všemi pěti B podjednotkami. Sekvence po-

² Obecné schéma ADP-ribosylační reakce: $[NAD^+ + \text{akceptor} \rightarrow \text{ADP-ribosa-akceptor} + \text{nikotinamid} + H^+]$, peptid A1 cholera toxinu má tedy enzymatické aktivity ADP-ribosyltransferasy a NAD-glykohydrolasy.

sledních čtyř aminokyselin na C-konci fragmentu A2 má charakter retenčního signálu endoplasmatického retikula – **KDEL** (Sixma et al., 1991). Přítomnost KDEL motivu na C-konci peptidu A2 zvyšuje toxicitu, pravděpodobně díky účinnější dopravě toxinu do endoplasmatického retikula (Lencer et al., 1995).

2.3.1.2 Endocytosa a směr vnitrobuněčného transportu

Po receptorem zprostředkované endocytose cholero­vý toxin a příbuzné toxiny nastupují dráhu zpětného transportu přes síť trans-Golgi aparátu až do endoplasmatického retikula. Existuje mnoho alternativ tohoto transportu, prozatím však jednotlivé molekulární detaily nejsou dostatečně objasněny. Jedna hypotéza předpokládá, že komplex toxin-GM1 gangliosid je primárně přenesen do endoplasmatického retikula za pomoci dráhy závislé na kaveolinu (Badizadegan et al., 2000; Fujinaga et al., 2003). Nicméně, odstranění cholesterolu z membrán a nepřítomnost endogenního kaveolinu (Wolf et al., 2002; Fujinaga et al., 2003), nebo inhibice exprese kaveolinu pomocí fenoménu RNA interference (Nichols, 2002) však úplně nezamezí vstupu a toxicitě cholero­vého toxinu. Výjimkou je práce autorů Orlandi a Fishman (1998), kteří pozorovali totální inhibici cholero­vého toxinu po aplikaci filipinu, molekul vyvazujících steroly. V úvahu přicházela i dráha závislá na clathrinu, avšak potlačení tohoto typu endocytosy pomocí chemických inhibitorů či cílené mutagenese nezpůsobilo výrazný pokles vstupu cholero­vého toxinu (Nichols et al., 2001; Torgersen et al., 2001). Třetí možností vstupu je nezcela ještě probádaná dráha regulovaná malými GTPasami Arf6. Tato dráha je funkčně svázána s tubulárním kompartmentem obsahujícím EHD1 (angl. tubular EHD1-containing compartment) a je využívána řadou proteinů, např. MHC gp I gp, receptor pro interleukin 2, karboxypeptidasa E, jež pendlují mezi plasmatickou membránou a endosomy (Radhakrishna a Donaldson, 1997; Brown et al., 2001; Arnaoutova et al., 2003).



Obr. 2.12. Modely internalizace a dopravy cholera toxinu do endoplasmatického retikula. (A) Schématické znázornění tří endocytických drah vstupu cholera toxinu závislých na clathrinu, kaveolinu a Arf6. Přes endosomy se toxin dostává do Golgiho aparátu, odkud pokračuje do endoplasmatického retikula. Následně je enzymatická podjednotka A1 retro-translokována do cytosolu, kde katalyzuje ADP-ribosylaci stimulačního G proteinu, jenž je asociován s adenylát cyklasou. Simultánní inhibice všech těchto tří drah koexpresí dominantního mutantního dynaminu (DynK44A) a Arf6 má za následek až stonásobné snížení internalizace toxinu. Proto se očekávalo, že i míra toxicity bude výrazně nižší. **(B)** Model zobrazující kromě drah závislých na clathrinu, kaveolinu a Arf6 ještě další alternativní cesty vstupu toxinu. Tento model ukazuje, jak blokáce vstupu toxinu pomocí koexprese mutantních forem DynK44A a Arf6 nemá vliv na doposud nepopsané dráhy vstupu a dopravy toxinu do endoplasmatického retikula, tudíž ani na toxicitu. (převzato z Massol et al., 2004)

Ovšem je také možné, že cholera toxin nemá vyhraněnou jednu cestu, ale využívá kombinace všech výše uvedených endocytických drah pro dopravu do Golgiho aparátu. Pro stanovení relativního příspěvku každé z těchto endocytických drah byly učiněny pokusy s fluorescenčně značeným cholera toxinem (Massol et al., 2004). Tito autoři jednotlivě, ale i simultánně odblokovali endocytické dráhy závislé na clathrinu, kaveolinu a Arf6 a pomocí technik konfokální mikroskopie sledovali akumulaci cholera toxinu v endosomech, Golgiho aparátu a endoplasmatickém retikulu. Zatímco odpráhnutí jedné dráhy mělo minimální efekt, simultánní blokáce všech tří cest se projevila významným snížením hromadění cholera toxinu v endosomech a Golgiho aparátu. Překvapivě však bylo zjištěno, že kombinovaná inhibice endocytických drah závislých na clathrinu, kaveolinu a Arf6 měla zanedbatelný vliv na toxicitu působenou cholera toxinem. Na základě těchto výsledků, autoři předpokládají existenci alternativní cesty vstupu cholera toxinu, jež je nezávislá na dynaminu a Arf6 a zároveň dostatečně efektivní viz obr. 2.5. Pro dopravu z Golgiho aparátu do endoplasmatického retikula využívá cholera toxin na rozdíl od Shiga toxinu zřejmě COPI včásků, které mají

ve svých membránách KDEL receptor Erd2 (Majoul et al., 1996). Shiga toxinu, který ve své struktuře nemá KDEL motiv, byl prokázán tento transport závislý na malých GTPásech rab6 (White et al., 1999).

Vstup cholerového toxinu do endoplasmatického retikula by mohl být také uskutečněn pomocí nedávno popsaného mechanismu, a sice přímé fúze plasmatické membrány s membránami endoplasmatického retikula. Tento proces byl původně popsán u fagocytujících buněk, kde je pozorovatelný v časných fázích fagocytosy (Gagnon et al., 2002). Zůstává však dořešit, zda je tento mechanismus fúze membrán fungující konstitutivně i v jiných typech buněk, případně zda je tento proces citlivý vůči brefeldinu A.

2.3.1.3 Translokace katalytické podjednotky do cytosolu

Po dopravení molekul toxinu do lumen endoplasmatického retikula jsou katalytické podjednotky ricinu (Wesche et al., 1999), *Pseudomonas aeruginosa* exotoxinu A (Koopmann et al., 2000) a také cholerového toxinu (Schmitz et al., 2000; Tsai et al., 2001) retro-translokovány do cytoplasmy pomocí Sec61 póru. Tyto studie navrhují, že tyto toxiny mohou využívat dráhu translokace špatně sbalených či jinak defektních proteinů směřujících z lumen endoplasmatického retikula do cytosolu za účelem proteosomální degradace³ (Lord a Roberts, 1998). V případě, že skutečně toxiny využívají **system ERAD** pro opuštění endoplasmatického retikula, jakým způsobem pak oklamou proces proteosomální degradace, aby zůstaly intaktní a schopné vykonat svoji biologickou funkci v cytosolu? Jedním možným vysvětlením by mohl být nízký výskyt potenciálních míst ubiquitylance v molekulách toxinů ve srovnání s buněčnými proteiny hostitele (Hazes a Read, 1997). Taktéž rychlé sbalení (angl. folding) do nativní konformace po vstupu do cytosolu činí toxiny rezistentní vůči proteosomální degradaci (Rodighiero et al., 2002). Ubiquitylance je modifikace většiny proteinů opouštějících endoplasmatické retikulum prostřednictvím systému ERAD, několika savčím proteinům již byla prokázána účast v tomto procesu. Jedním z nich je p97, označovaný též protein obsahující valosin (angl. valosin-containing protein, VCP), jedná se o savčí homolog Cdc48 ATPasy (Jarosch et al., 2002). V průběhu transportu proteinů ERAD systémem, p97 asociuje s ostatními proteiny včetně Ufd1, Npl4 a Derlin-1 (Ye et al., 2004). Důležitou otázkou zůstává, zda ubiquitylance je nezbytná pro interakci p97 s přenášenými substráty,

³ V anglosaské literatuře je tato dráha transportu špatně sbalených či poškozených proteinů z endoplasmatického retikula do cytosolu za účelem proteosomální degradace označována jako – **Endoplasmic Reticulum Associated Degradation (ERAD) system**.

jelikož je známa snaha toxinů vyhnout se degradaci v proteasomech. Pokusy s umělým zavedením ubiquitinylačných míst do funkční podjednotky A ricinu způsobily zvýšenou míru proteosomální degradace toxinu (Deeks et al., 2002), zatímco podjednotka A cholerového toxinu s odstraněnými místy ubiquitinylace se stále úspěšně dostává do cytosolu (Rodighiero et al., 2002). V současné době převládá názor, že ubiquitinylace přenesených substrátů není nutná pro interakci s p97 (Elkabetz et al., 2004). Teprve nedávné experimenty s buněčnou linií produkující defektní p97 prokázaly přímou účast p97 na retrotranslokaci katalytické podjednotky cholerového toxinu do cytoplasmy. Dokonce podjednotka A cholerového toxinu byla imunoprecipitována v komplexu s p97 (Ramzey et al., 2005)

2.3.1.4 Vazba na GM1 gangliosidy a její vliv na toxicitu

Hlavní vliv na směr vnitrobuněčného transportu však má prvotní vazba toxinu na GM1 gangliosid na apikální membráně střevních buněk. Vazba na GM1 gangliosid nejen pasivně kotví cholerový toxin k buněčné membráně, ale i zároveň asociuje toxin s **membránovými mikrodomény bohatými na glykosfigolipidy (angl. detergent-insoluble glycosphingolipid-rich membrane microdomain)**, označovanými též jako lipidové rafty (Wolf et al., 1998). Lipidové rafty jsou malé plovoucí ostrůvky v plasmatické membráně, jejichž složení se významně odlišuje od tekutějšího zbytku membrány. Obsahují především hodně glykosfingolipidů včetně GM1 gangliosidů, cholesterolu a glykoproteinů zakotvených přes glykolipidovou (GPI) strukturu. Podstatné je, že v těchto mikrodoménách jsou koncentrovány některé důležité složky buněčné signalizace, např. protein kinasy rodiny Src, heterotrimerní G proteiny, fosfolipid PIP₂ a transmembránové adaptorové proteiny. Narůstající poznatky o funkční architektuře lipidových raftů potvrzují jejich významnou roli v buněčném metabolismu, včetně některých typů ligandem indukované signální transdukce, třídění (angl. sorting) proteinů a lipidů, endocytose a transcytose. Elegantní ověření hypotézy o rozhodující roli vazby na GM1 gangliosidy provedli Wolf et al. (1998), kteří si vzali na pomoc příbuzný enterotoxin, a sice *E. coli* teplotně labilní toxin typu II (LTIIb). Zatímco podjednotky A obou toxinů mají téměř shodnou strukturu a podobnou enzymatickou aktivitu, podjednotky B se liší strukturou a vazebnou specifitou. Podjednotky B toxinu LTIIb rozeznávají na buněčném povrchu GD1a gangliosidy, nikoliv však GM1 gangliosidy jako cholerový toxin. V případě, kdy vytvořili chimérické molekuly toxinů s promíchanými A a B podjednotkami obou toxinů, mohli porovnávat toxicitu působenou toxiny divokého typu a

chimérickými komplexy toxinů. Pouze intaktní cholero­vý toxin a chimérické formy toxinu rozeznávající GM1 gangliosid byly schopné vyvolat sekreci iontů Cl^- z cílových buněk. Po aplikaci toxinu LTIIb a chimér toxinu vázajících receptor GD1a nebyla pozorována žádná sekrece iontů Cl^- z buněk. Jelikož vazba toxinu na GD1a gangliosid neasociuje toxin s membránovými mikrodomény, je možné se domnívat, že i následný směr pohybu toxinu buňkou je rozdílný v konsekvenci odlišné signální transdukce (Wolf et al., 1998). Na základě těchto pokusů je možné konstatovat, že přítomnost KDEL motivu není rozhodující pro toxicitu, nýbrž klíčová je vazba na receptor GM1 gangliosid. **Vytvoření komplexu toxin-GM1 pravděpodobně rozhoduje o pozdějším vnitrobuněčném transportu toxinu do Golgiho aparátu a endoplasmatického retikula** (Wolf et al., 2002).

2.3.1.5 Imunomodulační vlastnosti ADP-ribosylačních enterotoxinů

Vlastnosti adjuvans *E.coli* teplotně labilního toxinu poprvé popsal Clement et al. (1988), když zjistil, že po společné aplikaci ovalbuminu s tímto toxinem dochází k mnohonásobně vyšší produkci specifických protilátek oproti imunizaci pouze samotným ovalbuminem. Detailní mechanismus působení těchto toxinů jako adjuvans není doposud zcela objasněn, existuje však několik modelů tohoto procesu. Cholero­vému toxinu bylo prokázáno, že může zvýšit permeabilitu plasmatické membrány střevních epiteliálních buněk pro proteiny malých molekulových hmotností (Lycke et al., 1991), nikoliv však pro velké proteiny (Snider et al., 1994). Dále bylo zjištěno, že cholero­vý toxin znatelně zvyšuje antigenní prezentaci dendritických buněk, makrofágů, B buněk a přinejmenším in vitro i střevních epiteliálních buněk. Cholero­vý toxin maturuje myši i lidské dendritické buňky⁴, pozitivně ovlivňuje expresi HLA-DR (Gagliardi et al., 2000), kostimulačních molekul CD-80, CD-86 a CD83 (Lycke, 2005) a chemokinových receptorů CCR7 a CXCR4 (Gagliardi et al., 2003) zřejmě díky své ADP-ribosylační aktivitě. Avšak samotná netoxická B podjednotka cholero­vého toxinu je schopná také vyvolat maturaci dendritických buněk⁵ měřenou výrazně zvýšenou expresí MHC gp II, CD-86 a sekrecí IL-12 (Isomura et al., 2005). Intaktní cholero­vý toxin taktéž indukuje sekreci IL-1 β z dendritických buněk (Eriksson et al., 2003). Předpokládalo se, že cholero­vý toxin indukuje spíše Th2 typ imunitní odpovědi, charakteristický zastoupením CD^{4+} T buněk

⁴ V tomto pokusu byly používány lidské dendritické buňky odvozené od monocytů periferní krve (angl. dendritic cells derived from peripheral blood mononuclear cells).

⁵ Tito autoři používali dendritické buňky izolované ze sleziny myši.

produkcí IL-4, IL-5, IL-6 a IL-10. Avšak v případě LT toxinu byla popsána kombinovaná Th1 a Th2 imunitní odpověď. Nicméně, novější studie ukazují, že i cholero­vý toxin může vyvolávat smíšenou imunitní odpověď zprostředkovanou Th1 a Th2 lymfo­cyty (Eriksson et al., 2003).

2.3.1.6 Příprava netoxických forem pro účely vakcinace

Jelikož cholero­vý toxin a LT toxin jsou silnými enterotoxiny, případná orální aplikace pouhých 5 µg cholero­vého toxinu může vyvolat příznaky přirozené infekce (Levine et al., 1983). Z tohoto důvodu je **snaha oddělit toxicitu od vlastností vakcinačního adjuvans** těchto enterotoxinů. Pomocí řízené mutagenese bylo připraveno několik mutant s pozměněným aktivním místem toxinu. Dvě nejlépe charakterizované mutanty LT toxinu tohoto typu jsou substituce lysinu za serin v pozici 63 – **LT-S63K** a substituce argininu za alanin v pozici 72 – **LT-A72R**. Tyto dvě mutanty se liší v míře residuální katalytické aktivity a jsou dobrými adjuvans při testování na hlodavčích modelech (Barackman et al., 2001). V současné době jsou tyto dvě mutanty ve fázi klinických zkoušek jako adjuvans pro intranasální imunizaci vakcínou proti viru chřipky. Další úspěšnou mutantou LT toxinu je náhrada glycinu za arginin v poloze 192 – **LT-R192G**, tato substituce je příčinou necitlivosti toxinu vůči štěpení trypsinem, jinými slovy takto modifikovaný toxin má výrazně sníženou toxicitu, ale vlastnosti adjuvans jsou srovnatelné s původní molekulou toxinu (Dickinson a Clements, 1995). Tato forma toxinu byla zdárně použita jako slizniční adjuvans při společné orální aplikaci s heterologními papillomavirovými částicemi typu 16 a 18. Výsledná anti-HPV humorální imunitní odpověď sledovaná v periferní krvi a v poševním sekretu byla významně vyšší oproti imunizaci samotnými papillomavirovými částicemi (Gerber et al., 2001). Podobných výsledků bylo dosaženo s tímto modifikovaným toxinem LT-R192G i při pokusech s heterologními rotavirovými částicemi (Yuan et al., 2000).

Dalšími přístupy detoxifikace cholero­vého toxinu jsou kupříkladu prodloužení N-konce katalytické podjednotky A1 pomocí arteficiálního peptidu. Takto modifikovaný toxin vykazuje jednak sníženou enterotoxicitu, ale zároveň i ADP-ribosylační aktivitu zapříčiněnou **sterickým zablokováním aktivního místa A1 peptidu**. Nevýhodou těchto konstruktů však je skutečnost, že se snížením výše zmíněných faktorů zmizely i rysy vakcinačního adjuvans. Jiné výzkumné týmy se orientovaly na pouhé vypůjčení katalytického A1 peptidu, který poté fúzovaly s jinými proteiny rozeznávajícími pří-

slušné receptory na buněčném povrchu. Jedním takovým příkladem je fúze katalytické A1 podjednotky cholerového toxinu s proteinem A bakterie *Staphylococcus aureus*, označení výsledného konstruktu – **CTA1-DD**. Tato chiméra podobně jako ostatní deriváty toxinů fungovala velice dobře při nasální aplikaci, ale ne při orálním podání. Tato nevýhoda byla odstraněna následnou další fúzí s krátkým peptidem za účelem tvorby imunostimulačních komplexů (angl. immune stimulating complexes, ISCOMS). Orální vakcinace těmito **ISCOM-CTA1-DD** komplexy indukuje slizniční i systémovou imunitní odpověď s **Th1 a Th2 znaky** (Mowat et al., 2001).

2.3.1.7 Imunostimulační atributy intaktní B podjednotky cholerového toxinu

Vlastnosti efektivního adjuvans vykazují i netoxické B podjednotky obou enterotoxinů. Obrovské zvýšení imunomodulačních vlastností CTB a LTB se dosáhne konjugací těchto B podjednotek s příslušným antigenem ve srovnání s pouhou společnou aplikací (Bergquits et al., 1995). Tato konjugace může být buď chemická nebo genetická. Vysvětlením tohoto zesílení imunitní odpovědi po konjugaci s antigenem může být účinnější vstup antigenu do cílových buněk díky vazebné afinitě k příslušnému gangliosidovému receptoru a jeho lepší zpracování a prezentace dendritickými buňkami, makrofágy a naivními B buňkami. Ukázkou **chemické konjugace** může být spojení CTB s heterologně produkovánými částicemi SIV viru, kterou provedli Kang et al. (2003). Pro propojení těchto dvou struktur využili silné interakce biotin/streptavidin. Takto připravené komplexy vykazovaly po intranasální imunizaci silnější produkci SIV specifických protilátek v séru i na sliznicích, vyšší hladinu cytokinu INF- γ produkovaného splenocyty, intenzivnější cytotoxickou aktivitu T-lymfocytů ve srovnání s imunizací samotnými SIV částicemi nebo jejich aplikací s volnými CTB. Rovněž byla zjištěna vyšší hladina jak IgG1, tak i IgG2a v séru, což svědčí o kombinované Th1 i Th2 buněčně zprostředkované imunitní odpovědi. Chemická konjugace CTB s různými hereologními antigeny byla provedena i jinými výzkumnými týmy (Sun et al., 1999; Bergquist et al., 1997).

S rozvojem technik genového inženýrství bylo možno uskutečnit elegantnější způsob konjugace, a sice **genetickou fúzí**. Tento přístup použili ve své práci Mattos-Areas et al. (2004), když připravili genový konstrukt skládající se ze sekvencí CTB a povrchového proteinu PsaA bakterie *Streptococcus pneumoniae*. Překvapivé bylo, že při expresi tohoto CTB-PsaA konstruktů v *E. coli* byl získán rozpustný protein, na rozdíl od

exprese samotného CTB, který je produkován v nerozpustných inkluzích. Zajímavé taktéž bylo, že takto syntetizovaný chimérický protein vytvářel pentamery, obdobně jako intaktní CTB. Opět tento typ kovalentního spojení způsobil po intranasální imunizaci výrazně vyšší hladinu produkce anti-PsaA IgG v séru a IgA na sliznicích oproti kontrolním imunizacím samotným PsaA proteinem.

V poslední době se začíná ověřovat strategie imunizace založená na přímé aplikaci expresních vektorů, jež kódují příslušný antigen – tzv. **DNA vakcíny**. Tato strategie se jeví velice ekonomicky nenáročná, jelikož při tomto uspořádání odpadá technicky náročná produkce a purifikace proteinových antigenů. Přinejmenším v posledních kolech imunizace, kdy už je v těle obratlovce přítomna jistá hladina neutralizujících protilátek je tento přístup jistým zlepšením. I zde mají své místo bakteriální enterotoxiny se svými imunostimulačními vlastnostmi. Sanchez et al. (2004) připravili plasmidový vektor kódující B podjednotku cholerového toxinu a hodnotili jeho vlastnosti genetického adjuvans při **intradermální imunizaci** společně s DNA vakcínou nesoucí gen pro L1 kapsidový protein lidského papillomaviru typu 16. Podobně jako v předchozích pokusech s CTB, i zde byla zaznamenána výrazně vyšší hladina produkce anti-L1 protilátek v cervikálních sekretech. Kromě toho byla pozorována významně vyšší produkce IL-2 a INF- γ splenocyty a robustnější imunitní odpověď polarizovaná ve směru Th1. Zdá se tedy, že CTB má své imunomodulační uplatnění i při vývoji DNA vakcín.

2.3.2 Oligonukleotidy obsahující nemetylované CpG motivy

2.3.2.1 Mechanismus interakce s imunocyty

Syntetické oligonukleotidy obsahující nemetylované dinukleotidové motivy CpG (CpG ODN) jsou dalším velice slibným imunomodulačním faktorem. Tyto aktivity CpG ODN jsou způsobeny různými vlivy, které mají na přirozené, ale i adaptivní mechanismy imunitního systému. Zaprvé, CpG ODN indukují proliferaci B buněk a jejich sekreci imunoglobulinů. Zadruhé, CpG ODN mají vliv na výrazně vyšší expresi MHC gp II a kostimulačních molekul imunocytů, čehož důsledkem je lepší prezentace antigenů (Krieg, 2002). Rovněž jim byl prokázán přímý vliv na aktivaci monocytů, makrofágů a dendritických buněk a jejich sekreci INF- α/β , IL-12, GM-CSF chemokinů a TNF- α . Tyto cytokiny pak indukují T buňky a NK buňky k produkci dalších poplachových cytokinů, především INF- γ (Freytag a Clements, 2005). Polarizace imunitní odpovědi ve

směru Th1 působená právě cytokiny IL-12 a INF- γ je typická pro CpG ODN. Přesné mechanismy jakými působí CpG ODN na modulaci imunitních reakcí jsou odhalovány až v současné době. Jedna hypotéza předpokládá, že CpG ODN, a to buď jako volné molekuly nebo uvnitř bakterií vstupují do buněk imunocytů, například dendritických buněk, kde jsou směřovány na dráhu zpracování citlivou vůči chloroquinu (Freitag a Clements, 2005). **Bakteriální DNA obsahuje nemetylované CpG motivy na rozdíl od obratlovců**, kteří mají ve svém genomu mnohem nižší frekvenci těchto motivů, a pokud je mají tak jsou obvykle metylované. V průběhu evoluce obratlovci vyvinuly příslušné receptory, kterými dokážou rozeznat tyto nemetylované bakteriální DNA sekvence. V tomto případě se jedná o **receptory TLR-9**, které se vyskytují v membráně endosomů. Interakce mezi TLR-9 a CpG ODN aktivuje s Toll/IL-1 receptory spojenou signalizační kaskádu, jejímiž členy jsou jak MyD88 (angl. myeloid differentiation factor 88), IRAK (angl. IL-1 receptor-associated kinase), TRAF6 (angl. tumor necrosis factor receptor-associated kinase, tak i I κ B-kinasa a MAPK (angl. mitogen-activated protein kinase). Konečným důsledkem aktivace této kaskády je mimo jiné spuštění transkripce genů pro cytokiny INF- γ , IL-12 a TNF- α . Právě tyto cytokiny jsou zodpovědné za již zmíněnou **polarizaci imunitní odpovědi ve směru Th1, která je dominantní pro CpG ODN** a velice efektivní pro likvidaci vnitrobuněčných patogenů bakteriálního a virového původu (Freitag a Clements, 2005).

2.3.2.2 Aplikace CpG ODN při vývoji nových typů vakcín

Naproti výše uvedeným účinkům CpG ODN na složky přirozené a adaptivní imunity, velmi málo je známo o roli CpG DNA v indukci slizniční imunity. Určité pokusy byly učiněny na myším modelu s aplikací CpG ODN na poševní sliznici. Po jednorázovém podání imunostimulačních CpG ODN byla zaznamenána silná produkce nejen cytokinů INF- γ , IL-12 a IL-18, ale i velmi rychlá stimulace produkce **CC chemokinů RANTES, MIP-1 α a MIP-1 β** v pohlavních cestách samic myší (Harandi et al., 2003). Důležitost těchto zjištění je podtržena skutečností, že infekce CD 4^{+} T buněk virem HIV-1 je inhibována právě molekulami RANTES, MIP-1 α a MIP-1 β , jakožto přirozenými ligandy HIV koreceptoru CCR5 (Cocchi et al., 1995). Podobné spektrum chemokinů plus CXC chemokin IP-10 bylo lokálně produkováno v žaludku myší po vpravení imunostimulačních CpG ODN bez jakéhokoliv exogenního antigenu do zažívacího traktu. Tato aplikace výrazně redukovala již pokročilou infekci patogenní bakterií *Helicobacter pylori*

(Raghavan et al., 2003). Podobných pozitivních účinků v imunomodulaci imunitních odpovědí s použitím CpG DNA bylo dosaženo i v pracích Krieg a Davis (2001) a Malletto et al. (2002). Poslední studie ukázaly, že imunostimulační efekt CpG DNA je výrazně zesílen, když jsou tyto molekuly kovalentně konjugovány s B podjednotkami cholerového toxinu (Harandi a Holmgren, 2004). Takto připravené konjugované komplexy vykazovaly při testování na myších splenocytech indukci mnohem silnější produkce příslušných chemokinů než, která byla dosažena při aplikaci nekonjugovaných CpG ODN.

Syntetické CpG ODN mají také potenciál v **indukci protinádorové imunity**. Speiser et al. (2005) testovali vliv CpG⁶ DNA na zvýšení imunogenicity melanomového antigenu – melan A. V průběhu jednoho měsíce byly pacientům čtyřikrát aplikovány společně tyto CpG ODN a melan A. Všichni tito pacienti poté vyvinuli rychle velice silnou antigen-specifickou odpověď zprostředkovanou T buňkami. Frekvence melan A-specifických T buněk přesáhla 3 % všech kolujících CD8⁺ T buněk. Populace T buněk byla hlavně tvořena efektorovými paměťovými buňkami, jež částečně sekretovaly INF- γ a syntetizovaly *ex vivo* granzym B a perforin. Podstatná je skutečnost, že tyto studie potvrdily roli CpG DNA jako velice silného adjuvans polarizujícího imunitní odpověď ve směru Th1, dokonce silnějšího adjuvans než kompletní Freundovo adjuvans, avšak mnohem biologicky bezpečnějšího.

2.3.3 Monofosforyl lipid A je dalším efektivním imunomodulátorem

Dalším produktem odvozeným z bakteriálních struktur se zajímavým imunomodulačním potenciálem je monofosforyl lipid A (MPL). MPL je izolován z lipopolysacharidu bakterie *Salmonella minnesota* R595, vykazuje mnoho imunostimulačních vlastností jako původní lipopolysacharid, ale je netoxický (Freytag a Clements, 2005). Jeho modulační schopnosti jsou primárně dány schopností aktivovat antigen prezentující buňky a indukovat produkci prozánětlivých cytokinů. Tyto události jsou nezbytné pro indukci antigen-specifické buněčné imunity. V poslední době byly učiněny studie, které prokázaly sílu MPL jako adjuvans při orální a intranasální imunizaci (Childers et al., 2000; Yang et al., 2002). Podobně jako CpG ODN, imunomodulační role MLP je zprostředkována **přes aktivaci receptorů skupiny TLR**. Nedávná studia Martin et al. (2003)

⁶ V těchto experimentech byly používány CpG-7909, jejichž nukleotidová sekvence je: TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT. Je nutné podotknout, že je možné použít i jiné typy CpG ODN, např. CpG-1826: TCCATGACGTCCTGACGTT (Alignani et al., 2005).

potvrdila, že produkce TNF- α , IL-10 a IL-12 lidskými monocyty po interakci s monofosforem lipidem A je zprostředkována přes aktivaci TLR-2 a TLR-4. Na základě monitorování signální kaskády NF κ B bylo prokázáno, že MPL využívá TLR-2, ale zejména TLR-4 pro aktivaci této dráhy signální transdukce. Kromě toho, stimulace lidských monocytů pomocí MPL vedla ke zvýšení exprese kostimulačních molekul CD80 a CD86. Tento efekt byl velice dobře inhibován při aplikaci monoklonálních protilátek proti TLR-2 a TLR-4. Taktéž byla pozorována fosforylace ERK (angl. extracellular signal-regulated kinase) a MAPK (angl. mitogen activated protein kinase) v důsledku aktivace receptorů TLR-2 a TLR-4 způsobená interakcí s molekulami MPL (Freitag a Clements, 2005).

2.4 Některé další biomolekuly a přístupy v modulaci imunitních odpovědí

Kromě výše uvedených nejvíce prostudovaných biomolekul s imunomodulačním potenciálem se testuje celá řada jiných molekul, hledají se nové strategie a přístupy v přípravě vakcín a jejich aplikací. Pro lepší prezentaci antigenu na MHC gp II je možné využít specifického vnitrobuněčného zacílení do endosomálního a lysosomálního kompartmentu. K tomuto účelu Su et al. (2002) připravili genový konstrukt, jež nesl gen pro **antigen fúzovaný se sekvencí LAMP-1 (angl. lysosome-associated membrane protein)**. In vitro syntetizovali mRNA molekuly tohoto chimérického genu, kterými poté transfekovali dendritické buňky. Díky signální sekvenci LAMP-1 chimérický protein byl cílen do endosomů a lysosomů, což se projevilo jeho lepší prezentací na MHC gp II. Konečným efektem takto aktivovaných dendritických buněk byla výrazná amplifikace antigen specifických T buněk různých typů. Velice slibné výsledky byly dosaženy při **fúzi antigenu s molekulou kalretikulinu** (Kim et al., 2004). Kalretikulin je abundantní protein vázající Ca²⁺ (46 kDa), který je lokalizován v endoplasmatickém retikulu, kde se podílí na formování komplexu MHC gp I-antigenní epitop. DNA vakcína, kterou tento pracovní tým připravil nesla gen pro nukleokapsidový protein (N protein) koronaviru způsobujícího SARS (angl. severe acute respiratory syndrome) fúzovaný právě s genem pro kalretikulin. Tato fúze měla za následek dramatické zvýšení presentace N proteinu molekulami MHC gp I, což se projevilo nejvyšší úrovní humorální a buněčně zprostředkované imunity mezi všemi jinými testovanými DNA vakcínami. Navíc myši, kterým byla

podána tato DNA vakcína byly schopny nejlépe eliminovat N protein tohoto koronavi-
ru, kódovaný rekombinantním virem vaccinia.

Nadějně imunomodulační vlastnosti vykazuje taktéž ligand receptorového aktivátoru
dráhy NF κ B (angl. ligand to receptor activator of NF κ B, RANK-L), který patří do TNF
(angl. tumor necrosis factor) rodiny. RANK-L je produkován a vystaven na povrchu
aktivovaných T buněk, jeho receptor RANK je převážně lokalizován v cytoplasmatické
membráně dendritických buněk. **Interakce RANK-L/RANK je klíčová pro CD40-L
nezávislou aktivaci Th buněk.** RANK-L má podobnou funkci jako CD40-L, což je
jedna z klíčových kostimulačních molekul podílejících se na vzájemné stimulaci Th
buněk a dendritických buněk. Už dříve byl pozorován silný **imunomodulační potenciál
CD40-L.** Když tato molekula byla společně aplikována s daným antigenem, působila
významné zvýšení humorální a buněčně zprostředkované imunitní odpovědi, což vý-
razně zlepšilo účinnost aplikované DNA vakcíny proti infekčním agens i nádorům
(Mendoza et al., 1997; Xiang et al., 2001). Imunostimulační vlastnosti RANK-L prvně
popsali Miyahira et al. (2003), když aplikovali společně geny pro RANK-L a povrchový
antigen *Trypanosoma cruzi* jako DNA vakcínu laboratorním myším. Tato společná apli-
kace měla za následek dramatickou expanzi specifických CD⁸⁺ buněk. Zajímavé bylo
zjištění, že náhrada RANK-L za CD40-L neměla žádný imunostimulační efekt.

2.5 Hmyzí viry ve službách molekulárních biologů a biotechnologických společností

V posledních letech se v biologických laboratořích začaly hojně uplatňovat expresní euka-
ryotické systémy za účelem produkce rekombinantních proteinů. Jedním z těchto sys-
tému, který prodělal během několika málo let značný rozmach je bakulovirový expresní
systém.

Čeď hmyzích virů *Baculoviridae* zahrnuje skupinu velkých tyčinkovitých
DNA virů, které jsou v současné době rozdělovány do dvou rodů: Nucleopolyhedrovi-
rus (NPV) a Granulovirus (GV). Zatímco granuloviry mají vždy pouze jednu nucleo-
kapsidu ve virionu, nucleopolyhedroviry se vyskytují buď s jednou (angl. single nucleo-
polyhedrovirus, SNPV) nebo se dvěma a více nucleokapsidami uzavřenými v jednom
virionu (angl. multiple nucleopolyhedrovirus, MNPV). Obalené viriony jsou dále uza-
vřeny v proteinové hmotě tvořené granulinem (GV) nebo polyhedrinem (NPV). Kromě

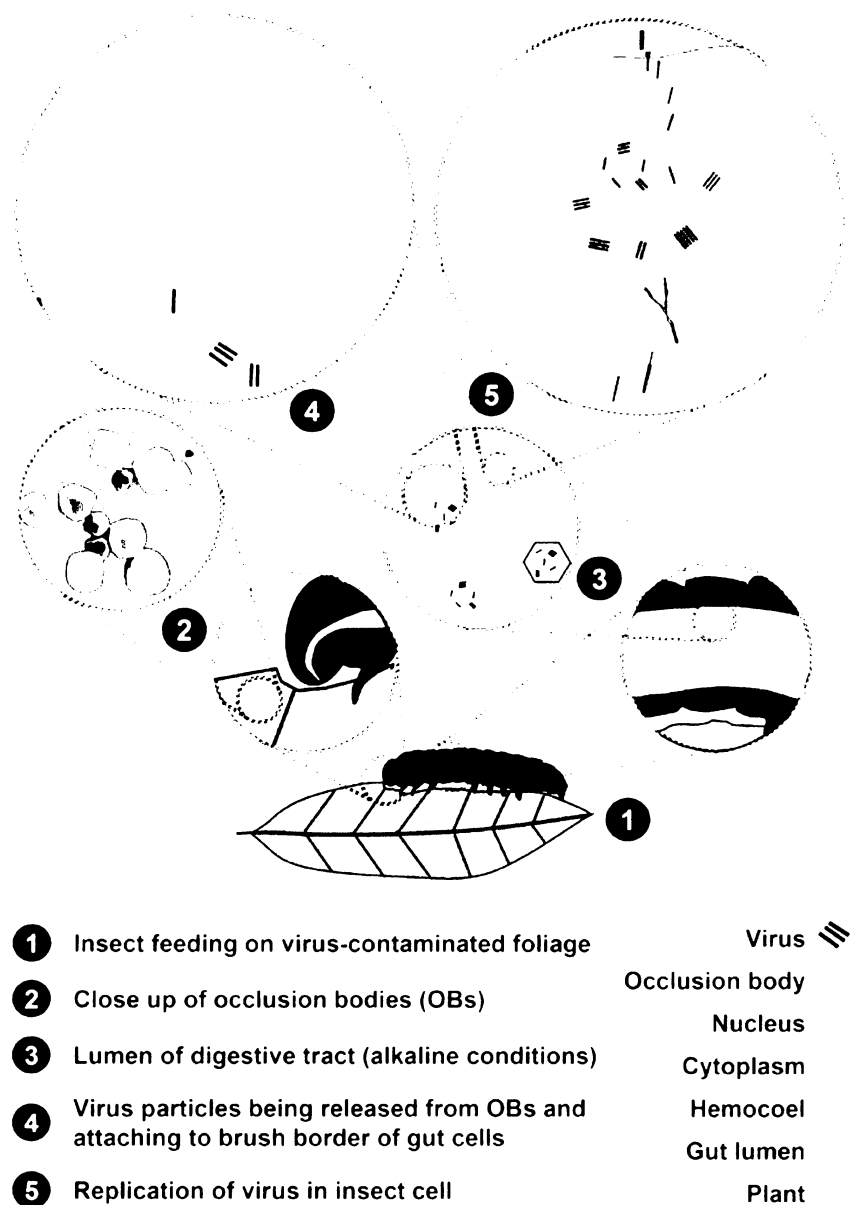
toho, granulinová tělíska obsahují vždy pouze jeden virion, naproti tomu polyhedra obsahují vždy více uzavřených virionů.

Bakuloviry mají široký okruh hostitelů v rámci bezobratlých živočichů, do současné doby bylo popsáno přes 600 hostitelských bezobratlých živočichů. Nejčastějšími hostiteli jsou larvy motýlů, mūr a některých *Hymenoptera*, avšak také například mořští garnáti. Bakuloviry se nereplikují v savcích, ani v jiných obratlovčích buňkách, což je jejich nesporná výhoda z hlediska bezpečnosti jejich genových modifikací.

2.5.1 Životní cyklus a strategie bakulovirů

Pro bakuloviry je typická přítomnost dvou odlišných forem virionů, které se tvoří v určitých fázích životního cyklu. První typ představují viriony uzavřené v proteinové parakrystalické matrix – polyhedrinové či granulinové povahy (angl. occlusion-derived virus), které jsou zodpovědné za primární infekci. Virové okluse tohoto typu jsou velice odolné vůči klimatickým faktorům, tudíž jejich biologický význam spočívá v průběhu horizontálního přenosu infekce. Druhou formu tvoří extracelulární viriony, které aktivně pučí z infikovaných buněk (angl. budded virus) později v průběhu sekundární infekce.

Larvy fytofágního hmyzu se nejčastěji infikují při žíru na rostlinách kontaminovaných proteinovými virovými oklusemi obsahujícími příslušné viriony. Nicméně u některých virů byl zaznamenán i přímý vertikální přenos, infekce může být též přenesena prostřednictvím některých druhů parasitoidů. V zásaditém prostředí středního střeva hmyzu parakrystalické okluse disociují a uvoňují se z nich viriony, které vstupují do buněk střevního epitelu mechanismem endocytosy. Nucleokapsidy unikají z endosomů a jsou dopravovány k buněčnému jádru za pomoci aktinového cytoskeletu. Transkripce genů a replikace genomu se odehrává v buněčném jádře, nově vzniklé viriony pučí basolaterální membránou a šíří infekci dále po hemocoelní tělní dutině. V průběhu pučení virionů z infikovaných buněk získávají viriony obal z plasmatické membrány včetně v ní zapuštěných virových glykoproteinů, což má další ohromný biotechnologický potenciál.



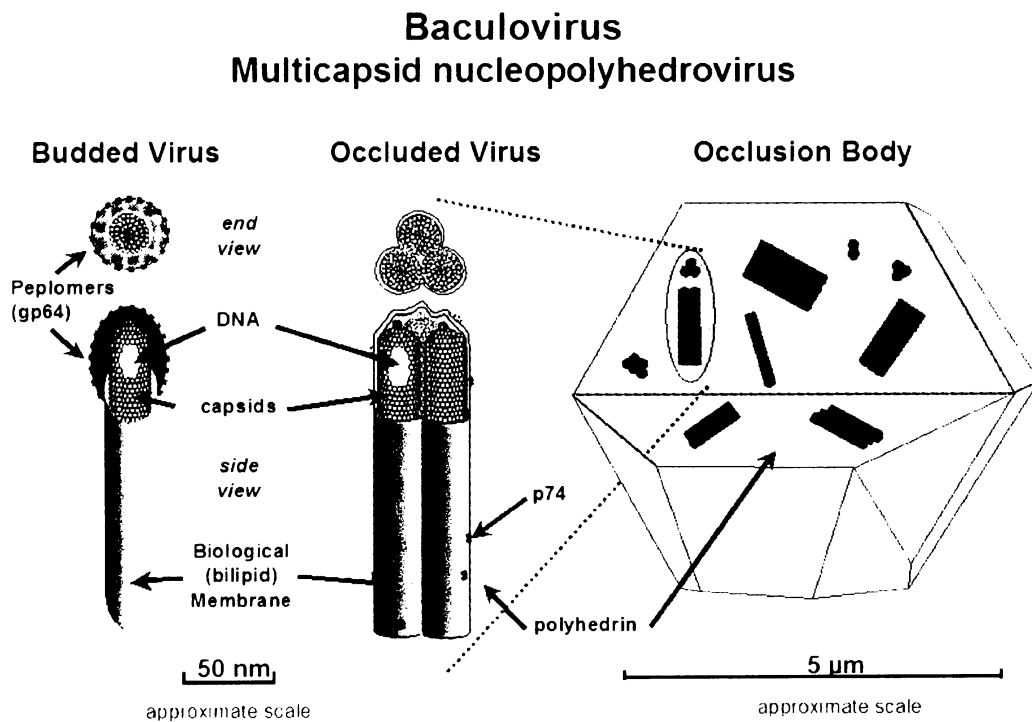
Obr. 2.13. Schématický obraz životního cyklu bakuloviru. Larva hostitelského druhu fytofágního hmyzu se primárně infikuje při žiru na kontaminovaných částech rostlin. Po pozření potravy kontaminované virovými oklusemi dochází v alkalickém prostředí středního střeva k uvolňování virových částic, které posléze infikují buňky středního epitelu. V těchto buňkách dochází k virové replikaci a začínají se z nich posléze uvolňovat extracelulární virové částice, které infikují další buňky. (převzato z <http://en.wikipedia.org/wiki/Baculovirus>)

Bakulovirová infekce může být rozdělena do tří etap – časná, pozdní a velmi pozdní fáze infekce:

- Časná fáze (0-6 h p.i.) představuje expresi časných proteinů, které mají za úkol deregulovat buněčné pochody ve prospěch virové replikace. Transkripce časných genů je zajišťována hostitelskou RNA polymerasou. Mezi nejzřetelnější

kapsidu, jejíž rozměry jsou 21×260 nm. Uvnitř kapsidy se nachází core tvořené kondensovanou genomovou DNA v komplexu s basickým proteinem p6.9 (Rohrmann, 1992).

Extracelulární viriony získávají svůj obal z plasmatické membrány infikovaných hmyzích buněk. V této lipidické membráně jsou zakotveny molekuly virových glykoproteinů. Hlavní obalový glykoprotein gp64 je nezbytný pro šíření viru systémovou infekcí v těle hmyzu. Tento glykoprotein utváří struktury nazývané peplomery na jednom konci extracelulárních virionů, zatímco v okluzních virionech se nevyskytuje. V obalu okluzních virionů se nachází jiné spektrum glykoproteinů. Rovněž se liší fosfolipidické složení obalů u obou typů virionů; lipidický obal extracelulárních virionů je bohatý na fosfatidylserin, zatímco v obalech okluzních virionů jsou hojně zastoupeny fosfatidylcholin a fosfatidyletanolamin.



Obr. 2.14. Struktura virionu bakuloviru. V levé části obrázku je znázorněna extracelulární virová částice s vyznačenými útvary peplomery. Ve střední a pravé části obrázku jsou nakresleny okluzní viriony uzavřené v parakrystalické matrix tvořené polyhedrinem. (převzato z <http://en.wikipedia.org/wiki/Baculovirus>)

2.5.2.1 Hlavní obalový glykoprotein Gp64

V průběhu evoluce bakulovirové obalové glykoproteiny podstoupily značné strukturní změny. Za původní obalový glykoprotein je považována molekula Ld130, též známa jako F-protein viru LdMNPV (*Lymantria dispar* MNPV). Funkce Ld130 byly posléze

nahrazeny neortologním genem pro glykoprotein gp64 u AcMNPV, BmNPV (*Bombyx mori* NPV) a OpMNPV (*Orgyia pseudotsugata* MNPV), avšak všechny tyto viry si rovněž ponechaly i původní glykoprotein Ld130. Gp64 je homotrimerický membránový glykoprotein, jenž je polárně distribuován na tyčinkovitém virionu. Primární struktura tohoto glykoproteinu je tvořena 512 aminokyselinami, vyskytují se v něm čtyři N-glykosylační místa, signální sekvence, oligomerizační a fúsní domény a hydrofobní transmembránová doména na C-konci. Gp64 je syntetizován v časně i pozdní fázi infekce s maximem produkce 24-26 h p.i. Glykoprotein Gp64 je nezbytný v procesu pučení extracelulárních virionů, přenosu viru mezi jednotlivými buňkami, tak i pro vazbu na buněčný povrch a vstup viru do buňky mechanismem endocytosy. Hlavní funkcí Gp64 je zprostředkování fúze virového obalu s membránou endosomů, která je závislá na kyselém pH. Pokusy s mutantními bakuloviry ukázaly, že funkce Gp64 může být nahrazena jinými virovými glykoproteidy, např. Ld130 či G-proteinem viru vesikulární stomatitidy.

2.5.3 Od perspektivních biopesticidů ke genové terapii

Již delší dobu je celosvětově vynakládáno velké úsilí za účelem zavedení entomopatogenních virů jako mikrobiálních insekticidů na ochranu rostlin místo chemických přípravků, které jsou často značně nešetrné k životnímu prostředí. Další klíčovou předností mikrobiálních insekticidů na bázi bakulovirů je skutečnost, že se replikují a perzistují v agroekosystémech. Jinými slovy, stačí pouze jedna či několik aplikací biopesticidu pro udržení příslušného škůdce pod ekonomickým prahem škodlivosti ve srovnání s chemickými přípravky, které je nutno opakovaně aplikovat v průběhu vegetace. Jistou nevýhodou virových insekticidů je jejich poměrně vysoká druhová specifita (Copping a Menn, 2000). Aplikace virových insekticidů vykazuje určité specifické znaky ve srovnání s klasickými pesticidy. Jelikož je nutné, aby biopesticid byl nejprve pozřen a posléze způsobil infekci, z tohoto důvodu je dynamika regulace populace škůdce pomalejší ve srovnání například s pyrethroidovými či organofosfátovými preparáty. Proto praktické zavedení virových insekticidů do programu integrované ochrany rostlin klade vysoké nároky na monitoring výskytu příslušného škůdce. Biopreparát by měl být cíleně aplikován v době výskytu prvních larválních instarů tak, aby se předešlo většímu poškození polních či lesních porostů (Moscardi, 1999). S cílem vylepšit insekticidní vlastnosti některých bakulovirů byly cíleně jejich genomy obohacovány různými geny pro hmyzí hormony, selektivní toxiny aj. Velké naděje jsou vkládány do rekombinativních

bakulovirů AcMNPV nesoucích ve svém genomu geny pro δ -endotoxin bakterie *Bacillus thuringiensis* (Martens et al., 1990), resp. pro vysoce silný toxin ze škorpióna druhu *Androctonus australis*. Tyto geneticky modifikované bakuloviry vykazují mnohem vyšší rychlost likvidace příslušných hmyzích hostitelů, čímž se snížilo poškození porostů bavlny o 60 % (Cory et al., 1994). Chemický koncern DuPont ve spolupráci s Crop Genetics International (USA) uvedl na trh komerční produkt SPOD-X™, který je určen pro regulaci škůdce *Spodoptera exigua* ve skleníkových podmínkách. Tento preparát je založen na insekticidních vlastnostech SeNPV (*Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus) a prokázal vysokou účinnost při potlačení tohoto fytofágního druhu z řádu *Lepidoptera* (Moscardi, 1999). V současné době je na celosvětovém trhu několik desítek mikrobiálních insekticidů na bázi bakulovirů. Širšímu praktickému uplatnění virových insekticidů v ochraně rostlin však prozatím stojí v cestě jejich relativně velká cena ve srovnání s chemickými přípravky.

Kromě insekticidních vlastností a možností produkce rekombinantních proteinů (viz následující kapitola) jsou bakuloviry v posledních letech intenzivně zkoumány v souvislosti s vývojem vektorů pro genovou terapii. Důvodem je experiment provedený pracovní skupinou Hofman et al. (1995), která jako první poukázala na možnost transdukce savčích buněk prostřednictvím rekombinantních bakulovirů (AcMNPV). Později bylo prokázáno, že bakulovirové vektory jsou schopné transdukovat jak primární kultury a stabilní buněčné linie (Boyce a Bucher, 1996), tak i některé savčí tkáně (Hoare et al., 2005). M. Boyce a L. Bucher ukázaly, že kromě cytomegalovirového promotoru (CMV) zodpovědného za expresi transgenů v savčích buňkách je možné použít do bakulovirových vektorů i promotor viru Rausova sarkomu (RSV). Účinnost transdukce a hladina exprese transgenů je u bakulovirových vektorů srovnatelná s adenovirovými systémy (Airenne et al., 2000). Obohacením lipidového obalu bakulovirového vektoru o G protein viru vesikulární stomatitidy mělo za následek enormní zvýšení účinnosti transdukce jak *in vitro*, tak v *in vivo* pokusech (Barsoum et al. 1997). Za účelem zvýšit tkáňovou či buněčnou specifitu (tropismus) bakulovirových vektorů byly provedeny pokusy s cílenou modifikací jejich povrchových glykoproteinů (Kitagawa et al., 2005). Rekombinantní bakuloviry jsou tudíž roněž velice slibnými a bezpečnými vektory pro genovou terapii ve srovnání s vektorovými systémy odvozenými od vysoce patogenních virů.

2.5.4 Historie bakulovirových expresních systémů

Do současné doby bylo vyvinuto několik typů bakulovirových systémů. Tyto eukaryotické expresní systémy jsou založeny na několika unikátních vlastnostech polyhedrinového proteinu:

- Polyhedrin je masivně produkován v pozdní fázi infekčního cyklu, kdy dosahuje jeho hladina až 50 % celkové buněčné hmoty.
- Není nutný pro infekci a replikaci viru v tkáňové kultuře.
- Virové částice, které nenesou v genomu gen pro polyhedrin vykazují odlišnou morfologii plaků v tkáňové kultuře ve srovnání s divokými typy virů.

2.5.4.1 Původní strategie přípravy rekombinantních bakulovirů

Z výše uvedených atributů vyplývá, že je možné sekvenci kódující polyhedrinový nebo jiný velmi pozdní (např. p10) protein částečně nebo úplně nahradit cizorodým genem. Rekombinantní bakulovirus je tedy možné připravit nahrazením polyhedrinové sekvence příslušným genem pomocí homologií rekombinace. Na základě odlišné morfologie plaků je poté možné identifikovat a dále purifikovat rekombinantní virus. Jelikož genom bakulovirů je obrovský (~130 kbp), z praktického hlediska je nejprve požadovaný gen vložen do transferového plasmidu. Tento přenosový plasmid je úzpůsoben pro pomnožování v *E. coli* (pUC ori, β -laktamasový selekční gen aj.), dále obsahuje polyhedrinový či jiný pozdní silný promotor s netraslatovatelnou "leader" sekvencí, za níž je situováno klonovací místo pro vkládání cizorodých genů. Za polylinkerem je sekvence některého eukaryotického poly-A signálu (SV40 poly-A, HSV-tk poly-A aj.). Celá tato expresní kazeta je obklopena bakulovirovými sekvencemi zajišťujícími homologii rekombinaci s genomovou DNA viru. Po přípravě přenosového plasmidu s příslušným heterologním genem je tento vektor společně s genomovou DNA "divokého typu" bakuloviru vnášen do hmyzích buněk, např. kalcium-fosfátovou transfekcí či elektroporací. V hmyzích buňkách pak dojde k homologii rekombinaci mezi přenosovým plasmidem a genomovou DNA bakuloviru, při které dojde k výměně polyhedrinového genu za odpovídající expresní kazetu z přenosového plasmidu. Frekvence homologní rekombinace mezi virovou DNA a přenosovým plasmidem je však nízká (0,1-0,5 %). Tato nevýhoda byla odstraněna přípravou delečních mutantů bakulovirů v ORF 1629 a ORF 603. Odstranění těchto sekvencí z genomu viru má za následek blok v replikaci a propagaci viru. Jsou-li však hmyzí buňky transfekovány přenosovým plasmidem, který nese příslušný cizorodý gen a sekvenci ORF 1629, společně s bakulovirovou DNA s ORF1629 delecí, může být

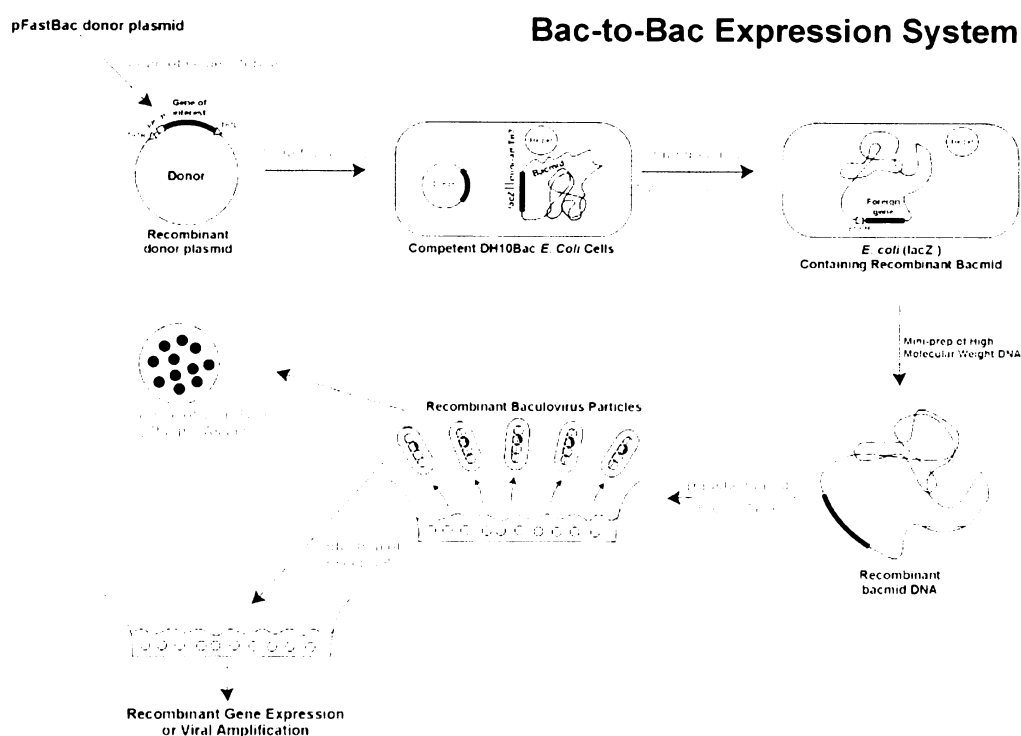
tento esenciální gen získám zpět homologii rekombinací. Účinnost této rekombinace je ohromná, téměř 99 % nově vzniklých virových částic obsahuje opravenou sekvenci v ORF 1629, tj. i cizorodý gen za účelem exprese. Rekombinantní bakuloviry je možné poté selektovat na základě odlišné morfologie plaků, ať už vizuálně, molekulární hybridizací či imunochemicky na přítomnost daného proteinu. V praxi je často nutné provést několik následných plakových analýz tak, aby bylo získáno čisté inokulum příslušného rekombinantního bakuloviru, což může být někdy dost komplikované a časově náročné.

2.5.4.2 Bakulovirové expresní systémy nové generace

Pro zjednodušení praktické přípravy rekombinantních bakulovirů byly v posledních letech zavedeny do procesu jejich preparace určité inovační prvky související s bouřlivým rozvojem metodologie molekulární biologie. Terčem těchto snah bylo především odstranit či alespoň zefektivnit časově náročnou purifikaci rekombinantních bakulovirů.

Hlavními složkami těchto systémů je sada tzv. **donorových plasmidů** a speciální kmen recipientního mikroorganismu *E. coli*. Prvním krokem je vždy klonování příslušného genu do donorového plasmidu, kde je rekombinantní gen umístěn na 5' konci pod kontrolu silných bakulovirových promotorů (polyhedrinový či p10), zatímco na 3' konci je situován některý z eukaryotických poly-A signalů (SV40 poly-A, aj.). Tato expresní kazeta rovněž obsahuje některý ze selekčních genů (rezistence vůči gentamicinu) a dále je celá obklopena z obou stran sekvencemi pro místně specifickou transpozici (Tn7). Po přípravě donorového plasmidu následuje jeho vnesení do speciálního kmene *E. coli* (např. *E. coli* DH10Bac aj.). Tento bakteriální kmen nese tzv. bakulovirový kyvadlový vektor (**bacmid**) s mini-*att*Tn7 transpozicičním místem a dále pomocný (angl. helper) plasmid. Jakmile je vnesen donorový plasmid do buněk tohoto bakteriálního kmene dojde k transpozici mezi mini-Tn7 elementem donorového plasmidu a cílovým mini-*att*Tn7 místem na bacmidu, čímž se vytvoří rekombinantní bacmid. Proces transpoziciční reakce je závislý na proteinové mašinérii (transpozasa), kterou dodává právě pomocný plasmid. Pro usnadnění detekce klonů nesoucích rekombinantní bacmidy je mini-*att*Tn7 místo bacmidu umístěno do segmentu kódujícího LacZ α protein (po α -komplementaci se vytváří funkční β -galaktosida), však inserce neporušuje čtecí rámec tohoto genu. Až teprve následkem transpozice mezi donorovým plasmidem a bacmidem se naruší čtecí rámec LacZ α , tudíž v takových bakteriích nedochází k syntéze funkčního enzymu β -galaktosidasy. Tyto bakterie lze pak snadno identifikovat na médiu v přítomnosti analo-

gu laktosy – isopropyl- β -thiogalaktopyranosidu (IPTG) a chromogenního substrátu 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-thiogalaktopyranosidu (X-gal). Dalším krokem je preparace vysokomolekulární bacmidové DNA (~140 kbp) z rekombinantních bakteriálních klonů. Po ověření přítomnosti transgenu v bacmidové DNA (PCR detekce) jsou hmyzí buňky transfekovány touto vysokomolekulární DNA. Po 4-6 dnech kultivační médium obohacené o vypučené viriony, lze použít přímo pro infekci hmyzích buněk za účelem produkce rekombinantního proteinu či je možné jej nejprve titrovat pomocí plakových analýz.



Obr. 2.15. Obecné schéma přípravy rekombinantního bakuloviru pomocí soupravy Bac-to-Bac Expression System (Invitrogen). Prvním krokem je klonování příslušného genu do donorového plasmidu. Následuje transformace bakterií *E. coli* DH10Bac donorovým plasmidem, kde dojde procesem transpozice k tvorbě rekombinantního bacmidu. Ze selektovaných rekombinantních klonů je posléze izolována vysokomolekulární bacmidová DNA, kterou se přímo transfekují hmyzí buňky. Uvolněné viriony jsou poté použity pro infekci hmyzích buněk za účelem produkce rekombinantních proteinů. (převzato a upraveno z www.invitrogen.com)

2.5.4.3 Některé výhody, ale i omezení produkce proteinů v hmyzích buňkách

Ve srovnání s produkcí proteinů v bakteriálních buňkách je exprese proteinů v bakulovirových expresních systémech ryze "eukaryotická", tudíž dochází zde k modifikacím proteinů, štěpení a transportu, obdobně jako v savčích buňkách. Úroveň posttranslačních modifikací, zejména glykosylací však není dostatečná při produkci některých glykoproteinů. Pro tyto účely byly v poslední době připraveny speciální hmyzí buněčné

linie, které dokážou opatřovat produkované savčí proteiny i zbytky kyseliny sialové (Seo et al., 2001).

Na rozdíl od bakterií, kde zůstávají heterologně produkované proteiny většinou v nerozpustných inklusích, jsou proteiny produkované v hmyzích buňkách rozpustné, s výjimkou vysoce hydrofóbních a transmembránových proteinů. Obrovskou výhodou bakulovirů je velikost a flexibilita jejich genomu (~130 kbp), což umožňuje vkládat dlouhé úseky DNA. Bakuloviry jsou pro obratlovce neinfekční, což dovoluje použít tyto vektory pro expresi onkogenů či jinak nebezpečných a toxických proteinů. Z technologického hlediska je výhodné, že hmyzí buňky v kultuře nevyžadují zvýšený obsah CO₂ v atmosféře, tudíž je možné je kultivovat pouze v obyčejných termostatech.

Kapitola 3

CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

V naší laboratoři se zabýváme mimo jiné přípravou kandidátních antigenních nosičů odvozených od kapsid myšního polyomaviru. Umělé virové částice jsou v současné době intenzivně studovány pro jejich široké využití jak v genové terapii a imunoterapii, tak i pro účely nanotechnologických aplikací. V případě umělých polyomavirových částic existuje několik možností jejich cílené modifikace pro potřeby přenosu a presentace antigenních epitopů. První možností je cíleně vkládat cizí epitopy do flexibilních smyček hlavního strukturního proteinu VP1, kde jsou poté tyto epitopy exponovány na povrchu virové částice. Další možností je jejich ukrytí uvnitř pseudokapsidy ve formě fúsních proteinů s minoritními proteiny. Právě tato možnost byla využita v naší laboratoři, kde byly připraveny polyomavirové částice nesoucí modelový antigen (EGFP protein) jako fúsní protein s C-koncovou doménou VP3 proteinu (Bouřa et al., 2005). Nicméně snažíme se rovněž zabývat i vývojem antigenních nosičů odvozených od vysoce imunoadjuvatních proteinových komplexů bakteriálních enterotoxinů.

Proto konkrétní cíle této diplomové práce byly tyto:

1.
 - a) Studium interakcí umělých polyomavirových částic (složených buď pouze z hlavního strukturního proteinu VP1 či chimerických pseudokapsid sestavených z proteinu VP1 a fúsního proteinu EGFP-tVP3) s myšími dendritickými buňkami s důrazem na indukci fenotypových a funkčních znaků jejich maturace. S využitím specifických inhibitorů nahlédnout do spletnosti zpracování a antigenní presentace peptidů odvozených od polyomavirových částic.
 - b) Stanovení hladin protilátek v krvi imunizovaných myší. Zjistit, zda dochází i k produkci protilátek proti přenášenému antigenu (EGFP proteinu).
 - c) Analýza proliferace EGFP-VLP specifických CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocytů, včetně jejich produkce IL-2 a INF- γ . Přinést důkazy o indukci EGFP-specifických T buněk v tělech imunizovaných myší.

- d) Stanovení počtu a distribuce regulačních $CD4^+CD25^+$ T buněk v tělech imunizovaných myší.
 - e) Analýza cytotoxických aktivit
2. Na základě plasmidového vektoru pFastBac DUAL připravit expresní kazetu pro simultánní produkci proteinů VP1 a t-VP3 v hmyzích buňkách. Dále s využitím obdobné strategie připravit donorový plasmid pFastBac DUAL-insVP1, který ponese mutovaný gen pro VP1 protein.
3. a) Konstrukce donorových vektorů pro produkci netoxické formy cholerového toxinu. Na základě plasmidu pFastBac DUAL připravit expresní kazetu nesoucí pod polyhedrinovým promotorem gen pro B podjednotku cholerového toxinu a pod protilehlým promotorem p10 modifikovanou nukleotidovou sekvenci pro CTA2 podjednu cholerového toxinu. V posledním kroku vložit k 5'-konci genu pro CTA2 sekvenci modelového antigenu (EGFP proteinu).
- b) Na základě připravených donorových plasmidů pFastBac DUAL-CTB+mCTA2 a pFastBac-CTB+EGFP-CTA2 připravit odpovídající rekombinantní bakuloviry za účelem produkce těchto proteinových komplexů v hmyzích buňkách. Ověření produkčnosti rekombinantních bakulovirů a biochemická charakterizace produkovaných proteinů. Purifikace netoxické formy cholerového toxinu z hmyzích buněk.

Kapitola 4

MATERIÁL A METODY

V případě že není uvedeno jinak, byly během experimentální práce použity a aplikovány zavedené laboratorní metody a přístupy včetně sterilizace pomůcek a médií, inkulace médií, sestavení elektroforetických aparátů, centrifugací, DNA amplifikačních technik atp. podle prací Sambrook et al. (1989) a King a Possee (1992). Pokud nebude zavedeno jinak, vždy se v textu rozumí příprava a používání vodných roztoků příslušných chemikálií a biochemikálií. S laboratorními zvířaty bylo zacházeno pouze v souladu s paragrafem 17 zákona č. 246/1992 Sb.

4.1 Použité bakuloviry a jejich charakteristika

- **rBac-VP1** Tento rekombinantní bakulovirus byl připraven za účelem produkce umělých polyomavirových částic složených pouze z molekul hlavního strukturního proteinu VP1, tudíž do jeho genomu byl vložen pod polyhedrinový promotor gen pro VP1 protein myšího polyomaviru (Forstová et al., 1993).
- **rBac-VP1+EGFP-tVP3** Rekombinantní bakulovirus, který nese pod polyhedrinovým promotorem gen pro hlavní strukturní protein VP1 a pod dalším silným promotorem p10 fúzní gen EGFP-tVP3 (Bouřa et al., 2005). Simultánní produkci těchto dvou proteinů dochází v hmyzích buňkách k formování chimérických umělých nanočástic odvozených od myšího polyomaviru, kde cizí antigen (v tomto případě protein EGFP) je uzavřen uvnitř pseudokapsid.
- **rBac-INS-VP1** Tento bakulovirus nese pod polyhedrinovým promotorem cíleně mutovaný gen pro protein VP1 myšího polyomaviru s inzercí polyklonovacího místa do HI smyčky. Bakulovirus byl připraven za účelem ověření, zda cílená inserce v HI smyčce naruší schopnost formování molekul VP1 proteinu do struktur umělých polyomavirových částic.
- **rBac-CTB-mCTA2** Rekombinantní bakulovirus do jehož genomu byly paralelně vloženy pod polyhedrinový, resp. p10 promotor geny pro proteiny CTB a mCTA2 cholarového toxinu. Bakulovirus byl připraven s cílem ověřit možnost produkce cholarového toxinu v hmyzích buňkách.

- **rBac-CTB+EGFP-mCtA2** Rekombinantní bakulovirus do jehož genomu byly paralelně vloženy pod polyhedrinový, resp. p10 promotor geny pro proteiny CTB a EGFP-mCtA2 cholerového toxinu. Bakulovirus byl připraven s cílem ověřit možnost produkce antigenního nosiče odvozeného od cholerového toxinu v hmyzích buňkách.

4.2 Bakteriální kmeny

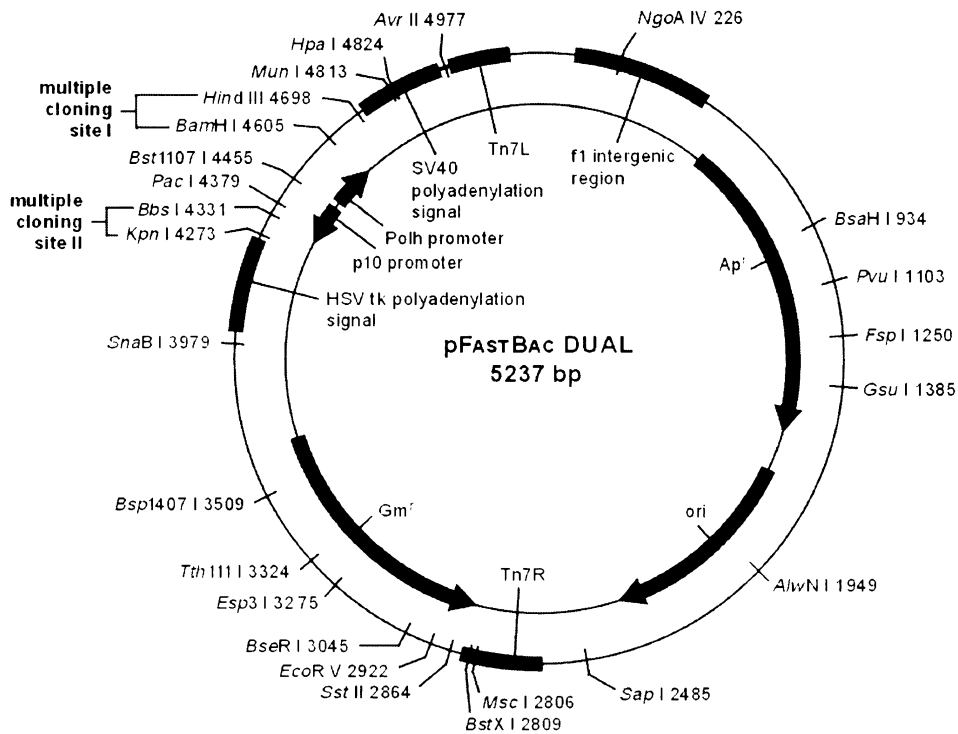
- ***Escherichia coli* DH5 α** [rec A1 endA1 thi-1 hsdR17 supE44 gyrA96 relA1 Φ 80 lacZ Δ M15] (Stratagene)
- ***Escherichia coli* XL Blue** [lac [F'*proAB*, lacI^qZDM15, Tn10(*Tet*^R)] *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*] and Top10F' (F'[*proAB*, lacI^q ZDM15, Tn10(*Tet*^R)] *mcrA*, Δ (*mrrhsdRMS-mcrBC*), ϕ 80lacZ Δ M15, Δ lacX74, *deoR*, *recA1*, *laraD139*, Δ (*ara-leu*)7697, *galU*, *galK*, *rpsL*(*Str*^R), *endA1*, *nupG*] (Stratagene)
- ***Escherichia coli* DH10 Bac** [F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 *recA1* *endA1* *araD139* Δ (*ara*, *leu*)7697 *galU* *galK* λ - *rpsL* *nupG* /pMON14272 / pMON7124] (Invitrogen)

4.3 Hmyzí a savčí buněčné linie a primární kultury

- **Sf9** Hmyzí buněčná linie odvozená z tkáně vaječníků motýla *Spodoptera frugiperda*. Buněčná linie byla získána z americké sbírky buněčných linií (angl. American Type Cell Collection, označení ATCC CRL 1711).
- **Swiss 3T3** Myší fibroblasty odvozené z embryonálních tkání, linie je sensitivní pro myší polyomavirus a SV40. Tato buněčná linie byla poskytnuta Dr. J. Hejnarem, ÚMG AV ČR, Praha.
- **NMuMG** Buněčná linie odvozená z epitelu myší prsní žlázy, linie je sensitivní a permissivní pro myší polyomavirus. Tato linie byla poskytnuta Prof. B. Griffin, Royal Postgraduate School, Londýn.
- **BMDC** Myeloidní dendritické buňky odvozené z prekurzorových buněk kostní dřene (stehenní kost) myši kmene Balb/c. Buňky kostní dřene byly po izolaci vždy kultivovány v kompletním RPMI-1640 médiu (10% FCS) s růstovým faktorem GM-CSF (4%) po dobu 5 dní. Na tomto místě je nutné podotknout, že kromě samotných myeloidních dendritických buněk se v kultuře vyvinulo i určité množství makrofágů. Jejich přítomnost v kultuře byla tolerována. Všechny dendritické buňky byly připravovány v Laboratoři imunoregulace PřF UK ve spolupráci s Mgr. J. Fričem.

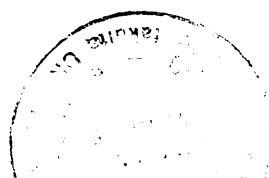
4.4 Klonovací, expresní a donorové vektory

- **pFastBac DUAL** Donorový vektor plasmidového typu, do kterého je možné vložit nezávisle dva cizí geny za účelem simultánní produkce dvou rekombinantních proteinů. Plasmid je součástí expresního systému Bac-to-Bac (Invitrogen).



Obr. 4.1. Kruhá mapa plasmidového vektoru pFastBac DUAL. Tento plasmid nese dva selekční geny zajišťující rezistenci na ampicilin (Ap^r) a gentamicin (Gm^r), dále pak dva regiony replikačních počátků (pUC ori, resp. f1 ori). Vlastní expresní kazeta je umístěna mezi sekvencemi zajišťující její transpozici do bacmidové DNA přítomné v *E. coli* DH10 Bac kmenu. V rámci expresní kazety jsou umístěny dva silné bakulovirové promotory v opačné orientaci (polyherinový promotor Polh a promotor p10), dvě klonovací místa (polylinkery) umístěné pod každým z promotorů a polyadenylační signály pocházející z virů SV40, resp. HSV tk.

- **pFastBac HTA** Donorový vektor plasmidového typu, do kterého je možné vložit cizí gen za histidinovou kotvu ($6 \times His$) za účelem exprese rekombinantních proteinů v bakulovirovém systému Bac-to-Bac (Invitrogen).
- **pMJG-MPyV** Plasmidový vektor odvozený od vektoru pMJ1, do nějž byla vložena celá sekvence geonomu myšího polyomaviru (5292 bp) linearizovaného enzymem *Eco* RI (Krauzewicz et al., 1990).
- **pUC18-insVP1** Plasmidový vektor pUC18 nesoucí mutovanou verzi genu pro VP1 protein myšího polyomaviru. Tato sekvence VP1 genu nese inserci (miniklonovací místo a flexibilní linkery)



v místě HI smyčky. Plasmid poskytla RNDr. Hana Španielová, Ph.D.

- **pEGFP-C2** Plasmidový vektor určený pro expresi C-koncových fúsních proteinů s proteinem EGFP v savčích buňkách. (Clontech).
- **pCVD27** Bakteriální plasmidový vektor nesoucí fragment operonu kódujícího katalytickou A1 podjednotku cholerového toxinu (CTxA1) z patogenní bakterie *Vibrio cholerae*, plasmid poskytl Dr. James Kaper, University of Maryland (USA).
- **pCVD621** Bakteriální plasmidový vektor nesoucí fragment operonu kódujícího CTxB a CTxA2 z patogenní bakterie *Vibrio cholerae*, plasmid poskytl Dr. James Kaper, University of Maryland (USA).

4.5 Protilátky

4.5.1 Primární protilátky

- **anti-MPyV VP1 – A1** Myší monoklonální protilátka proti hlavnímu strukturnímu proteinu VP1 myšího polyomaviru, použité ředění 1:10 (Forstová et al., 1993).
- **anti-VP2/VP3 2C8** Myší monoklonální protilátka proti minoritním strukturním proteinům VP2 a VP3 myšího polyomaviru, použité ředění 1:5 (Forstová et al., 1993)
- **anti-EGFP** Králičí polyklonální protilátka proti proteinu EGFP, použité ředění 1:800 (Abcam)
- **anti-CTB** Myší monoklonální protilátka proti B podjednotce cholerového toxinu (CTB cholergenoidu), použité ředění 1:1000 (Abcam)
- **anti-CTB** Králičí polyklonální protilátka proti B podjednotce cholerového toxinu (CTB cholergenoidu), použité ředění 1:1000 pro Western blot, 1:200 pro nepřímou imunofluorescenci (Abcam)
- **anti-MHC gp II FITC** Potkaní polyklonální protilátka proti myším MHC gp II značená FITC, použité ředění 1:100 (Pharmingen)
- **anti-CD86 PE** Potkaní polyklonální protilátka proti myší povrchové kostimulační molekule CD86 značená phycoethrinem, použité ředění 1:100 (Pharmingen)
- **anti-CD80 PE** Potkaní polyklonální protilátka proti myší povrchové kostimulační molekule CD80 značená phycoethrinem, použité ředění 1:100 (Pharmingen)

- **anti CD4 FITC** Protilátka proti myší povrchové molekule CD4 (klon GK1.5) značená FITC, (Pharmingen)
- **anti CD8 PB** Protilátka proti myší povrchové molekule CD8 (klon 53-6.7) značená Pacific Blue, (Pharmingen)
- **antiCD25 APC** Protilátka proti myší povrchové molekule CD25 (klon PC 61.5) značená allophycocyanine, (eBioscience)
- **anti-IL-2** Potkaní polyklonální protilátka proti myšimu cytokinu IL-12, použité ředění 1:100 (Pharmingen)
- **anti-IL-12** Potkaní polyklonální protilátka proti myšimu cytokinu IL-12 p70, použité ředění 1:100 (Pharmingen)
- **anti-INF- γ** Potkaní polyklonální protilátka proti myšimu cytokinu INF- γ , použité ředění 1:100 (Pharmingen)
- **anti-Foxp3 PE** Protilátka proti myšimu/potkanímu transkripčnímu faktoru Foxp3 značená phycoerythrinem (klon FJK-16s), (eBioscience)

4.5.2 Sekundární protilátky

- **Go-anti-Rb HRP** Kozí protilátka proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidasou (angl. horse-radish peroxidase, HRP), použité ředění 1:1000
- **Go-anti-Mo HRP** Kozí protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidasou, použité ředění 1:1000 (Biorad)
- **Go-anti-Ra HRP** Kozí protilátka proti potkaním imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidasou (angl. horse-radish peroxidase, HRP), použité ředění 1:1000 (BioRad)
- **Do-anti-Mo AF-488** Oslí protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s fluochromem AlexaFluor 488 nm, použité ředění 1:2000 (Molecular Probes)
- **Go-anti-Rb AF-488** Kozí protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s fluochromem AlexaFluor 488 nm, použité ředění 1:2000 (Molecular Probes)
- **Go-anti-Rb AF-546** Kozí protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s fluochromem AlexaFluor 546 nm, použité ředění 1:2000 (Molecular Probes)
- **Go-anti-Mo G10** Kozí protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s částicemi koloidního zlata (\varnothing 10 nm), použité ředění 1:20 (British Biocell)

4.6 Preparace, amplifikace a modifikace molekul DNA

4.6.1 Izolace plasmidové DNA alkalickou lyzí (Sambrook et al., 1989)

Bakteriální kultury *E. coli* (50 ml) nesoucí příslušné plasmidy byly centrifugovány ($4150 \times g/10$ min), sediment buněk byl následně resuspendován ve 2 ml GET pufru. Poté byly k buňkám přidány 4 ml čerstvě připraveného Lyzačního pufru a směs byla 4-6 \times zamíchána překlopením zkumavky do horizontální polohy. Po inkubaci (max. 5 min) byly do každé zkumavky přidány 3 ml Neutralizačního pufru a obsah byl opět promíchán a inkubován 20 min na ledu. Po centrifugaci ($4150 \times g/30$ min) byl supernatant přenesen (případně zfiltrován) do nové zkumavky, kde k němu bylo přidáno 0,7 objemu isopropanolu a směs byla promíchána a inkubována 10 min na ledu. Po centrifugaci ($4150 \times g/30$ min) byl sediment promyt 3 ml 80% etanolu. Vysušený sediment byl resuspendován ve 300 μ l TE pufru, byly přidány 3 μ l RNasy A (10 mg/ml) a vzorek byl inkubován 30 min při 37 °C. Následně byla plasmidová DNA z roztoku extrahována 1 \times 1 objemem fenolu (pH 8,0), 1 \times 1 objemem ekvivalentní směsi fenol (pH 8,0)-chloroform a 2 \times 1 objemem upraveného chloroformu. Extrakce vždy byly prováděny intenzivním třepáním (5 min) a centrifugací ($11000 \times g/10$ min). Plasmidová DNA ve výsledném supernatantu byla srážena přidávkem 1/10 objemu 3 M octanu sodného (pH 5,2) a 2,5 objemu předchlazeného (-20 °C) 96% etanolu a inkubací směsí 60 min při -20 °C. Vysrážená plasmidová DNA byla centrifugována ($11000 \times g/10$ min), sediment byl promyt 500 μ l 80% etanolu. Na závěr, plasmidová DNA byla resuspendována v 200 μ l sterilní ddH₂O a uchovávána před dalším použitím při -20 °C.

Použité roztoky:	GET pufr	50 mM glukosa, 25 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA, RNasa A (0,1 mg/ml)
	Lyzační pufr	0,2 M NaOH, 1% (w/v) SDS
	Neutralizační pufr	60 ml 5 M octan draselný (pH 5,2), 29,5 ml ledové kyseliny octové, doplnit dH ₂ O do 100 ml
	TE (Tris/EDTA) pufr	10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA
	RNasa A	10 mg/ml, zbavená DNasy (5 min/ 100 °C)
	3 M NaAc (pH 5,2)	
	fenol (pH 8,0)	destilovaný fenol pufrovaný pomocí 1 M Tris-HCl (pH 8,0), 0,1% 8-hydroxychinolin (pro zamezení oxidace do vyšších oxidačních stavů)
	upravený chloroform	směs chloroformu s isoamylalkoholem (v/v 24:1), isoamylalkohol se přidává, aby zabránil pění směsi při organické extrakci

Pro účely metod transfekce či sekvencování DNA, které vyžadují DNA templát ve velmi vysoké čistotě byla plasmidová DNA preparována a purifikována komerčně dodávanou soupravou EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen), dle instrukcí výrobce.

4.6.2 Vyhledávání rekombinantních klonů *E. coli* restriční analýzou

Narostlé kolonie byly zaočkovány do 700 μ l LB^{AMP+} média v mikrozkuhavce a kultivovány při 37 °C 9-12 h za stálého třepání na orbitální třepače (150 rpm). Buňky byly sedimentovány na dno mikrozkuhavky centrifugací (11000 \times g/30 s) a následně byly resuspendovány ve 250 μ l GET pufru. Dále byly buňky vystaveny alkalickému Lyzačnímu pufru (250 μ l), mikrozkuhavky byly 4-6 \times promíchány překlápěním do horizontální polohy a bezprostředně byla směs neutralizována přidáním 200 μ l Neutralizačního pufru. Po důkladném promíchání byla směs centrifugována (11000 \times g/10 min), supernatant byl přenes do nové sterilní mikrozkuhavky a v něm obsažená plasmidová DNA byla precipitována přidáním 500 μ l isopropanolu. Vysrážená DNA byla sedimentována centrifugací (11000 \times g/10 min), pelet DNA byl opláchnut 80% etanolem a resuspendován v 15-20 μ l TE pufru. Takto připravená plasmidová DNA byla podrobena restriční analýze, pro dokonalé odstranění kontaminující RNA byl přidán 1 μ l RNasy do restriční směsi. Délka restričních DNA fragmentů byla kontrolována gelovou elektroforézou.

Použité roztoky:	GET pufr	50 mM glukosa, 25 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA, RNasa A (0,1 mg/ml)
	Lyzační pufr	0,2 M NaOH, 1% (w/v) SDS
	Neutralizační pufr	60 ml 5 M octan draselný (pH 5,2), 29,5 ml ledové kyseliny octové, doplnit dH ₂ O do 100 ml
	TE (Tris/EDTA) pufr	10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA
	RNasa A	10 mg/ml, zbavená DNasy (5 min/100 °C)

4.6.3 Odstranění molekul RNA ze vzorku plasmidové DNA

V případě, že v průběhu procesu izolace plasmidové DNA nedošlo k dostatečnému odstranění molekul RNA byl vzorek vystaven působení RNasy A. K zásobnímu roztoku plasmidové DNA (100 μ l) byl přidán 1 μ l RNasy A (10 mg/ml) a vzorek byl inkubován 1 h při 37 °C. Plasmidová DNA byla ze směsi extrahována 1 \times 1 objemem fenolu (pH 8,0), 1 \times 1 objemem ekvivalentní směsi fenol (pH 8,0)-chloroform a 2 \times 1 objemem upraveného chloroformu. Extrakce byly vždy prováděny intenzivním třepáním (5 min) a centrifugací (11000 \times g/10 min). Plasmidová DNA byla ve výsledném supernatantu srážena přidávkem 1/10 objemu 3 M octanu sodného (pH 5,2) a 2,5 objemu předchlazeného (-20 °C) 96% etanolu a inkubací směsi 60 min při -75 °C. Vysrážená plasmidová DNA byla sedimentována centrifugací (11000 \times g/10 min), sediment byl promyt 80% etanolem, vysušen a rozpuštěn obvykle ve 100 μ l TE pufru.

Použité roztoky a enzymy:	RNasa A	10 mg/ml, zbavená DNasy (5 min/100 °C)
---------------------------	----------------	--

4.6.4 Preparace bacmidové DNA

Rekombinantní kolonie *E. coli* DH10 Bac nesoucí příslušný bacmid byly zaočkovány do 5 ml LB^{Tet+Gen+Kan+} média a aerobně kultivovány 9-12 h při 37 °C. Narostlá kultura (1,5 ml) byla centrifugována (11000 × g/2 min), pelet buněk byl poté resuspendován v 567 µl TE pufru. Následně bylo k resuspendovaným buňkám přidáno 30 µl 10% SDS a 6 µl proteinasy K (10 mg/ml) a směs byla inkubována 1 h při 37 °C. Poté bylo ke směsi přidáno 100 µl 5 M NaCl a směs byla inkubována 10 min při 65 °C. Bacmidová DNA byla extrahována 2× ekvivalentním objemem chloroformu, směs byla vždy opatrně promíchána a centrifugována (11000 × g/4 min) a horní vodní fáze byla opatrně odebrána. Srážení bacmidové DNA bylo provedeno přidávkem 0,6 objemu isopropanolu a směs byla opatrně promíchána překlápním do vodorovné polohy. Vysrážená DNA byla namotána na sterilní skleněnou kličku, opláchnuta v 80% etanolu a rozpuštěna ve 100 µl TE pufru. Takto získaná bacmidová DNA (~160 kbp) byla uchovávána při 4 °C, z důvodu mechanického poškození není vhodné bacmidovou DNA mrazit.

Použitá média a roztoky:	LB^{Tet+Gen+Kan+}	živný bujón č. 2 Tetracyklin (10 µg/ml) Gentamycin (7 µg/ml) Kanamycin (50 µg/ml)
	TE pufr	10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA

4.6.5 Izolace fragmentů DNA z agarosového gelu

Pro účely izolace DNA fragmentů z agarosového gelu je vhodné použít některé komerčně dostupné soupravy. Většina těchto souprav je založena na skutečnosti, že křemičité částice váží v přítomnosti chaotropních solí DNA. V naší laboratoři je nejčastěji používána souprava NucleoSpin Extract II (Macherey Nagel).

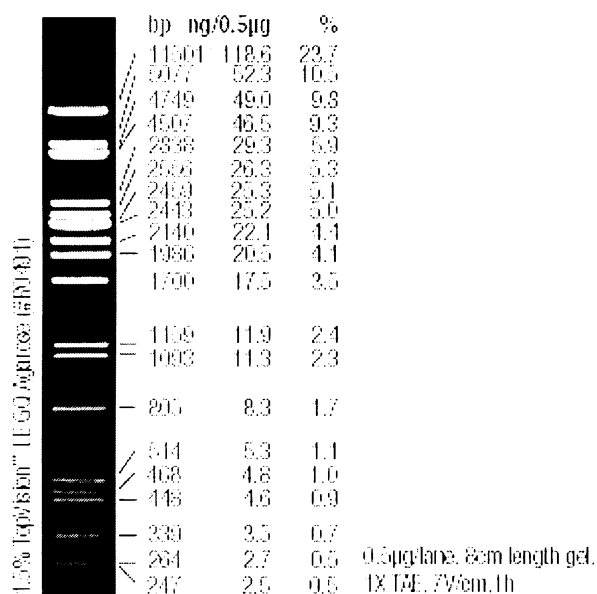
Požadovaný fragment DNA byl nejprve pomocí skalpelu vyříznut z agarosového gelu, přenesen do mikrozkušavky a zvážen. Na základě výpočtu byly do zkušavky přidány 2 díly vazebného NT pufru a vzorek byl inkubován při 55 °C až do úplného rozpuštění gelu. Homogenní roztok byl pak kvantitativně nanesen na minikolonku a centrifugován (11000 × g/1 min). Kolonka byla poté obdobným způsobem promyta 600 µl promývacího NT3 pufru. Na závěr byla po přenesení kolonky do nové mikrozkušavky DNA eluována do 30 µl elučního NE pufru centrifugací (11000 × g/1 min).

4.6.6 Separace a vizualizace molekul DNA v agarosovém gelu

Pro separaci amplifikovaných či restrikčních DNA fragmentů byla použita aparatura pro horizontální elektroforézu (Biometra). Před separací byly vzorky DNA smíchány s pufrem BFM (v poměru 5:1). K vlastní separaci byla použita 1,2% agarosa rozehrátá v 0,5× Tris-Borát-

EDTA (TBE) pufru. frakcionace probíhala při vloženém napětí 4-6 V/cm. K vizualizaci DNA molekul byl používán ethidium bromid (EtBr) v konečné koncentraci 1 mg/ml a ozáření gelu UV světlem (310 nm). Separované fragmenty DNA byly porovnávány se standardem molekulových hmotností připraveným definovaným štěpením genomové DNA fága λ enzymem *Pst* I viz Obr. 4.1. Fotodokumentace a tisk elektroforetogramů byl proveden dokumentačním zařízením ULTRA-LUM.

Použité pufrы:	BFM	130 mM EDTA-NaOH (pH 8.0) 0.12% brom-fenolová modř ve vodném roztoku 50% glycerolu
	5× TBE	54 g Tris 27.5 g kyselina boritá 20 ml 0.5 M EDTA-NaOH (pH 8.0) doplnit pomocí ddH ₂ O do 1000 ml



Obr. 4.2. DNA λ lambda. Ukázka rozložení jednotlivých DNA fragmentů vzniklých štěpením genomové DNA fága λ restriční endonukleasou *Pst* I při separaci v 1,5% agarose při vloženém napětí 7V/cm. (převzato z www.fermentas.cz)

4.6.7 Definované štěpení DNA restričními endonukleasami

Při použití restričních enzymů je vždy vhodné řídit se pokyny výrobce, který udává základní informace jako je optimální teplota a stabilita (např. poločas aktivity při reakční teplotě). S enzymem je vždy dodáván i reakční pufr v desetinásobné koncentraci, zajišťující po zředění optimální podmínky pro maximální aktivitu daného enzymu.

Do mikrozkuhavky bylo napipetováno x µl DNA (0.1-10 µg DNA ve vodě nebo TE pufru), x µl 10× pufru pro příslušnou restriční endonukleasu a dále byla přidána ddH₂O na takový objem, aby po přidání enzymu měla reakční směs objem 10 µl. Na závěr byla přidána restriční endonukleasa (cca 1 U/µg DNA) a směs byla inkubována 2.5 h (minimálně však 1 h) při teplotě doporučené výrobcem příslušného enzymu. V případech, kde bylo nutné docílit totálního štěpení byly restriční směsi inkubovány zpravidla pře noc (tj. 9-12 h) při příslušné teplotě. Po této inkubaci byl vzorek analyzován pomocí gelové elektroforézy.

4.6.8 Defosforylace plasmidové DNA

Defosforylace probíhaly v reakční směsi (100 μ l) obsahující 50 μ l štěpené plasmidové DNA, 38 μ l ddH₂O, 10 μ l 10 \times pufru pro alkalickou fosfatasa a 2 μ l alkalické fosfatasy (CIAP, Fermentas). Směsi byly inkubovány 30 min při 37 °C, poté byly opět přidány 2 μ l alkalické fosfatasy a inkubace probíhala dalších 60 min. Alkalická fosfatasa byla inaktivována přidáním 10 μ l 10% SDS, 1 μ l 0,5 M EDTA (pH 8,0) a 1 μ l proteinasy K (10 mg/ml) a následnou inkubací 30 min při 55 °C. Na závěr, DNA byla přečištěna fenol-chloroformovou extrakcí, srážena etanolem a rozpuštěna ve sterilní ddH₂O.

4.6.9 Rekombinace DNA *in vitro* – ligace

DNA ligasa fága T4 je enzym katalyzující opravu jednovláknových zlomů v DNA. V molekulární biologii se používá ke spojování kohezních nebo i tupých konců DNA. Vlastní ligační reakce byly prováděny v objemech 30 μ l obsahující 3 μ l 10 \times ligačního pufru, 3 μ l defosforylovaného plasmidového vektoru (0,055 μ g/ μ l), 10 μ l purifikovaného PCR produktu (molární poměr inzertu k naštěpenému vektoru byl přibližně 5:1), 1 μ l T4 DNA ligasy (5 U/ μ l) a 6 μ l ddH₂O. Takto připravená reakční směs byla umístěna do kádinky s vodou (25 °C), která byla následně vložena do polystyrénové bedny a inkubována při 4 °C po dobu 9-12 h. Reakce byla zastavena denaturací enzymu při 65 °C po dobu 15 min.

4.6.10 Protokol PCR amplifikace a používané oligonukleotidy

PCR reakce byly prováděny v objemech 50 μ l obsahující 1 \times Vent DNA polymerasový pufr (20 mM Tris-HCl, pH 7,8, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mg/ml BSA a 1% Triton[®]X-100), 0,4 mM dNTP, 12,5 pmolu každého primeru, 1,5 jednotky Vent DNA polymerasy (New England BioLabs, 1 μ l roztoku DNA (100 ng/ μ l) a ddH₂O. Optimalisovaný PCR program¹: po počáteční denaturaci (2 min, 94 °C) následovalo 30 cyklů (30 s při 94 °C – 20 s při 60 °C – 45 s při 72 °C), konečná elongace 7 min při 72 °C. Pro PCR byl používán termocykler MJ Research PTC 100 či gradientový termocykler MJ Research PTC 200.

¹ Na tomto místě je nutné podotknout, že zde presentovaný PCR protokol je ryze univerzální, příslušné re-asociační teploty se liší u každého páru PCR oligonukleotidů a jsou uvedeny v příslušné kapitole popisující vlastnosti jednotlivých PCR primerů.

Tab. 4.1. Přehled používaných PCR oligonukleotidů včetně jejich charakteristiky. Šedými rámečky jsou v sekvenci oligonukleotidů zvýrazněna restrikční místa, název příslušného primeru vždy obsahuje název restrikčního enzymu, jehož štěpné místo je v sekvenci oligonukleotidu.

Název	Sekvence 5'→3'	Orientace	Cílová sekvence
VP1- <i>EcoRI</i>	GGAAGC ██████████ ATGGCCCCAAAAGAAAAGC	vedoucí	gen pro VP1 protein MPyV
VP1- <i>XbaI</i>	CTCGTA ██████████ TTAATTTCCAGGAAATACAGTC	reverzní	gen pro VP1 protein MPyV
tVP3- <i>SmaI</i>	CTCGTA ██████████ ACTAGTAGATCTATGCATCAGCG AGCTCAGGG	vedoucí	gen pro VP3 protein MPyV
tVP3- <i>NheI</i>	CTGGTA ██████████ TTCGAGACGCCGCTTTTTC	reverzní	gen pro VP3 protein MPyV
GFP- <i>XbaI</i>	CTCGTA ██████████ CTAGATCCGGTGGATCCCG	vedoucí	gen pro EGFP protein
GFPf- <i>EcoRV</i>	CTCGTA ██████████ ATGGTGAGCAAGGCGAGGAG	vedoucí	gen pro EGFP protein
GFPp- <i>EcoRV</i>	TACCAG ██████████ GATCCGGTGGATCCCGG	reverzní	gen pro EGFP protein
CTB- <i>BamHI</i>	GAGGGC ██████████ ATGACACCTCAAATATTACTGA TTTG	vedoucí	gen pro CTB podjednotku cholerového toxinu
CTB- <i>HindIII</i>	CTCGTA ██████████ TTAATTTGCCATACTAATTGCGGC	reverzní	gen pro CTB podjednotku cholerového toxinu
CTA- <i>SmaI</i>	CTCGTA ██████████ ATGCTCGAGGTCGACGAATTCGA TGAAAAAACCCAAAGTCTAG	vedoucí	gen pro CTA2 podjednotku cholerového toxinu
CTA- <i>NheI</i>	CTGGTA ██████████ TTATAATTCATCCTTAATTCTATT ATG	reverzní	gen pro CTA2 podjednotku cholerového toxinu

4.6.11 Purifikace PCR produktů na chromatografických kolonkách

Pro purifikaci PCR produktů bylo použito komerčně dodávané soupravy PCR Clean-up NucleoSpin Extract II (Macherey Nagel). Ke 100 µl PCR produktu bylo přidáno 200 µl NT pufru a směs byla důkladně promíchána. Poté byla směs nasazena do chromatografické NucleoSpin kolonky vložené do jímací mikrozkuřavky (2 ml) a centrifugována (11000 × g/1 min). Proteklý pufr byl odstraněn, do NucleoSpin kolonky bylo nasazeno 600 µl NT3 pufru a centrifugace byla opakována (11000 × g/1 min), následovalo vysušení kolonky centrifugací (11000 × g/2 min). Do NucleoSpin kolonky přenesené do nové sterilní mikrozkuřavky (1,5 ml) bylo nasazeno 30 µl NE pufru. Po inkubaci (5 min/25 °C) byla provedena konečná centrifugace (11000 × g/1 min). Eluovaný PCR produkt byl použit pro restrikční analýzu či tvorbu rekombinantních DNA molekul.

4.6.12 Identifikace bakteriálních klonů pomocí PCR (Gussow a Clackson, 1989)

Rekombinantní klony mohou být identifikovány například restrikčním štěpením plazmidové DNA, avšak k tomu je zapotřebí provést časově náročnou izolaci plazmidů. Alternativním způsobem je detekce DNA insertu pomocí PCR přímo z lyzátu kolonií, tím se ušetří čas spojený

s napěstováním kultur a vlastní izolací plazmidů. Nevýhodou této strategie je ovšem vysoká citlivost PCR, která je schopná zachytit i stopová množství DNA, která se nacházejí na agarové LB-plotně a pocházejí z ligační směsi. Je tudíž vhodné provést kontrolní reakci, do které se místo vzorku vezme malé množství agarového média z transformační plotny a zkrácení PCR protokolu na 25 cyklů. Další možností jak obejít tento problém je použití primerů komplementárních k sekvencím, které jsou v klonovacím vektoru na hranicích inzertu. Správný konstrukt se pak pozná podle odpovídající délky PCR produktu.

Nejprve byly připraveny standardní reakční směsi pro PCR o objemu 20 μ l na reakci, obsahující 200 μ M dNTP a 0,2 μ M každého primeru. Z plotny obsahující kolonie ampicilin rezistentních bakterií byly mikropipetou se sterilní špičkou s 1 μ l ddH₂O odebrány jednotlivé kolonie. Voda v tomto případě slouží k lepšímu uvolňování masy bakterií do PCR směsí. Poté buňky byly přeneseny do připravených PCR směsí. Následovala modifikovaná hot-start PCR, tj. před vlastní amplifikací byla provedena denaturace 5 min při 94 °C, po které bylo přidáno do zkumavek 10 μ l směsi obsahující pufr pro Vent polymerasu a 0,5 U Vent polymerasy. Vlastní PCR cyklus viz výše. Na agarosovém gelu bylo analyzováno 2,5 μ l PCR produktu na přítomnost fragmentu odpovídající velikosti.

4.6.13 Stanovení nukleotidové sekvence DNA

Klonované DNA fragmenty byly sekvenovány Sangerovou dideoxy-terminační metodou na automatickém sekvenčním analyzátoru ABI Prism 377 (Perkin Elmer, USA). Pro sekvenační reakci byly použity příslušné PCR oligonukleotidy a fluorescenčně značené dideoxy-nukleotidy. Všechny reakce DNA sekvencování byly provedeny službou v Laboratoři parazitologie PřF UK Praha.

4.7 Purifikace a charakterizace rekombinantních proteinů a pseudokapsid

4.7.1 Izolace umělých virových částic z hmyzích buněk

4.7.1.1 Příprava lyzátů infikovaných hmyzích buněk

Hmyzí buňky infikované příslušným bakulovirem byly po sklizení centrifugovány (1500 \times g/5 min), sediment buněk byl propláchnut PBS puforem a opět centrifugován (1500 \times g/5 min). Takto připravený buněčný sediment byl resuspendován v B pufru (1ml B pufru/2 \times 10⁷ buněk). Buňky byly rozrušeny sonikací (3 \times 30 s, při amplitudě 10 mikronů). Neporušené buněčné struktury byly odstraněny centrifugací (4150 \times g/5 min), supernatant s uvolněnými pseudokapsidami byl přenesen do nové zkumavky a umístěn na led. Sediment byl prohlédnut pod mikroskopem,

v případě že obsahoval stále neporušené buňky byla opakována sonikace (3 × 30 s, amplituda 10 mikronů) a centrifugace (4150 × g/5 min).

4.7.1.2 Centrifugace přes polštář sacharosy

Před vlastní ultracentrifugací v hustotních gradientech je výhodné aplikovat centrifugaci buněčných lyzátů přes polštář 10% sacharosy, čímž se zbavíme některých lehčích molekul a iontů. Do centrifugačních zkumavek byl nanesen buněčný lyzát obsahující virové pseudokapsidy v B pufru. Analyzovaný vzorek byl podvrstven 1-1,5 cm vysokou vrstvou 10% sacharosy. Centrifugační kyvety byly vyváženy B pufrům a byly centrifugovány 3 h při 35000 rpm (rotor SW41) a 4 °C. Po proběhnutí centrifugace byly sedimenty resuspendovány v B pufru a důkladně homogenizovány v sonikací.

Použitý roztok:	B pufr	10 mM Tris-HCl (pH 7,4) 150 mM NaCl 10 μM CaCl ₂
-----------------	---------------	---

4.7.1.3 Isopyknická centrifugace v gradientu CsCl

Do centrifugační zkumavky bylo nanášeno 7,9 g analyzovaného vzorku (resuspendovaný sediment z centrifugace přes polštář 10% sacharosy) v B pufru a smícháno s 3,79 g CsCl. Homogénát byl převrstven parafinovým olejem a kyvety byly perfektně vyváženy. Vlastní ultracentrifugace probíhala po dobu 21 h při 35000 rpm (rotor SW41) a 18 °C. Vytvořený gradient CsCl a v něm rozdělené proteiny dle vznášivé hustoty byl rozebrán peristaltickou pumpou na jednotlivé frakce po 700 μl. U jednotlivých frakcí byly změřeny refraktometrické indexy, které byly ještě podpořeny imunochemickou detekcí příslušných proteinů. Na základě těchto analýz byly frakce pospojovány do dvou frakcí obsahujících tzv. prázdné pseudokapsidy a tzv. frakce plných pseudokapsid, tj. pseudokapsid obsahujících DNA hmyzího či bakulovirového původu. Takto získané frakce byly odsoleny dialýzou proti B pufru.

4.7.1.4 Isokinetická centrifugace v gradientu sacharosy

V ultracentrifugační zkumavce byl formován lineární gradient 10-40% sacharosy. Na hladinu preformovaného gradientu bylo nasazeno 500 μl vzorku obsahující příslušné pseudokapsidy. Po dokonalém vyvážení byla aplikována ultracentrifugace po dobu 2 h při 25000 rpm (rotor SW41) a 4 °C. Gradient byl bezprostředně po skončení ultracentrifugace rozebrán peristaltickou pumpou na frakce po 700 μl, u kterých byl stanoven refraktometrický index a byla provedena imunochemická detekce příslušných proteinů. Podle těchto analýz byly frakce pospojovány a dialyzovány proti B pufru.

4.7.2 Afinitní chromatografie

K izolaci cholerového toxinu lze využít afinitní chromatografii, která využívá jeho silné interakce s D-galaktosou. Chromatografická kolonka (objem 10 ml) byla osazena spodní fritou a naplněna 2 ml imobilizované D-galaktosy (Pierce). Afinitní nosič byl zakryt horní fritou a kolonka byla promyta před vlastní separací 20 ml Vazebného pufru. Poté byl aplikován vzorek, po němž následovalo vymytí nespecificky navázaných proteinů 40 ml Vazebného pufru. Na závěr byly vázané proteiny vyplaveny 10 ml Elučního pufru a sbírány frakce po 1 ml. Jednotlivé získané frakce byly analyzovány spektrofotometricky a imunochemicky na přítomnost CTB proteinu. Na základě těchto analýz byly frakce pospojovány a dialyzovány proti 50 mM Tris-HCl (pH 8,0). Po skončení eluce byla kolonka promyta 20 ml 0,02% azidu sodného v ddH₂O a uskladněna ve 4 °C pro další použití.

Použité roztoky:	Vazebný pufr	50 mM Tris-HCl (pH 8,0)
	Eluční pufr	50 mM Tris-HCl (pH 8,0) 1 M D-galaktosa

4.7.3 Dialýza

Před vlastní dialýzou bylo dialyzační střevo (Serva) povařeno 10 min v destilované vodě. Vzorek byl přenesen pipetou do dialyzačního střeva, které bylo poté na obou stranách uzavřeno svorkami. V případě purifikace polyomavirových pseudokapsid probíhala dialýza proti B pufru, zatímco v případě cholerového toxinu proti 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) přes noc (9-12 h) při 4 °C za stálého míchání. Virové pseudokapsidy byly po proběhnutí dialýzy zahuštěny centrifugací přes polštář sacharosy. Při purifikaci cholerového toxinu byly vzorky zahuštěny přímo v dialyzačním střevě za použití polyethylenglykolu ($M_r = 20000$).

4.7.4 Imunodot-blot

Proteinové lyzáty byly přímo bez jakékoliv úpravy naneseny mikropipetou na suchou nitroceluloseovou membránu, rozpětí nanášky na jednu skrvnu 1-3 μ l proteinového roztoku. Po odpaření vody při laboratorní teplotě byla membrána vložena do 5% odtučněného mléka v PBS pufru za účelem saturace celé plochy membrány. Dále následovala imunochemická detekce viz níže.

4.7.5 SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE)

V pokusech byla používána klasická diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (Sambrook et al., 1989). Proteinové lyzáty byly před vlastní separací smíchány s 5 \times Laemmlí pufrům v poměru 4:1, povařeny (100 °C) 5 min a staženy na dno mikrozkuřavky krátkou centrifugací (7000 \times g/30 s), vzniklé supernatanty byly posléze nanášeny na gel. Vlastní separace probíhaly v aparatuře "MiniGel" (Hoefer). Zásobní roztok akrylamidu obsahoval 29 % akrylamidu a 1 % N,N'-metylenbisakrylamidu. Vlastní separace probíhala v homogenních gelech

v přítomnosti SDS (5/12%, tj. 5% horní zaostřovací gel a 12% dolní separační gel při vloženém napětí zpočátku 8V/cm, po zkoncentrování vzorků na hranici dolního separačního gelu bylo aplikováno napětí 10V/cm.

Použité roztoky a složení gelů:	5× Laemmli pufr	250 mM Tris-HCl (pH 6,8) 50% glycerol 10% SDS 0,05% bromfenolová modř 25% β-merkaptóetanol
	Zaostřovací gel (3 ml)	2,11 ml ddH ₂ O 0,5 ml 30% akrylamidu (Serva) 0,375 ml 1 M Tris-HCl (pH 6,8) 30 μl 10% SDS 5 μl TEMED 20 μl 10% amonium persulfát
	Separací gel (10 ml)	2,12 ml ddH ₂ O 4 ml 30% akrylamidu (Serva) 3,73 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,8) 100 μl 10% SDS 10 μl TEMED 50 μl 10% amonium persulfát
	10× Elektroforetický pufr	250 mM Tris, 1,92 M glycin, 1% SDS, pH 8,3

4.7.6 Přenos proteinů na nitroceluloseovou membránu (Western blot)

Polyakrylamidový gel byl bezprostředně po proběhnutí elektroforézy inkubován 10 min v Přenosovém pufru (angl. Blotting buffer). Následně byl sestaven sendvič sestávající se z gelu a nitroceluloseové membrány (NC 45, Serva) obklopené z obou stran jednou vrstvou speciálních savých papírů Whatman a několika vrstev filtračních papírů. Takto formovaný sendvič byl vložen do aparatury (Hoefer) a bylo aplikováno napětí 100 V při konstantní intenzitě elektrického pole (250 mA) po dobu 3 h. V případě, že byla používána aparatura pro polosuchý (angl. semi-dry) přenos bylo aplikováno napětí 200 V při intenzitě elektrického pole 0,8 mA/cm² po dobu 1-2 h. Po skončení přenosu byl sendvič rozebrán a membrána s přenesenými proteiny byla krátce propláchnuta v ddH₂O a následně vložena do 5% odtučněného mléka v PBS za účelem saturace celé plochy membrány.

Použitý roztok: **Přenosový pufr** 25 mM Tris, 185 mM glycin, 20% metanol, pH 8,3

4.7.7 Imunochemická detekce proteinů

Vysycená membrána s navázanými proteiny byla inkubována 1 h s primární protilátkou v 5% odtučněném mléce v PBS roztoku. Po této inkubaci byla membrána 3× 10 min promyta v roztoku PBS za účelem odmytí nespecificky navázané primární protilátky. Následovala 30 min inkubace se sekundární protilátkou v roztoku PBS. Po odmývání nespecificky navázané sekundární protilátky (3× 10 min) byla membrána zalita roztokem Luminolu a bezprostředně přenesena do vyvolávací kazety s RTG filmem. Doba expozice se lišila dle identifikovaného proteinu od 5 s až po 20 min. Po expozici byl film vložen do roztoku Vyvojky, po objevení se

proužků, resp. skvrn byl přendán do Ustalujícího roztoku. Na závěr byl film usušen a převeden do elektronické podoby ve skenovacím zařízení.

Použité roztoky:	PBS	8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na ₂ HPO ₄ , 0,24 g KH ₂ PO ₄ , doplnit ddH ₂ O do 1000 ml, upravit pH na 7,4
	Luminol	A. 18 ml ddH ₂ O, 2 ml Tris-HCl (pH 8,5), 200 µl Luminol a 88 µl kumarová kyselina B. 18 ml ddH ₂ O, 2 ml Tris-HCl (pH 8,5), 20 µl H ₂ O ₂ Složky A a B byly smíchány bezprostředně před aplikací na membránu

4.7.8 Stanovení koncentrace proteinů dle Bradfordové

Metoda je založena na interakci barvy Coomassie Brilliant Blue s bazickými a aromatickými aminokyselinami v proteinech. Pro kalibraci byly používány roztoky BSA (hovězí sérový albumin) o koncentracích 0,2 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,8 mg/ml a 1 mg/ml.

K 990 µl Bradfordové roztoku bylo přidáno 10 µl proteinové vzorku, směs byla promíchána a inkubována 5 min při laboratorní teplotě. Dále byla změřena optická denzita při 595 nm proti slepému vzorku (SPEKOL 11) a koncentrace proteinů byly odečteny z kalibrační křivky.

Postup přípravy Bradfordové roztoku: V 50 ml 96% etanolu bylo rozpuštěno 100 mg Coomassie Brilliant Blue (9-12 h), poté bylo přidáno 100 ml H₃PO₄ a doplněno ddH₂O do 1000 ml. Výsledný roztok byl zfiltrován přes 0,22 µm filtr (Milipore).

4.8 *Escherichia coli* – kultivace, transformace a uchovávání

4.8.1 Kultivace *E. coli*

Kultivace bakterií probíhala na pevném LB (Luria-Bertani) médiu (živný agar č. 2) v termostatu při 37 °C po dobu 12-16 h, nebo v tekutém LB médiu (živný bujón č. 2) v termostatané třepačce při 37 °C po dobu 12-16 h. U bakteriálních klonů, které nesly plasmid s rezistencí na antibiotika, byla do média vždy přidána odpovídající množství příslušných antibiotik.

Použité média:	LB médium (živný bujón č. 2)	10 g trypton (angl. bacto-pepton) 5 g kvasničný extrakt (angl. bacto-yeast) 10 g NaCl doplnit dH ₂ O do 1000 ml, (121 °C, 15 min)
	LB-agar (živný agar č. 2)	10 g trypton (angl. bacto-pepton) 5 g kvasničný extrakt (angl. bacto-yeast) 10 g NaCl 15 g agaru pro bakteriální kultivace doplnit dH ₂ O do 1000 ml, (121 °C, 15 min)

4.8.2 Vnesení plasmidové DNA do bakteriálních buněk

Vstup izolované molekuly DNA do bakteriální buňky se nazývá **transformace**. K tomuto procesu může docházet spontánně u recipientních buněk ve stavu kompetence, což je schopnost transportovat DNA z média do buňky. Pro účinné vnesení DNA do bakteriálních buněk existuje

několik metod. V naší laboratoři používáme metody transformace pomocí teplotního šoku či elektroporace.

4.8.2.1 Příprava kompetentních buněk pomocí CaCl_2

Pro uspokojivý výsledek je třeba zajistit dostatečnou aeraci a odběr z počátku exponenciální fáze růstu (při nárůstu kultury nad O.D.560 ~ 0,4 dochází ke snížení účinnosti transformace). Poté jsou buňky vystaveny působení CaCl_2 za snížené teploty. Takto připravené kompetentní buňky jsou schopné přijmout plasmidovou DNA.

Nejprve bylo připraveno inokulum *E. coli* ve 20 ml LB média inkubací 9-12 h za třepání (150 rpm) při 37 °C. Množství 1 ml získaného inokula bylo použito pro zaočkování 100 ml předehřátého (37 °C) LB média v 1 l baňce, kultura byla poté inkubována za intenzivního třepání při 37 °C do O.D.590 ~ 0,375. Baňka s narostlou kulturou byla ponořena do ledové tříště a inkubována 10 min. Od této doby probíhaly všechny pracovní kroky na ledu. Buňky jsou rovněž citlivé na mechanické poškození – nelze je tedy intenzivně třepat, míchat a odstřeďovat při vysokých otáčkách. Po odstředění (1500 × g/10 min) při 4 °C byly buňky opatrně resuspendovány v 50 ml vychlazeného roztoku 100 mM CaCl_2 (pH 8,0), asepticky přeneseny do vychlazených, sterilních kyvet a inkubovány 20 min na ledu. Následovala centrifugace (1500 × g/10 min) při 4 °C, získané pelety byly resuspendovány ve směsi 1,75 ml ledového roztoku 100 mM CaCl_2 (pH 8,0) a 0,75 ml glycerolu. Suspenze buněk byla rozdělena po 100 µl do sterilních mikrozkmavek. Buňky, které nebyly použity přímo k transformaci, lze přímo zmrazit v tekutém dusíku a uchovávat při -70 °C po několik měsíců.

Použitá média a roztoky: **LB médium** 10 g trypton (angl. bacto-pepton)
 5 g kvasničný extrakt (angl. bacto-yeast)
 10 g NaCl
 doplnit dH₂O do 1000 ml, (121 °C, 15 min)
 100 mM CaCl_2 (pH 8,0)

4.8.2.2 Pracovní postup transformace *E. coli* DH5α buněk teplotním šokem

Ke 200 µl kompetentních buněk *E. coli* bylo přidáno 5 µl ligační směsi, obsah mikrozkmavek byl promíchán překlopením a vložen do ledu na 30-60 min. Inkubací 2 min při 42 °C byl proveden tepelný šok, buňky poté byly zchlazeny 30 s na ledu. Po přidání 800 µl LB média bez selekčního antibiotika byly mikrozkmavky inkubovány za občasného protřepání 1 h při 37 °C. Po centrifugaci (5000 × g/ 15 s) bylo odsáto 800 µl supernatantu. Sediment se zbytkem média byl promíchán pipetou a 100 až 200 µl bylo vyseto na agarovou plotnu s LB médiem s ampicilinem (50 µg/ml). Plotny byly inkubovány víčkem dolů při 37 °C po dobu 12-16 h, respektive do doby, než byly viditelné kolonie. Narostlé rekombinantní kolonie byly individuálně odebrány sterilním párátkem a inokulovány do 5 ml LB^{Amp⁺} média s ampicilinem. Po inkubaci 9-12 h při 37 °C za stálého třepání byla z narostlé bakteriální kultury izolována plasmidová DNA.

Použitá média a roztoky:	LB médium	10 g trypton (angl. bacto-pepton) 5 g kvasničný extrakt (angl. bacto-yeast) 10 g NaCl doplnit dH ₂ O do 1000 ml, (121 °C, 15 min)
	LB-agar	10 g trypton (angl. bacto-pepton) 5 g kvasničný extrakt (angl. bacto-yeast) 10 g NaCl 15 g agaru pro bakteriální kultivace doplnit dH ₂ O do 1000 ml, (121 °C, 15 min)
	LB^{Amp+}	LB médium s ampicilinem (50 µg/ml)

4.8.2.3 Příprava kompetentních buněk *E. coli* DH10 Bac pro transformaci teplotním šokem

Bakterie kmene *E. coli* DH10 Bac byly zaočkovány do 5 ml LB^{Tet+Kan+} a inkubovány za stálého třepání (150 rpm) 9-12 h při 37 °C. Poté byly 4 ml narostlého inokula převedeny do 400 ml LB^{Tet+Kan+} a následně kultivovány za stálého třepání při 37 °C, dokud kultura nedosáhla O.D.₆₀₀ hodnoty 0,4. Bakteriální masa byla sedimentována centrifugací (4150 × g/10 min) při 4 °C, sediment buněk byl 2× promyt 10 ml vychlazeného (4 °C) 50 mM CaCl₂, při druhém promývání byly buňky ponechány 30 min na ledu. Po poslední centrifugaci (4150 × g/10 min) byly buňky resuspendovány ve 2 ml vychlazeného roztoku 50 mM CaCl₂ s 20% glycerolem. Na závěr byly buňky rozděleny po 400 µl do předchlazených mikrozkušavek a uchovávány dlouhodobě při -75 °C.

4.8.2.4 Transformace *E. coli* DH10 Bac metodou teplotního šoku

Před vlastním procesem transformace byly buňky inkubovány 2 h na ledu. V 15 ml zkumavce s kulatým dnem bylo smícháno 200 µl kompetentních buněk a 10 µl příslušného donorového plasmidu, směs byly inkubovány 30 min na ledu. Poté byla směs vystavena teplotnímu šoku (42 °C/45 s), po kterém následovalo bezprostřední zchlazení směsi 2 min na ledu. K buňkám byl přidán 1 ml SOC média a buňky byly inkubovány 2-3 h při 37 °C za stálého třepání (150 rpm). Po centrifugaci (9000 × g/ 15 s) bylo odsáto 800 µl supernatantu. Sediment se zbytkem média byl promíchán pipetou a 100 až 200 µl bylo vyseto na agarovou plotnu s LB^{Tet+Kan+Gen+} médiem a obsahující analog laktosy IPTG a chromogenní substrát β-galaktosidasy X-gal. Plotny byly inkubovány víčkem dolů při 37 °C po dobu 48 h, respektive do doby, než byly viditelné kolonie. Narostlé bílé (rekombinantní) kolonie byly individuálně odebrány sterilním párátkem a inokulovány na čerstvou plotnu s LB^{Tet+Kan+Gen+} médiem obsahující IPTG a X-gal. Po inkubaci 24 h při 37 °C byly bakteriální izoláty s bílým fenotypem kontrolovány na přítomnost transgenu pomocí PCR detekce.

Použitá média a roztoky:	LB^{Tet+Kan+} médium	10 g trypton (angl. bacto-pepton) 5 g kvasničný extrakt (angl. bacto-yeast) 10 g NaCl doplnit dH ₂ O do 1000 ml, (121 °C, 15 min) tetracyklin (10 µg/ml) kanamycin (50 µg/ml)
--------------------------	-------------------------------------	---

LB^{Tet+Kan+Gen+} agar	10 g trypton (angl. bacto-pepton) 5 g kvasničný extrakt (angl. bacto-yeast) 10 g NaCl přidat 15 g agaru pro bakteriální kultivace doplnit dH ₂ O do 1000 ml, (121 °C, 15 min) tetracyklin (10 µg/ml) kanamycin (50 µg/ml) gentamycin (7 µg/ml)
SOC médium	20 g trypton (angl. bacto-pepton) 5 g kvasničný extrakt (angl. bacto-yeast) 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM glukosa (roztoky MgCl ₂ a MgSO ₄ byly sterilizovány samostatně a k médiu byly přidány bezprostředně až před vlastním použitím)
IPTG	0,1 M isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
X-Gal	20 mg 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid / 1 ml N,N-dimethylformamid

4.8.2.5 Příprava kompetentních buněk pro elektroporaci

Bakterie byly zaočkovány do 10 ml TPN média a kultivovány ve třepačce 12-16 h při 37 °C. Nárůst bakteriální kultury byl ověřován spektrofotometricky stanovením O.D.₅₆₀. Bakteriální suspenze byla naředěna TPN médiem tak, aby výsledná O.D.₅₆₀ v 500 ml TPN činila 0,1. Bakteriální kultura byla dále kultivována aerobně a byla sledována O.D.₅₆₀ až do hodnoty 0,5-0,7. Suspenze byla centrifugována (4150 × g/10 min), pelet buněk byl resuspendován v 500 ml vychlazené (4 °C) demineralizované H₂O a opět centrifugována (4150 × g/10 min). Pelet buněk byl opět resuspendován ve 250 ml vychlazené (4 °C) demineralizované H₂O a opět centrifugován (4150 × g/10 min). Na závěr byl sediment buněk resuspendován ve 20 ml vychlazeného (4 °C) 10% glycerolu, suspenze byla centrifugována (4150 × g/10 min). Sediment buněk byl opět resuspendován v 10 ml vychlazeného (4 °C) 10% glycerolu a centrifugován (4150 × g/10 min). Finální pelet buněk byl resuspendován v 1 ml vychlazeného (4 °C) 10% glycerolu a suspenze byla rozdělena po 100 µl objemech do mikrozkušavek, bezprostředně zamrazena v tekutém dusíku a dlouhodobě uchovávána při -75 °C.

Použité roztoky a média:	TPN médium	20 g trypton (angl. bacto-pepton) 5 g kvasničný extrakt (angl. bacto-yeast) 10 g NaCl doplnit dH ₂ O do 1000 ml, (121 °C, 15 min)
	10% glycerol	

4.8.2.6 Transformace *E. coli* pomocí elektroporace

Kompetentní buňky byly pozvolna (~20 min) rozmrazeny na ledu. K 50 µl kompetentních buněk byly přidány 2 µl plasmidové DNA a směs byla opatrně promíchána. Směs byla převedena do elektroporačních kyvet vychlazených na ledu. Elektroporační kyveta se směsí buněk a plas-

midu byla vložena do elektroporátoru (nastavení hodnot: 25 μ F, 2,5 kV, 200 Ω) a byl aplikován puls (4-5 ms). Bezprostředně po aplikaci pulsu byl k buňkám přidán 1 ml SOC média, suspenze byla převedena do sterilních baněk a aerobně kultivována 1 h při 37 °C ve třepačce. Poté byly bakterie sedimentovány centrifugací (11000 \times g/20 s), vysety na LB-agarovou plotnu s příslušným antibiotikem a kultivovány 12-16 h při 37 °C.

4.8.3 Dlouhodobé skladování bakteriálních *E. coli* buněk

Bakterie byly kultivovány aerobně v tekutém LB médiu s příslušnými antibiotiky 9-12 h při 37 °C. Z bakteriální kultury bylo odebráno 400 μ l, ke kterým bylo bezprostředně přidáno 400 μ l 40% glycerolu. Směs byla promíchána a následně zamrazena v tekutém dusíku a dlouhodobě skladována při -75 °C.

4.9 Bakulovirový expresní systém

V naší laboratoři je v současné době využíván bakulovirový expresní systém Bac-to-Bac expression system komerčně dodávaný firmou Invitrogen.

4.9.1 Pasážování hmyzích buněk

Konfluentně narostlé hmyzí buňky linie Sf9 byly staženy škrabátkem z kultivační misky či láhve a převedeny do sterilní 50 ml zkumavky. K buňkám bylo přidáno TNM-FH médium s 10% FCS tak, aby poměr buněčné suspenze a čerstvého média byl 1:3. Buňky byly řádně re-suspendovány (několikrát protaženy skleněnou pipetou) a rozděleny po 1/4 objemech na nové sterilní kultivační misky. Misky byly přeneseny do termostatu (28 °C) a kultivovány 4-5 dnů do další pasáže.

4.9.2 Infekce hmyzích buněk rekombinantním bakulovirem

Před infekcí byly buňky pasážovány do bezsérového TNM-FH média tak, aby byly po přichycení na povrch misek 50% konfluentní. Po přichycení buněk (~30 min) bylo médium z misek odsáto a bylo aplikováno bakulovirové inokulum (10 pfu/buňka). Následně byly buňky za mírného kolébání inkubovány 1 h při laboratorní teplotě, poté bylo k buňkám přidáno TNM-FH médium s 10% FCS. Infikované buňky byly kultivovány 48-72 h (28 °C) za účelem produkce rekombinantních proteinů, doba kultivace buněk je rozdílná pro různé proteiny v nich produko-
vaných. Buňky byly seškrábány a převedy do 50 ml zkumavky a sedimentovány centrifugací (1750 \times g/5 min), sediment buněk byl promyt roztokem PBS pro odstranění sérových proteinů. Finální sediment hmyzích buněk byl uskladněn v -20 °C pro další následné purifikační preparace.

4.9.3 Plaková analýza

Hmyzí buňky byly pasážovány v bezsérovém TNM-FH médiu do kultivačních misek (\varnothing 6 cm) tak, aby byly 30-40% konfluentní. Po přichycení buněk bylo médium odsáto, bylo přidáno 0,5 ml bakulovirového inokula v různém ředění (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} a 10^{-7}) a buňky byly inkubovány 1 h ($22\text{ }^{\circ}\text{C}$) za stálého kolébání. Poté bylo inokulum odsáto a buňky byly převrstveny 4 ml sterilní Sea Plaque agarosy (Sigma) v TNM-FH médiu s 10% FCS a antibiotiky. Po ztuhnutí agarosy byly buňky inkubovány 6-8 dní ($28\text{ }^{\circ}\text{C}$), následně byly vyvinuté plaky označeny pod lupou. Takto vybrané plaky byly vypíchnuty sterilní špičkou a přeneseny na misku s hmyzími buňkami, kde po 4 dnech bylo odsáto médium s uvolněnými bakulovirovými viriony a posloužilo jako inokulum pro další plakové analýzy. Tento postup byl opakován do té doby, než bylo získáno inokulum obsahující požadovaný rekombinantní bakulovirus.

4.9.4 Transfekce hmyzích buněk

Hmyzí buňky byly pasážovány do misek (\varnothing 6 cm), po přichycení buněk (~ 30 min) bylo odsáto médium a byly přidány 2 ml čerstvého TNM-FH média s 10% FCS. Paralelně byla připravena transfekční směs obsahující 10 μl bacmidové DNA, 950 μl HEBS pufru a 50 μl 2,5 M CaCl_2 , tato směs byla promíchána a inkubována 30 min při laboratorní teplotě. Po inkubaci byla transfekční směs opatrně po kapkách přidána k buňkám, které byly poté inkubovány 4 h při $28\text{ }^{\circ}\text{C}$. Následně bylo médium z buněk odsáto, buňky byly opláchnuty 5 ml TNM-FH hmyzího média s 10% FCS a nakonec k nim bylo přidáno 5 ml TNM-FH s 10% FCS. Po 4-6 dnech inkubace ($28\text{ }^{\circ}\text{C}$) bylo médium z buněk odsáto a použito jako inokulum pro další infekce či plakové analýzy. Sediment buněk byl imunochemicky kontrolován na přítomnost rekombinantních proteinů.

4.9.5 Fixace hmyzích buněk pro účely imunofluorescenční mikroskopie

Hmyzí buňky byly nasazeny na mikroskopická sklíčka ve 24-jamkové destičce a infikovány příslušným rekombinantním bakulovirem. Po 48 h byl z buněk odsáto médium, a buňky byly opláchnuty roztokem PBS. Následně byly buňky fixovány směsí methanol-aceton (1:1) po dobu 5 min. Po odsátí fixační směsi byly buňky ponechány při laboratorní teplotě důkladně vyschnout od metanolu acetonu. Fixované buňky byly vysyceny roztokem 0,25% želatiny a 0,25% BSA v roztoku PBS. Po vysycení buněk následovalo nepřímé značení pro imunofluorescenci.

4.9.6 Schématický postup purifikace polyomavirových pseudokapsid z hmyzích buněk

Hmyzí buňky infikované rekombinantním bakulovirem nesoucí gen pro hlavní strukturální protein VP1, resp. geny pro hlavní strukturální protein VP1 a fúzní gen pro chimerický protein EGFP-tVP3 byly 72 h po infekci sklizeny a přeneseny do 50 ml zkumavek. Po sedimentaci ($1500 \times g/10$ min) byl pelet buněk promyt roztokem PBS a resuspendován v B pufru. Suspenze buněk v B pufru byla sonikována (3×30 s, amplituda 10 mikronů), poté byly uvolněné proteiny odseparovány od buněčných struktur centrifugací ($4150 \times g/10$ min, 4°C). Supernatant byl dále centrifugován přes polštář 10% sacharosy, sediment proteinů a pseudokapsid byl resuspendován v B pufru sonikací (3×30 s). Suspenze byla následně ultracentrifugována v gradientu CsCl (35000 rpm SW41/20 h), poté byl hustotní gradient rozebrán po frakcích o objemu 800 μl . U každé frakce byl změřen refraktometrický index a byla provedena imunochemická detekce na přítomnost daných proteinů. Na základě těchto analýz byly jednotlivé frakce pospojovány do dvou výsledných frakcí, první obsahující tzv. prázdné pseudokapsidy a druhá obsahující tzv. plné pseudokapsidy (tj. takové nanočástice, které obsahují DNA bakulovirového či hmyzího původu). Tyto frakce byly dialyzovány proti B pufru po dobu 9-12 h, poté byly frakce zahuštěny centrifugací přes polštář 10% sacharosy, výsledný sediment byl resuspendován v B pufru.

Pro účely dokonalé purifikace polyomavirových nanočástic byly příslušné frakce pseudokapsid dále podrobeny ultracentrifugací v gradientu 10-40% sacharosy (25000 rpm SW41/2 h), gradient byl rozebrán na frakce po 700 μl . Jednotlivé frakce byly charakterizovány refraktometricky a imunochemicky. Na základě těchto analýz byly frakce zpětně pospojovány a dialyzovány proti B pufru po dobu 9-12 h. Suspenze pseudokapsid byla na závěr zahuštěna centrifugací přes polštář 10% sacharosy. Finální sediment byl rozplaven v B pufru a dále biochemicky a imunologicky charakterizován.

4.10 Nepřímá imunofluorescence

K fixovaným a vysyceným buňkám byla přidána primární protilátka ředěná v roztoku 0,25% želatiny a 0,25% BSA v roztoku PBS, buňky byly inkubovány 1 h v primární protilátce při laboratorní teplotě za mírného kývání. Poté byla primární protilátka odsáta a nespecificky navázaná protilátka byla odmyta $3 \times$ po 10 min v roztoku PBS. K buňkám byla dále přidána sekundární protilátka (ředěná v PBS), buňky byly inkubovány 30 min v sekundární protilátce za mírného kývání. Protilátka byla odsáta a buňky byly promyty 3×10 min roztokem PBS. Na závěr bylo sklíčko namontováno do kapky 50% glycerolu s DAPI a pozorováno pod fluorescenčním mikroskopem (Olympus BX60).

4.11 Imunologické analýzy a přístupy

4.11.1 Imunizační schéma

Chimerické polyomavirové částice byly intranasálně aplikovány myším kmene Balb/c v množství 50 µg/dávka. Po 14. dnech byly podána myším druhá dávka ve stejném množství rovněž intranasálně. Po 28. dnech od první imunizace byly myši usmrceny a z vypreparovaných slezin byly purifikovány T buňky. V získaných sérech byly stanovovány specifické protilátky proti VP1, resp. EGFP proteinu pomocí ELISA analýz.

4.11.2 Příprava myeloidních dendritických buněk

Z usmrcených myší (kmeny Balb/c a B6) byly preparovány stehenní kosti, které byly zbaveny kloubních hlavic. Ze zbylé části kostí byla odebrána kostní dřev propláchnutím kostní dutiny komplexním médiem RPMI-1640 s 10% FCS a 4% rGM-CSF. Vyplavená kostní dřev byla šetrně homogenizována a sedimentována (1250 × g/8 min). Buněčný sediment byl resuspendován v RPMI-1640 médiu s 10% FCS a buňky byly kultivovány po dobu 5 dnů (37 °C/ 5% CO₂).

Použité médium a růstový faktor:	RPMI-1640 (Sigma)	
	10% FCS (Sigma)	
	10 mM HEPES	N-[2-hydroxyetyl]-piperazin-N'-[2-etansulfonová kyselina] (Sigma)
	4% rGM-CSF	Tento faktor stimulující růst granulocytů a monocytů je rekombinantní protein (14 kDa) produkovaný v <i>E. coli</i> , byl používán v konečné koncentraci 4% (v/v).

4.11.3 Pseudoinfekce dendritických buněk a měření fenotypových znaků jejich aktivace

Myeloidní dendritické buňky narostlé *in vitro* v přítomnosti 4% GM-CSF (5. den) byly nasazeny do 24-jamkové destičky (1×10⁶ buněk/jamka) v 1 ml bezsérovém RPMI-1640 médiu s 4% GM-CSF. Po částečném přisednutí buněk (~3 h) bylo 800 µl média opatrně odsáto. Následně bylo přidáno 10 µl suspenze polyomavirových pseudokapsid v bezsérovém RPMI-14 médiu v příslušném množství (10³ až 10⁷ nanočástic/buňka) a buňky byly inkubovány po dobu 1 h (37 °C/5% CO₂). Po této inkubaci bylo přidáno opět 800 µl RPMI-1640 média s 10 % FCS a 4% GM-CSF a buňky byly dále inkubovány 24, resp. 48 h (37 °C/5% CO₂). Po této době byly buňky staženy z jamek, převedeny do zkumavek a sedimentovány (1250 × g/8 min). V supernatantu byl imunochemicky detekován pomocí ELISA testu cytokin IL-12, zatímco sediment buněk byl promyt v roztoku PBS. Pomocí fluorescenčně značených protilátek byly značeny povrchové molekuly MHCgp II, CD80 a CD86, pro detekci mrtvých buněk byl použit propidium jodid (25 µg/ml), s nímž byly buňky inkubovány 20 min. Buňky byly opět promyty v roztoku PBS, na

závěr resuspendovány ve FACS pufru a analyzovány průtokovou cytometrií (LSRII Benton Dickinson).

4.11.4 Stanovení proliferace T buněk a jejich produkce IL-2 a INF- γ

4.11.4.1 Příprava antigen prezentujících buněk

Myeloidní dendritické buňky narostlé *in vitro* v přítomnosti 4% GM-CSF (5. den) byly nasazeny do 24-jamkové destičky ($1,5 \times 10^6$ buněk/jamka) v 1 ml bezsérového RPMI-1640 média s 4% GM-CSF. Po částečném přisednutí buněk (~3 h) bylo 800 μ l média opatrně odsáto. Následně bylo přidáno 5 μ l suspenze polyomavirových pseudokapsid v bezsérovém RPMI-14 médiu tak, aby finální koncentrace byla 5 μ g/ml a buňky byly dále inkubovány po dobu 1 h (37 °C/5% CO₂). Po této inkubaci bylo přidáno opět 800 μ l RPMI-1640 média s 10% FCS a 4% GM-CSF a buňky byly dále inkubovány 16 h (37 °C/5% CO₂). Po této inkubaci byly buňky sklizeny, sedimentovány (1250 \times g/8 min) a resuspendovány v RPMI-1640 médiu s 10% FCS ($0,3 \times 10^6$ buněk/ml).

4.11.4.2 Inhibice zpracování a prezentace antigenu

Pro studium mechanismů zpracování a prezentace polyomavirových částic v dendritických buňkách byly tyto buňky kultivovány v přítomnosti příslušných inhibitorů (chloroquine, bafilomycin A a epoxomicin). Inhibitor byl vždy přidán k buňkám 30 min před pseudoinfekcí, dále byl přítomen i celou dobu pseudoinfekce a následně 16 h inkubace. Při těchto inhibičních pokusech byly dendritické buňky na konci inkubace sklizeny, promyty v roztoku PBS a fixovány v 1% paraformaldehydu po dobu 15 min. Po fixaci byly buňky 2 \times promyty v RPMI-1640 médiu s 10% FCS, ve kterém byly na závěr resuspendovány ($0,3 \times 10^6$ buněk/ml). Takto připravené dendritické buňky prezentující příslušné antigenní peptidy byly dále použity v analýzách proliferace T buněk.

Použité inhibitory: **Bafilomycin A**
 Cathepsin S inhibitor
 Chloroquine
 Epoxomicin

4.11.4.3 Vybití CD4⁺ nebo CD8⁺ T buněk

T buňky ze směsi splenocytů byly purifikovány přes nylonovou vatu. Následně byly ze suspenze specificky odstraněny CD4⁺ nebo CD8⁺ T buňky. Suspenze všech (CD3⁺) T buněk byla vždy nezávisle označena pomocí anti-CD4 nebo anti-CD8 protilátky. Takto označené T buňky byly následně vystaveny působení potkanímu komplementu, který selektivně odstranil imunoglobuliny označené T buňky. Kontrola odstranění příslušného typu T buněk byla provedena pomocí průtokové cytometrie pomocí imunoznačení příslušné povrchové molekuly (CD4 nebo CD8).

4.11.4.4 Fluorescenční značení T lymfocytů

Pro účely proliferačních analýz byly příslušné T buňky *in vitro* fluorescenčně značení pomocí reakční soupravy CellTrace CFSE Proliferation Kit (Molecular Probes). Metoda je principiálně založena na schopnosti bezbarvé (nefluorescenční) molekuly karboxyfluorescein diacetát sukcinimidyl esteru (běžně nazývané CSFE) volně difundovat do buněk, kde jsou její acetátové skupiny štěpeny buněčnými esterasami. Produktem těchto reakcí je vznik vysoce fluorescentní molekuly – karboxyfluorescein sukcinimidyl ester. Skupiny sukcinimidyl ester následně reagují s vnitrobuněčnými aminy, čímž vznikají fluorescentní konjugáty, které jsou odolné vůči fixačním činidlům aldehydového typu. Nezareagované molekuly a vedlejší produkty jsou opět pasivně uvolněny do média, kde mohou být odstraněny následným promytím buněk. Při dělení takto obarvených buněk dochází k postupnému vyředování CSFE, na čemž je založeno stanovení míry proliferace buněk.

T buňky byly resuspendovány v předeřátém (37 °C) roztoku PBS s 0,1% BSA v konečné koncentraci 1×10^6 buněk/ml. Poté byly přidány 2 μ l zásobního roztoku 5mM CSFE/ml buněčné suspenze, tj. finální koncentrace 10 μ M CSFE. Suspenze buněk byla inkubována poté 10 min (37°C/5% CO₂) a reakce byla zastavena přidáním 5 objemů ledově vychlazeného RPMI-1640 média. Po inkubaci (5 min) byly buňky sedimentovány (1250 \times g/8 min), pelet buněk byl resuspendován v RPMI-1640 média a promytí bylo ještě 2 \times opakováno. Na závěr byly buňky resuspendovány v RPMI-1640 médiu na požadovanou koncentraci a použity v následných proliferačních analýzách. Buňky značené pomocí CSFE byly detekovány pomocí průtokové cytometrie (excitace 488 nm).

Použité roztoky a média:

- 0,1% BSA v PBS
- 5 mM CSFE
- RPMI-1640 (Sigma)

4.11.4.5 Vlastní stanovení specifické proliferace T buněk a jejich produkce IL-2 a INF- γ

Míra proliferace T buněk byla nezávisle stanovována dvěma experimentálními přístupy. První způsob je založen na inkorporaci ³H-thymidinu do dělicích se T buněk, a jeho následné detekci na scintilátoru. Druhý postup využívá poklesu intenzit fluorescenčně značených T buněk (CSFE) v průběhu kokultivace s dendritickými buňkami, stanovení se provádí na konci inkubace (po 5 dnech) pomocí průtokové cytometrie.

Do 96-jamkové mikrotitrační destičky bylo nasazeno do jednotlivých jamek 100 μ l příslušných T buněk z imunizovaných nebo imunologicky naivních myší ($1,5 \times 10^6$ buněk/ml). Poté bylo přidáno 100 μ l suspenze dendritických buněk prezentujících antigenní peptidy odvozené z polyomavirových pseudokapsid ($0,3 \times 10^6$ buněk/ml), tj. výsledný poměr T buněk vůči dendritickým buňkám byl 5:1. Směsi buněk byly dále kultivovány po dobu 5 dnů (37 °C/5% CO₂).

V případě měření proliferace T buněk mírou inkorporace ^3H -thymidinu bylo k suspenzi buněk přidáno na posledních 5 h ko-kultivace $0,5 \mu\text{Ci } ^3\text{H}$ -thymidinu. Na závěr byla stanovena míra inkorporace ^3H -thymidinu do T buněk ve scintilačním roztoku. Proliferace fluorescenčně značených T buněk poklesem intezit CSFE byla analyzována a měřena pomocí průtokové cytometrie (LSRII Benton Dickinson).

Pro účely stanovení specifické produkce IL-2 a INF- γ T buňkami byly ko-kultivovány dendritické buňky a příslušné T buňky po dobu 48 h (pro IL-2), resp. 72 h (pro INF- γ). Po této kultivaci byly buňky sedimentovány ($1250 \times g/8 \text{ min}$) a v odebraném supernatantu byly imunochemicky detekovány příslušné cytokiny analýzou ELISA.

4.11.5 Neradioaktivní *in vivo* cytotoxický test

Ze syngenních myší byly izolovány splenocyty, které byly rozděleny na dvě stejné populace. Jedna populace byla pseudoinfikována EGFP-VLPs ($5 \mu\text{g/ml}$, detailní postup viz 4.11.3), zatímco druhá populace byla ošetřena ekvivalentním množstvím roztoku PBS. Po pseudoinfekci a následné inkubaci byly obě populace splenocytů fluorescenčně značeny při různých koncentracích CSFE ($0,04 \mu\text{M}$ nebo $0,6 \mu\text{M}$). Po značení byly buňky spočítány a převedeny do čerstvého RPMI-1640 média. Poté byly obě populace buněk nazpět smíchány v ekvivalentním množství a aplikovány (10^7 buněk/dávka) do ocasní žíly myší kmene Balb/c, které byly 8 dní předtím intranasálně imunizovány EGFP-VLPs ($50 \mu\text{g/dávka}$). Paralelně byly aplikovány fluorescenčně značené splenocyty do ocasní žíly naivních myší. Po 24 h od aplikace byly myši usmrceny a v lymfatických uzlinách a slezině byl sledován poměr populací odlišně značených (CSFE) buněk pomocí průtokové cytometrie. Procentické vyjádření specifického zabití bylo spočítáno dle následujícího vzorce: $100 - ([\% \text{ EGFP-VLP ošetřených buněk}] \times [\% \text{ PBS ošetřených buněk}])^{-1} \times 100$.

4.11.6 Stanovení počtu Foxp3⁺ regulačních T buněk

In vivo byla hladina Foxp3⁺ Treg buněk měřena vždy u imunizovaných (EGFP-VLPs) a naivních (kontrolních) myší kmene Balb/c. Po 28 dnech od první imunizace (imunizační schéma viz 4.11.1) byly myši usmrceny a preparovány slezina a lymfatické uzliny. V těchto orgánech byla měřena hladina CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ buněk a porovnávána s hodnotami kontrolních myší. Stanovení bylo provedeno pomocí imunoznačení příslušných molekul a průtokové cytometrie.

4.11.7 ELISA – nepřímé provedení

Mikrotitrační 96-jamková destička byla nejprve potažena antigenem. Jako antigeny byly používány polyomavirové VP1-VLP, rEGFP protein či supernatanty po kultivaci buněk (detekce cytokinů) v různém ředění v Potahovacím pufru. Do každé jamky bylo vždy nanášeno $100 \mu\text{l}$

vzorku antigenu, který byl inkubován po dobu 9-12 h při 4 °C. Po této inkubaci byla každá jamka 4× promyta (1 min) Blokovacím pufrém. Do potažených jamek bylo v dalším kroku přidáno 100 µl příslušných IgG v Konjugátovém pufru nebo přímo sér z imunizovaných, resp. naivních myší. Následovala inkubace 1 h při 37 °C, po které byly opět jamky 4× promyty (1 min) roztokem PBS-Tween. Po tomto promytí bylo do jamek přidáno 100 µl sekundární protilátky konjugované s křenovou peroxidasou v příslušném ředění a destičky byly dále inkubovány 30 min při 37 °C. Po závěrečném promytí (4× 1 min) roztokem PBS-Tween bylo do jamek přidáno 100 µl Substrátového roztoku. Po 30 min inkubaci ve tmě při laboratorní teplotě byla měřena absorbance při 405 nm (Reader OpsysMP, Dynex).

Použité pufrы:	PBS-Tween	Pro přípravu 1 l pufru je zapotřebí 8,0 g NaCl, 2,8 g Na ₂ HPO ₄ , 0,2 g KH ₂ PO ₄ , 0,2 g NaN ₃ , 0,2 g KCl. Pomocí 6 M HCl bylo upraveno pH na hodnotu 7,4. Na závěr se přidá 0,5 ml Tweenu 20 (Fluka)
	Potahovací pufr	Pro přípravu 1 l pufru je zapotřebí 1,59 g Na ₂ CO ₃ , 2,93 g Na ₂ HCO ₃ , 0,2 g NaN ₃ . Pomocí 3 M NaOH bylo upraveno pH na hodnotu 9,6. Zásadité prostředí je důležité pro vazbu proteinů na povrch polystyrenové desky.
	Blokovací pufr	2% odtučněné mléko v PBS
	Substrátový roztok	Do 400 ml ddH ₂ O přidat 8,4 g kyseliny citrónové + 120 mg substrátu 2,2'-azino-bis-(3-etylbenzthiazoline-6-sulfonová kyselina) diamoniová sůl

4.11.8 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie byla používána k měření míry exprese vybraných molekul na povrchu dendritických buněk a intenzity proliferace T lymfocytů. Příslušný typ buněk určených k analýze byl resuspendován ve FACS pufru (10⁶ buněk/ml) a buněčná suspenze byla rozdělena po 100 µl objemech do 96-jamkové mikrotitrační destičky s kulatým dnem. Buňky byly promyty 3× 150 µl FACS pufrém (1250 × g/3 min/4 °C) a poté inkubovány s příslušnou fluorescenčně značenou protilátkou po dobu 20 min. Na závěr bylo opakováno promývání buněk 3× 150 µl FACS pufrém (1250 × g/3 min/4 °C), finální pelet buněk byl resuspendován ve 150 µl FACS pufru a suspenze byla přenesena do analytických zkumavek pro průtokovou cytometrii, ve kterých proběhlo měření na průtokovém cytometru (LSRII Benton Dickinson).

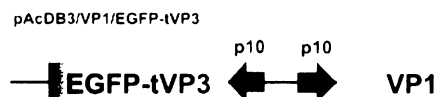
Použitý pufr:	FACS pufr	1× PBS (Sevac) 0,2% BSA (Sigma) 0,1% NaN ₃
---------------	------------------	---

Kapitola 5

VÝSLEDKY

5.1 Exprese, purifikace a charakterizace VP1 a "zelených" polyomavirových pseudokapsid

Prvním krokem mojí práce byla produkce polyomavirových částic jednak tvořených pouze hlavním strukturálním proteinem VP1 (VP1 pseudokapsid), jednak tzv. "zelených" polyomavirových částic nesoucích modelový antigen EGFP uvnitř kapsidy fúsovaný s C-koncovou doménou proteinu VP3. Částice byly následně purifikovány a detailně charakterizovány. Pro tyto účely jsem používal inokula rekombinantních bakulovirů r-Bac-VP1 (Forstová et al., 1993) a r-Bac-VP1+EGFP-tVP3 (Bouřa et al., 2005). Na obr. 5.1. je zachycena schematicky expresní kazeta pro simultánní produkci VP1 a EGFP-tVP3 vložena do genomu bakuloviru rBac-VP1+EGFP-tVP3.



Obr. 5.1. Schéma expresní kazety pro paralelní produkci hlavního strukturálního proteinu VP1 a chimerického proteinu EGFP-tVP3. Oba tyto geny byly klonovány do plasmidového vektoru pACDB3 pod silný pozdní bakulovirový promotor p10.

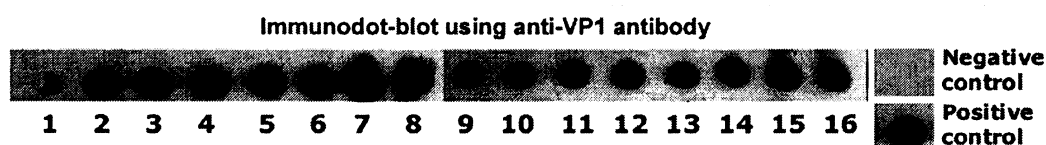
V hmyzích buňkách infikovaných rekombinantním bakulovirem nesoucím tuto expresní kazetu dochází k formování polyomavirových pseudokapsid složených z hlavního strukturálního VP1 proteinu a uvnitř každé kapsomery je zevnitř přichycen chimerický protein EGFP-tVP3 (Bouřa et al., 2005).

Hmyzí buňky (Sf9) byly nezávisle infikovány těmito inokuly, 72 h po infekci byly buňky sklizeny. Získané sedimenty infikovaných buněk byly rozrušeny sonikací a lysáty buněk obsahující příslušné virové částice byly předčištěny centrifugací přes polštář 10% sacharosy. Následně byly umělé virové částice rozděleny ultracentrifugací v CsCl. Vytvořené gradienty CsCl byly odebrány peristaltickou pumpou do dílčích frakcí po objemech ~0,7 ml, u nichž byly stanoveny refraktometrické indexy a provedena imunodekce na přítomnost VP1 proteinu viz obr. 5.2. a 5.3. Na základě těchto analýz byly dílčí frakce pospojovány do dvou výsledných frakcí. První frakce I (refraktometrické indexy 1,360-1,363) představuje suspenzi, která by měla obsahovat hlavně prázdné virové čás-

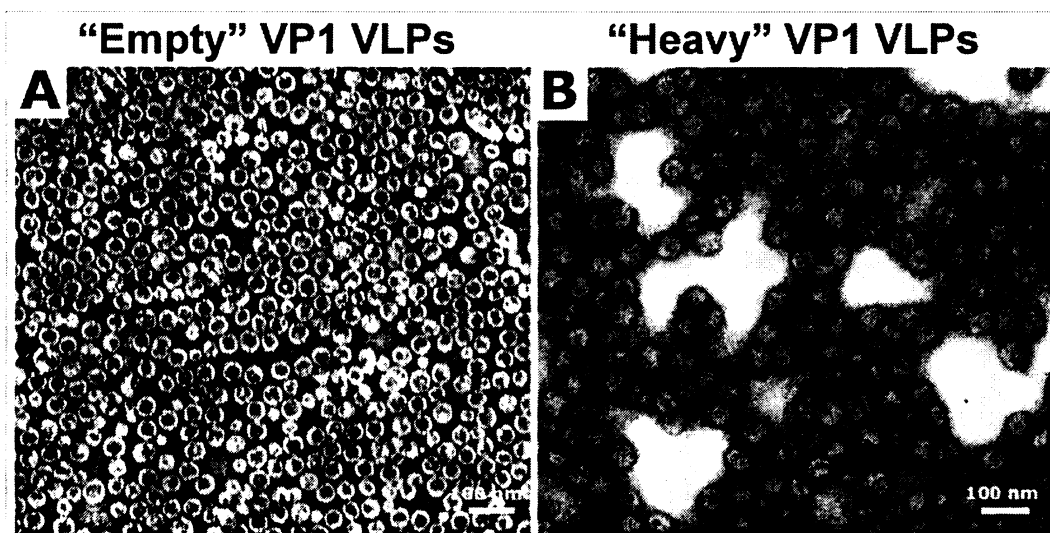
tice, které uvnitř kapsidy nenesou DNA. Druhá frakce II tzv. těžkých částic (refraktometrické indexy 1,364-1,3665) potom představuje suspenzi virových částic, které z velké části zabalily v hostitelských buňkách fragmenty DNA hmyzího či bakulovirového původu.

(A) VP1 pseudokapsidy		(B) "zelené" pseudokapsidy	
Číslo frakce	Refraktometrický index	Číslo frakce	Refraktometrický index
1	1,3750	1	1,3770
2	1,3710	2	1,3720
3	1,3680	3	1,3680
4	1,3670	4	1,3665
5	1,3660	5	1,3650
6	1,3650	6	1,3640
7	1,3640	7	1,3635
8	1,3640	8	1,3630
9	1,3630	9	1,3620
10	1,3625	10	1,3610
11	1,3620	11	1,3600
12	1,3615	12	1,3585
13	1,3610	13	1,3570
14	1,3600	14	1,3560
15	1,3580		
16	1,3560		

Obr. 5.2. Hodnoty refraktometrických indexů jednotlivých frakcí po rozebrání CsCl gradientu pro (A) VP1 virové částice a (B) chimerické VP1+EGFP-tVP3 částice. Bílými rámečky jsou označeny frakce, které představují tzv. plné virové částice (s enkapsidovanou DNA hmyzího či bakulovirového původu). Šedými rámečky jsou naopak označeny frakce, které představují tzv. prázdné virové částice.



Obr. 5.3. Ukázka imunodetekce proteinu VP1 pomocí analýzy imunodot-blot ve frakcích VP1 polyomavirových částic získaných isopykničkou ultracentrifugací v hustotním gradientu CsCl. Označení frakcí odpovídá značení na obr. 5.3. Jako negativní kontrola byl použit lysát neinfikovaných Sf9 hmyzích buněk, pozitivní kontrolou byly VP1 pseudokapsidy (T. Kalina).



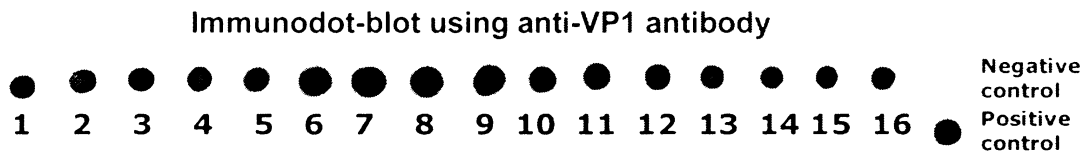
Obr. 5.4. Elektron-mikroskopické snímky umělých VP1 polyomavirových částic barvené technikou negativního barvení. (A) Frakce tzv. prázdných virových částic, (B) frakce tzv. plných VP1 pseudokapsid, které byly purifikovány pouze v hustotním gradientu CsCl. Měřítko: 100 nm.

Spojené frakce virových částic byly dále dialyzovány proti B pufru a zahuštěny centrifugací přes polštář 10% sacharosu. Přítomnost a kvalita umělých polyomavirových částic byla ověřena elektronovou mikroskopií viz obr. 5.4. Elektronová mikroskopie odha-

lila ve frakci I skutečně přítomnost prázdných polyomavirových pseudokapsid (~45 nm, 72 kapsomer). V nepatrné míře byly rovněž pozorovány menší virové částice o průměru ~20 nm a tyčinkovité útvary (angl. rod-like structures). Ve frakci II byly pozorovány téměř výlučně plné virové částice (~45 nm) viz obr. 5.4. Pro dočištění preparace vysoce purifikovaných virových částic byly získané frakce pseudokapsid dále separovány ultracentrifugací v gradientu 10-40% sacharosy. Preformované gradienty byly po centrifugaci opět rozebrány po objemech ~0,7 ml a refraktometricky a imunochemicky analyzovány viz obr. 5.5 a obr. 5.6.

(A) VP1 pseudokapsidy		(B) "zelené" pseudokapsidy	
Číslo frakce	Refraktometrický index	Číslo frakce	Refraktometrický index
1	1,393	1	1,392
2	1,391	2	1,388
3	1,388	3	1,384
4	1,387	4	1,380
5	1,385	5	1,377
6	1,382	6	1,375
7	1,379	7	1,372
8	1,376	8	1,369
9	1,373	9	1,367
10	1,370	10	1,363
11	1,367	11	1,360
12	1,364	12	1,356
13	1,360	13	1,352
14	1,354	14	1,350
15	1,351	15	1,347
16	1,348		

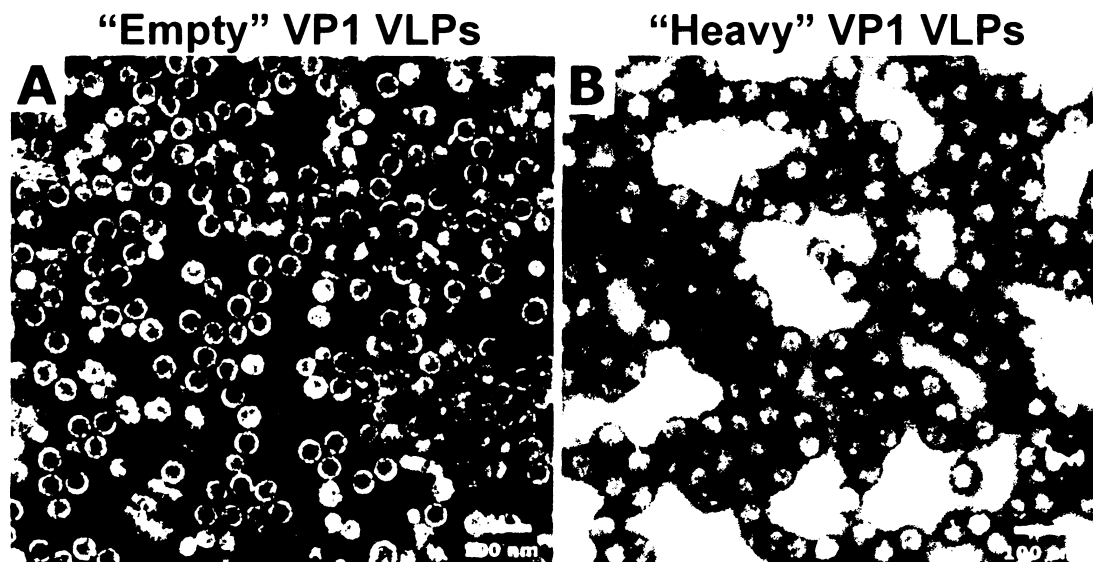
Obr. 5.5. Ukázka hodnot refraktometrických indexů jednotlivých frakcí po rozebrání gradientu sacharosy. (A) Separace frakce I (prázdné VP1 pseudokapsidy) získané po ultracentrifugaci v CsCl. **(B)** separace frakce I taktéž prázdných chimerických VP1+EGFP-tVP3 pseudokapsid. Šedými rámečky jsou označeny frakce, které byly zpětně pospojovány a dále detailně charakterizovány.



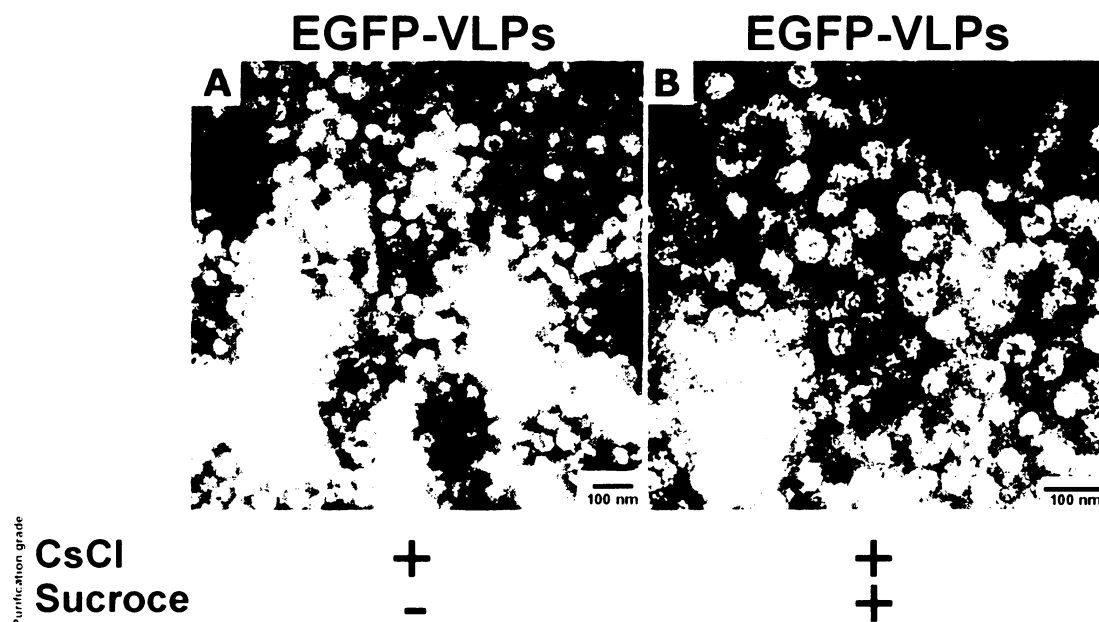
5.6. Ukázka imunodetekce proteinu VP1 pomocí analýzy imunodot-blot ve frakci prázdných VP1 polyomavirových částic získaných isokineticou ultracentrifugací v hustotním gradientu 10-40% sacharosy. Označení frakcí odpovídá značení na obr. 5.5. Z obrázu je patrné maximum intenzity signálu (frakce 6-11), na jehož základě byly frakce pospojovány. Jako negativní kontrola byl použit lysát neinfikovaných Sf9 hmyzích buněk, pozitivní kontrolou byly VP1 pseudokapsidy získané po ultracentrifugaci v CsCl gradientu.

Purifikované frakce byly po ultracentrifugaci v sacharosovém gradientu pospojovány dle refraktometrické a imunochemické analýzy a dialyzovány proti B pufru. Závěrečným krokem bylo konečné zahuštění virových částic centrifugací přes polštář 10% sacharosy. Kvalita preparovaných virových částic byla opět kontrolována elektronovou mikroskopií viz obr. 5.7 a obr.5.8. V případě chimerických virových částic nesoucích fúsní protein EGFP-tVP3 jsme pozorovali pokles geometrické pravidelnosti částic. Tento efekt je dán právě skutečností, že v sobě nesou objemný fúsní protein EGFP-tVP3, který pravděpodobně stericky brání dokonalému samouspořádání do VLP struktur. Jako důkaz přítomnosti fúsního proteinu EGFP-tVP3 uvnitř chimerických pseudokapsid jsme podrobili tyto částice imunochemickému značení pomocí anti-EGFP protilátky. Podarilo se nám označit pouze rozpadlé či jinak porušené VLP struktury, na kterých byly ob-

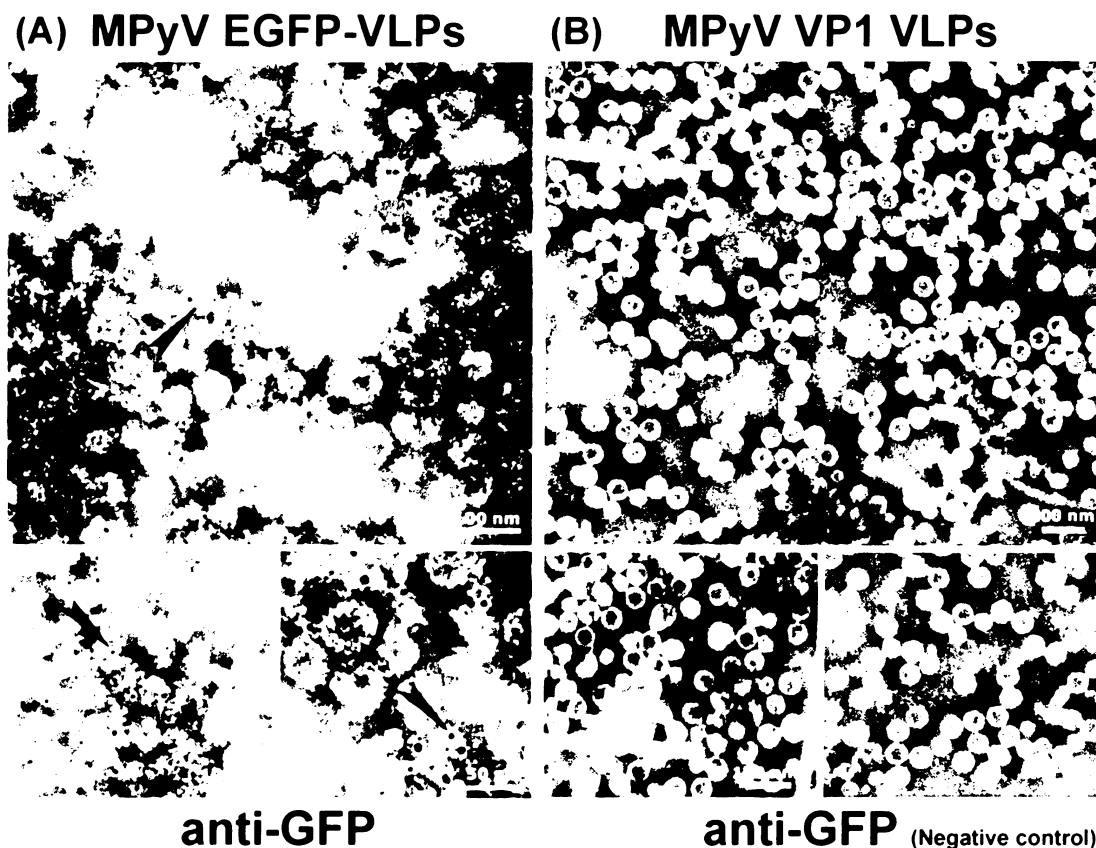
naženy epitopy EGFP a zpřístupněny pro interakci s protilátkou. Žádné značení jsme naopak nepozorovali na intaktních virových částic, které dokonale ukrývají nesený antigen (EGFP) uvnitř pseudokapsidy viz obr. 5.9.



Obr. 5.7. Elektron-mikroskopické snímky umělých VP1 polyomavirových částic barvené technikou negativního barvení. (A) Frakce tzv. prázdných virových částic, (B) frakce tzv. plných VP1 pseudokapsid, které byly purifikovány v hustotním gradientu CsCl a následně v gradientu 10-40% sacharosu. Měřitko: 100 nm.

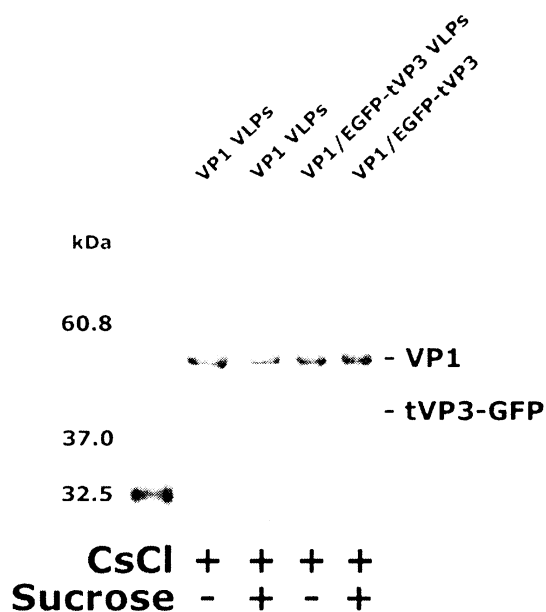


Obr. 5.8. Elektron-mikroskopické snímky chimerických "zelených" VP1+EGFP-tVP3 polyomavirových částic barvené technikou negativního barvení. (A) virové částice purifikované pouze v CsCl gradientu, (B) frakce "zelených" pseudokapsid, které byly purifikovány v hustotním gradientu CsCl a následně v gradientu 10-40% sacharosu. Ze snímku je patrné, že přítomnost fúsního proteinu EGFP-tVP3 má za následek pokles pravidelného tvaru částic, tyto virové partikule mají mírně deformovaný tvar. Měřitko: 100 nm.

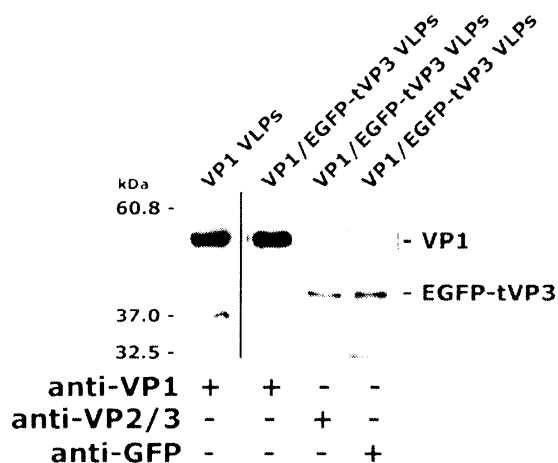


Obr. 5.9. Elektron-mikroskopické snímky imunochemicky značených struktur umělých polyomavirových částic. **(A)** Imunoznačení fúzního proteinu EGFP-tVP3 za použití králičí anti-GFP protilátky, následované detekcí králičích imunoglobulinů pomocí kozí protilátky proti králičím imunoglobulinům konjugované s koloidními částicemi zlata (5 nm). Černé šipky vyznačují místa reakce anti-GFP protilátky s danými epitopy. **(B)** Jako negativní kontrola byly použity VP1 VLPs, které nenesou EGFP protein, tudíž nedošlo k žádnému imunoznačení. Měřítka: 100 a 50 nm.

Další analýzou kvality a čistoty izolovaných pseudokapsid byla elektroforetická separace jejich proteinů. Tato analýza ukázala, že preparace virových částic jsou téměř čisté, nebyly pozorovány rozdíly v proteinových spektrech virových částic izolovaných pouze v CsCl gradientu s částicemi preparovanými následnými ultracentrifugacemi v CsCl a sacharosových gradientech viz obr. 5.10. Elektroforetické separace a následná imuno-detekce prokázala v příslušných frakcích polyomavirových částic přítomnost hlavního strukturálního proteinu VP1 (45 kDa) a fúzního proteinu EGFP-tVP3 (39 kDa) viz obr. 5.11.



Obr. 5.10. SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza proteinů VP1 a "zelených" VLP struktur. Pro srovnání byly paralelně separovány frakce virových částic, které byly purifikovány pouze v hustotním gradientu CsCl nebo i následně v hustotním gradientu 10-40% sacharosu. Gely byly barveny pomocí barvy Coomassie Brilliant Blue.



Obr. 5.11. Elektroforetická separace (SDS-PAGE) proteinů získaných frakcí VP1 a VP1+EGFP-tVP3 VLP struktur a jejich následná imunodetekce (Western-blot). Hlavní strukturální protein byl detekován za použití myší monoklonální anti-VP1 protilátky. EGFP-tVP3 protein pak myší protilátkou anti-VP2/3, resp. králičí anti-GFP protilátkou. Tyto protilátky byly následně značeny sekundárními protilátkami proti myším nebo králičím imunoglobulinům konjugovaných s křenuvou peroxidasou.

5.2 Interakce chimerických polyomavirových nanočástic s myšími imunocyty

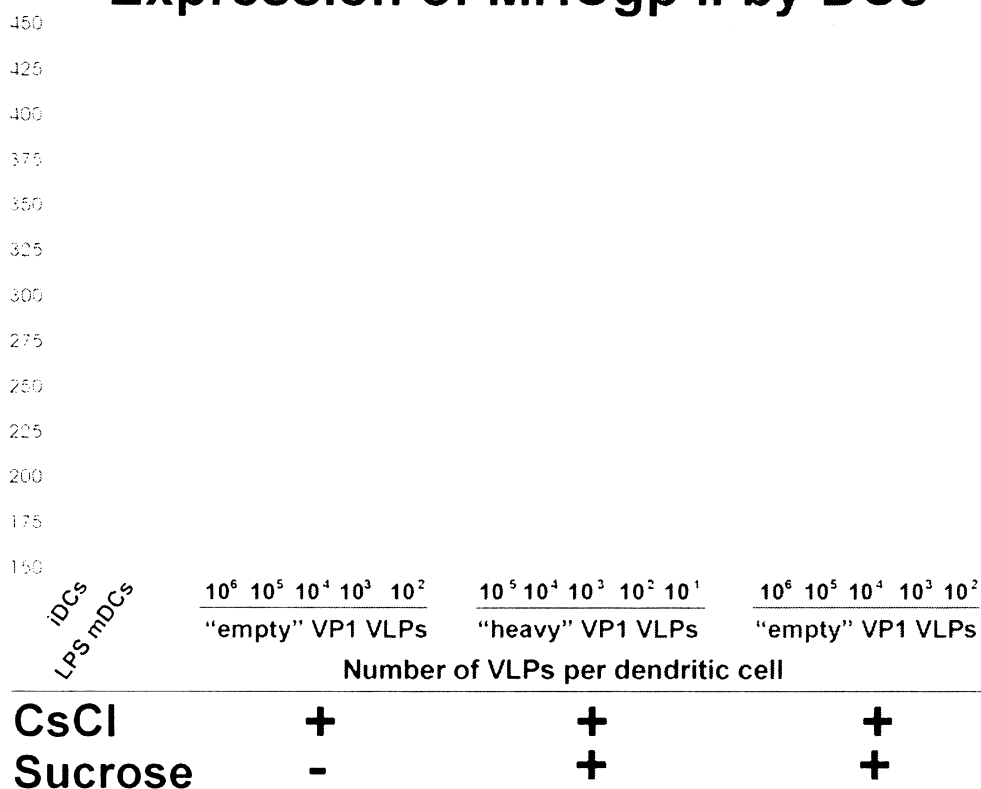
V této kapitole budou prezentovány výsledky studia interakcí polyomavirových pseudokapsid s dendritickými buňkami a charakterizace jejich imunogenních vlastností, které byly prováděny v úzké spolupráci s Mgr. J. Fričem (Laboratoř imunoregulace, PřF UK v Praze)

5.2.1 Stanovení hladiny aktivace vybraných fenotypových a funkčních znaků maturace dendritických buněk

V této části jsme sledovali míru exprese MHCgp a kostimulačních molekul CD80 a CD86 na povrchu dendritických buněk a jejich specifickou produkci cytokinu IL-12 po jejich interakci s umělými polyomavirovými částicemi. Pro tyto účely byly vždy připra-

veny myeloidní dendritické buňky z prekurzorových buněk kostní dřeně holenních kostí myši kmene Balb/c. Dendritické buňky byly *in vitro* kultivovány 5 dní v kompletním růstovém médiu v přítomnosti faktoru GM-CSF. Patý den kultivace bylo nasazeno do 24-jamkové destičky 5×10^5 dendritických buněk/jamku, ke kterým byly přidávány polyomavirové částice v různých poměrech (DC:VLP od $1:10^2$ až po $1:10^7$). Po 24 h, resp. v některých případech po 48 h byly buňky sklizeny a povrchové molekuly (MHC gp II, CD80 a CD86) byly označeny pomocí fluorescenčně značených protilátek a míra jejich povrchové exprese byla stanovena pomocí průtokové cytometrie viz obr.5.12 a obr. 5.13.

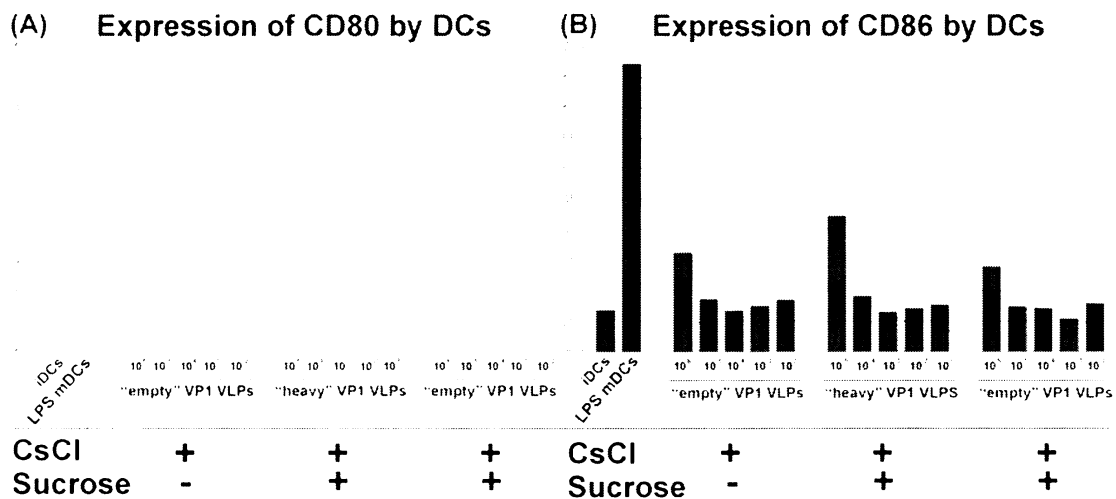
Expression of MHCgp II by DCs



Obr. 5.12. Sledování míry exprese komplexů MHCgp II na povrchu myších myeloidních dendritických buněk po jejich interakci s polyomavirovými VP1 částicemi. Zkratky: iDCs, nematurované (nijak neošetřené) dendritické buňky; LPS mDCs, dendritické buňky maturované přidavkem lipopolysacharidu; VP1 VLPs, umělé polyomavirové VP1 pseudokapsidy. Termín "empty" VP1 VLPs představuje tzv. prázdné VP1 pseudokapsidy, zatímco "heavy" VP1 VLPs označuje frakce tzv. plných (přítomnost DNA) VP1 pseudokapsid. V pokusech byly použity následující poměry VLP:DC 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 a 10^6 . V dolní části grafu je pomocí znamének (+), resp. (-) vyjádřen stupňů purifikace VP1 pseudokapsid: CsCl, izolace v gradientu CsCl; sucrose, následná purifikace v gradientu 10-40% sacharosu. Prezentované data jsou reprezentativním vzorkem pěti nezávislých experimentů.

V případě měření povrchové exprese MHCgp II jsme zaznamenali její vyšší hladiny pouze ve variantách, kde byly aplikovávány polyomavirové pseudokapsidy ve vyšších poměrech (DC:VLPs $1:10^6$). Nejvýraznější míry povrchové exprese jsme naměřili u prázdných polyomavirových částic, kde dosahovala $\sim 73\%$ úrovně ve srovnání

s dendritickými buňkami ošetřenými lipopolysacharidem. Záměrně jsme do pokusu vzali paralelně VP1 pseudokapsidy purifikované pouze v CsCl gradientu a pseudokapsidy purifikované v CsCl a následném gradientu sacharosu. Z výsledků vyplývá, že stupeň purifikace nemá zásadní vliv na aktivaci povrchové exprese MHCgp II. Dalším faktorem, který jsme ověřovali při studiu aktivace MHCgp II byla přítomnost kontaminující DNA uvnitř pseudokapsid. Simultánně jsme porovnávali schopnost aktivovat tento fenotypový marker frakcemi tzv. prázdných virových částic a frakcí tzv. plných pseudokapsid, jež nesou fragmenty DNA hmyzího či bakulovirového původu. Z naměřených dat je zřejmé, že přítomnost této DNA uvnitř kapsid nemá dramatický vliv na aktivaci povrchové exprese MHCgp II.

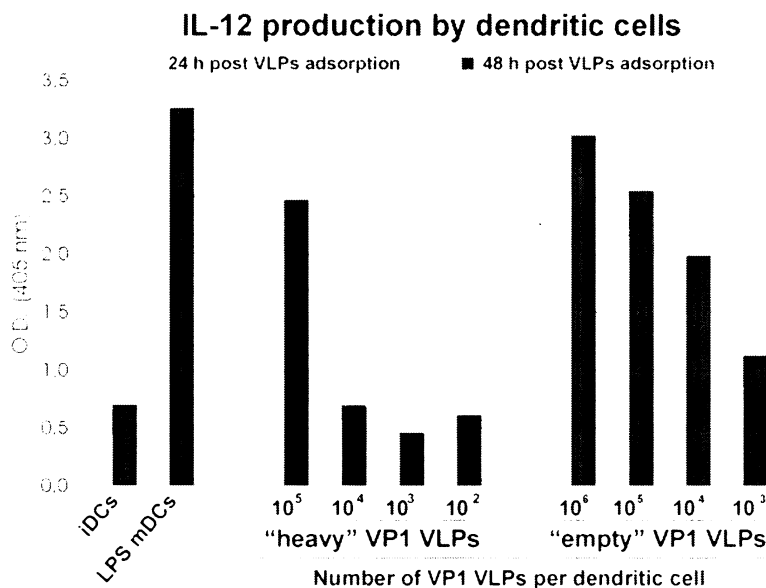


Obr. 5.13. Sledování míry exprese kostimulačních molekul CD80 (A) a CD86 (B) na povrchu myších dendritických buněk po jejich interakci s polyomavirovými částicemi. Vysvětlivky: iDCs, nematurované (nijak neošetřené) dendritické buňky; LPS mDCs, dendritické buňky maturované přidavkem lipopolysacharidu; VP1 VLPs, umělé polyomavirové VP1 pseudokapsidy. Termín "empty" VP1 VLPs představuje tzv. prázdné VP1 pseudokapsidy, zatímco "heavy" VP1 VLPs označuje frakce tzv. plných (přítomnost DNA) VP1 pseudokapsid. V pokusech byly použity následující poměry VLP:DC 10², 10³, 10⁴, 10⁵ a 10⁶. V dolní části grafu je pomocí znamének (+), resp. (-) vyjádřen stupeň purifikace VP1 pseudokapsid: CsCl, izolace v gradientu CsCl; následná purifikace v gradientu 10-40% sacharosu. Podobně jako v případě MHCgp II, i když v méně výrazné míře byly pozorovány zvýšené exprese CD80 a CD86 pouze v případě vysokých poměru VLP:DC (10⁶). Prezentované data jsou reprezentativním vzorkem pěti nezávislých experimentů.

Povrchová exprese kostimulačních molekul CD80 a CD86 vykazovala stejný trend jako v případě MHCgp II, ale ve výrazně nižší míře. Rovněž pouze vysoké poměry VLP:DC (10⁵ nebo 10⁶) vedly k zachycení zvýšené exprese těchto markerů. Toto zvýšení však dosahovalo maximálně ~33% úrovně ve srovnání s povrchovou expesí CD80 a CD86 po ošetření dendritických buněk lipopolysacharidem.

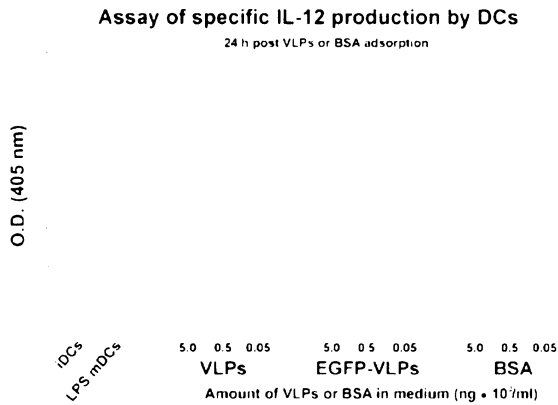
Dalším znakem, který jsme v našich analýzách sledovali byla specifická produkce cytokinu IL-12 po ošetření dendritických buněk polyomavirovými částicemi. Hladina produkovaného cytokinu IL-12 byla měřena analýzou ELISA v kulturačním médiu po

24 h a po 48 h od aplikace polyomavirových částic k dendritickým buňkám. Zaznamenali jsme výraznou produkci tohoto cytokinu po inkubaci dendritických buněk s virovými částicemi. V případě aplikace prázdných polyomavirových částic produkce cytokinu IL-12 vykazovala závislost na koncentraci VLP částic. S rostoucím poměrem VLP:DC se zvyšovala i produkce tohoto cytokinu viz obr. 5.14. Při poměru VLP:DC 10^6 dosahovala produkce cytokinu IL-12 ~94% hladiny ve srovnání s buňkami ošetřenými lipopolysacharidem. Při aplikaci tzv. plných frakcí VP1 pseudokapsid jsme takto dokonalou závislost nepozorovali. Nicméně i zde byla zaznamenána silná produkce cytokinu IL-12 při poměru VLP:DC 10^5 , která dosahovala ~74% hladiny produkce ve srovnání s lipopolysacharidem.



Obr. 5.14. Sledování produkce cytokinu IL-12 myšími dendritickými buňkami jako odpověď na přítomnost polyomavirových částic. Vysvětlivky: iDCs, nematurované (nijak neošetřené) dendritické buňky; LPS mDCs, dendritické buňky maturované přidávkou lipopolysacharidu; VP1 VLPs, umělé polyomavirové VP1 pseudokapsidy. Termín "empty" VP1 VLPs představuje tzv. prázdné VP1 pseudokapsidy, zatímco "heavy" VP1 VLPs označuje frakce tzv. plných (přítomnost DNA) VP1 pseudokapsid. V pokusech byly použity následující poměry VLP:DC 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 a 10^6 . V pokusu byla sledována analýzou ELISA množství uvolňovaného cytokinu IL-12 do média dendritickými buňkami po jejich interakci s umělými polyomavirovými částicemi v časech 24 h a 48 h po adsorpci VLP částic. Prezentované data jsou reprezentativním vzorkem čtyř nezávislých experimentů.

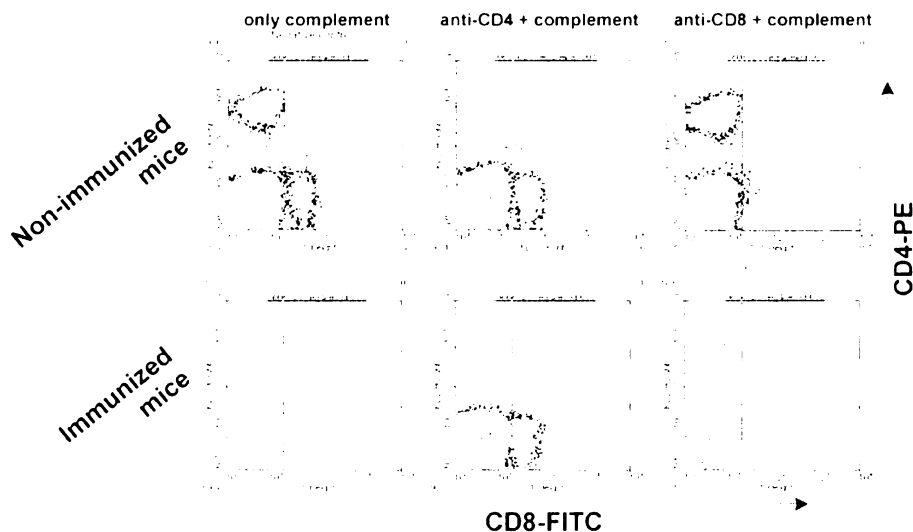
Pro ověření specifity produkce IL-12 dendritickými buňkami byl připraven pokus, kde jsme paralelně vedle polyomavirových částic přidávali k dendritickým buňkám hmotnostně ekvivalentní množství hovězího sérového albuminu (angl. bovine serum albumin, BSA) viz obr. 5.15. Z výsledků je patrné, že aplikace BSA k dendritickým buňkám nevyvolalo žádnou stimulaci produkce IL-12.



Obr. 5.15. Sledování produkce cytokinu IL-12 myšími dendritickými buňkami jako odpověď na přítomnost polyomavirových částic a hovězího sérového albuminu (BSA). Vysvětlivky: iDCs, nematurované (nijak neošetřené) denritické buňky; LPS mDCs, dendritické buňky maturované přidavkem lipopolysacharidu; VLPs, umělé polyomavirové VP1 pseudokapsidy; EGFP-VLPs, chimerické VP1-EGFP-tVP3 virové částice. V pokusech byly použity následující množství VLP, nebo BSA: 5, 0,5 a 0,05 $\mu\text{g/ml}$ média. Stanovení proběhlo 24 h po adsorpci virových částic či BSA pomocí ELISA.

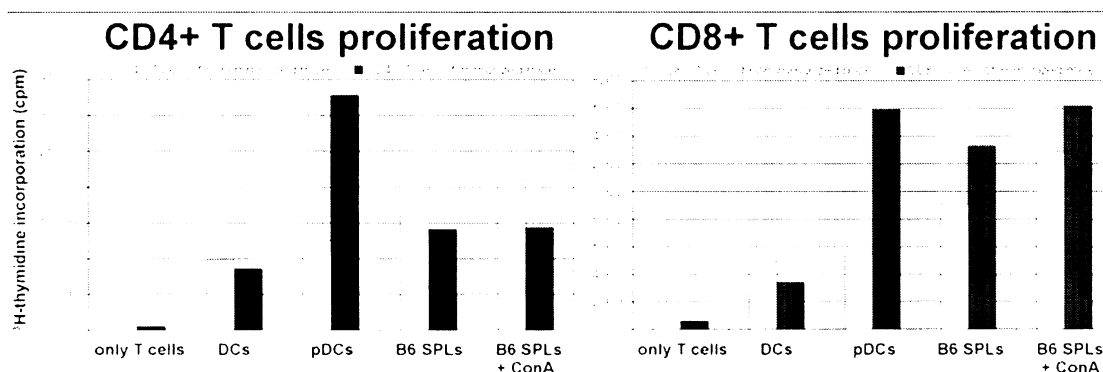
5.2.2 Chimerické polyomavirové částice indukují *ex vivo* proliferaci T lymfocytů a jejich produkci IL-2 a INF- γ

Dalším terčem našeho zájmu bylo ověřit, zda chimerické "zelené" polyomavirové částice indukují po neinvazivní intranasální aplikaci v těle myších kmene Balb/c buněčně zprostředkovanou imunitu, případně jakého typu. Pro tento účel byly myši intranasálně imunizovány (50 $\mu\text{g/dávka}$) a po 14 dnech byla provedena re-imunizace (50 $\mu\text{g/dávka}$). 28 den od první imunizace byly myši usmrceny a z jejich slezin byly izolovány T lymfocyty, které byly dále rozděleny na populace CD4⁺ a CD8⁺ T buněk viz obr. 5.16.



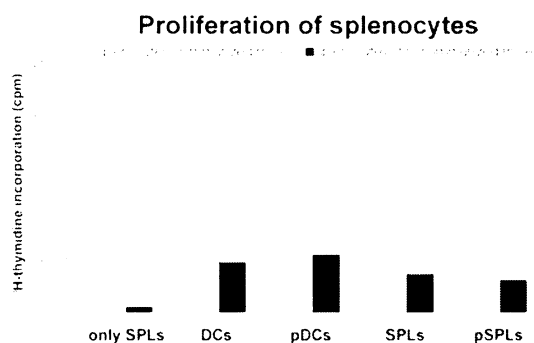
Obr. 5.16. Ukázka specifického vybití CD4⁺ nebo CD8⁺ buněk z populace T lymfocytů. T lymfocyty izolované z populace splenocytů byly značeny paralelně pomocí anti-CD4 či anti-CD8 protilátek. Takto označené buňky byly v dalším kroku vybity za pomoci potkaniho komplementu. Z prezentovaných dot-plotu je patrné, že samotný potkání komplement nijak neovlivní populaci T buněk (levý panel), na středním panelu je vidět specifické vybití CD4⁺ T buněk, na pravém panelu pak deplece CD8⁺ T buněk. Kontrola kvality přípravy čistých populací byla provedena průtokovou cytometrií, osa x značeno pomocí anti-CD8⁺ protilátky (FITC), zatímco osa y značeno pomocí anti-CD4⁺ protilátky (phycoerythrin, PE).

Takto připravené T buňky byly *in vitro* 96 h ko-kultivovány se syngenními myeloidními dendritickými buňkami, které byly ošetřeny chimerickými polyomavirovými částicemi. Na posledních 5 h bylo ke kultuře přidáno 0,5 μCi ^3H -thymidinu. Úroveň proliferace T buněk byla vyjádřena jako míra inkorporace ^3H -thymidinu do T buněk. Z výsledků je zřetelné, že v imunizovaných myších se nacházejí antigen-specifické CD4^+ i CD8^+ T buňky, které selektivně proliferují v *in vitro* analýzách viz obr. 5.17. Obecně lze říci, že CD4^+ T lymfocyty proliferovaly mnohem intenzivněji ve srovnání s CD8^+ T buňkami, což je v souladu s jejich biologickými funkcemi.



Obr. 5.17. Proliferace CD4^+ (levý graf) a CD8^+ (pravý graf) T buněk. Příslušné typy T buněk byly *in vitro* kokultivovány s dendritickými buňkami předem inkubovanými s MPyV EGFP-VLPs či alogenními splenocyty z myší kmene B6. Úroveň proliferace je vyjádřena jako míra inkorporace ^3H -thymidinu (cpm). Vysvětlivky: only T cells, proliferace samotných CD4^+ , resp. CD8^+ T buněk; DCs, nematurované (neošetřené) dendritické buňky; pDCs, dendritické buňky ošetřené "zelenými" polyomavirovými částicemi (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$); B6 SPLs, splenocyty izolované z myší kmene B6; B6 SPLs+ConA, splenocyty izolované z myší kmene B6 ošetřené konkavalinem A pro zvýšení imunitní odpovědi. Prezentované výsledky jsou reprezentativním vzorkem pěti nezávislých experimentů.

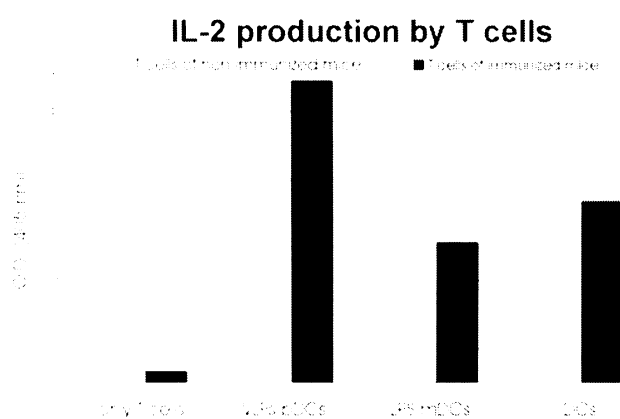
V pokusech jsme paralelně se syngenními antigen-prezentujícími dendritickými buňkami přidávali rovněž k T buňkám alogenní splenocyty z myší kmene B6, které by měly indukovat nespecificky T buňky z imunizovaných, ale i neimunizovaných myší (angl. MHCgp mismatch). V případě proliferace CD4^+ T lymfocytů tato proliferace byla dokonce silnější u neimunizovaných myší, u CD8^+ tomu bylo naopak. Kromě *in vitro* restimulace T buněk myeloidními dendritickými buňkami jsme ověřovali možnost restimulace pomocí syngenních splenocytů viz 5.18.



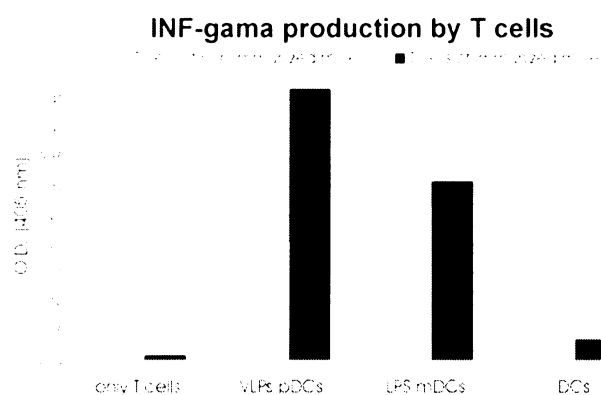
Obr. 5.18. Proliferace splenocytů restimulovaných *in vitro* syngenními myeloidními dendritickými buňkami či splenocyty. Izolované splenocyty z imunizovaných, nebo neimunizovaných myší byly *in vitro* restimulovány příslušnými variantami antigen prezentujících buněk. Úroveň proliferace je rovněž vyjádřena jako míra inkorporace ^3H -thymidinu (cpm). Vysvětlivky: only SPLs, proliferace samotných splenocytů; DCs, nematurované (neošetřené) dendritické buňky; pDCs, dendritické buňky ošetřené "zelenými" polyomavirovými částicemi (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$); SPLs, samotné neošetřené syngenní splenocyty; pSPLs, ošetřené "zelenými" polyomavirovými částicemi (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Tyto pokusy ukázaly, že je možné velice dobře indukovat proliferaci splenocytů (T buněk) nejen myeloidními dendritickými buňkami, ale i splenocyty. V populaci splenocytů se kromě myeloidních dendritických buněk vyskytují i jiné profesionální buňky prezentující antigen jako např. B buňky, jiné typy dendritických buněk aj.

Kromě vlastních proliferačních analýz jsme stanovovali indukcii specifické produkce cytokinu IL-2 a INF- γ T buňkami z imunizovaných a také neimunizovaných myší. I zde jsme prokázali specifickou produkci obou těchto cytokinů v případě T lymfocytů z imunizovaných myší viz obr. 5.19 a obr. 5.20. Vlastní experimenty byly provedeny jako proliferační analýzy s tím rozdílem, že hladina produkce IL-2 byla stanovována 48 h od počátku kokultivace v médiu pomocí ELISA. INF- γ byl stanovován opět pomocí ELISA, avšak až 72 h od začátku ko-kultivace T buněk s dendritickými buňkami. Při těchto analýzách jsme zaznamenali dvojnásobnou míru produkce jak IL-2, tak i INF- γ T buňkami z imunizovaných myší na rozdíl od naivním T lymfocytům z neimunizovaných myší.



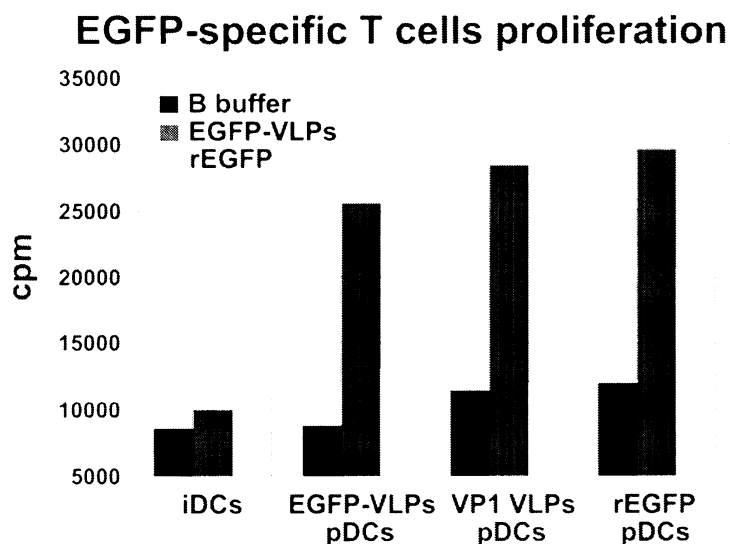
Obr. 5.19. Antigen-specifická produkce cytokinu IL-2 T buňkami v *ex vivo* pokusech. V pokusu byly kokultivovány T buňky z imunizovaných versus z neimunizovaných myší s různě ošetřenými dendritickými buňkami, po 48 h ko-kultivace byla v médiu stanovována produkce IL-2 pomocí ELISA. Vysvětlivky: only T cells, samotné T buňky; VLPs pDCs, dendritické buňky ošetřené "zelenými" polyomavirovými částicemi (5 μ g/ml); LPS mDCs, lipopolysacharidem maturované dendritické buňky; DCs, nematurované (neošetřené) dendritické buňky. Prezentované výsledky jsou reprezentativním vzorkem třech nezávislých pokusů.



Obr. 5.20. Antigen-specifická produkce INF- γ T buňkami v *ex vivo* pokusech. V pokusu byly kokultivovány T buňky z imunizovaných versus z neimunizovaných myší s různě ošetřenými dendritickými buňkami, po 72 h ko-kultivace byla v médiu stanovována produkce IL-2 pomocí ELISA. Vysvětlivky: only T cells, samotné T buňky; VLPs pDCs, dendritické buňky ošetřené "zelenými" polyomavirovými částicemi (5 μ g/ml); LPS mDCs, lipopolysacharidem maturované dendritické buňky; DCs, nematurované (neošetřené) dendritické buňky. Prezentované výsledky jsou reprezentativním vzorkem třech nezávislých pokusů.

5.2.3 Imunizace "zelenými" polyomavirovými částicemi indukuje tvorbu EGFP-specifických T lymfocytů

V tomto pokuse jsme se snažili ověřit, zda v imunizovaných myších vzniká buněčně zprostředkovaná imunita proti nesenému antigenu, tj. v našem případě proti proteinu EGFP. Pro tento úkol jsme imunizovali myši shodným protokolem (intranasální aplikace $2 \times 50 \mu\text{g/dávka}$) jako v předchozí kapitole s tím rozdílem, že jsme připravili i myši imunizované pouze rekombinantním EGFP proteinem. Po 14 dnech od re-imunizace byly opět myši usmrčeny a byly izolovány T lymfocyty z jejich slezin. Preparované T lymfocyty byly ko-kultivovány s neošetřenými (nematurovanými) dendritickými buňkami, anebo dendritickými buňkami ošetřenými "zelenými" partikulami, VP1 pseudokapsidami či jenom EGFP proteinem viz obr. 5.21. Intenzita proliferace T buněk byla rovněž počítána jako míra inkorporace ^3H -thymidinu.



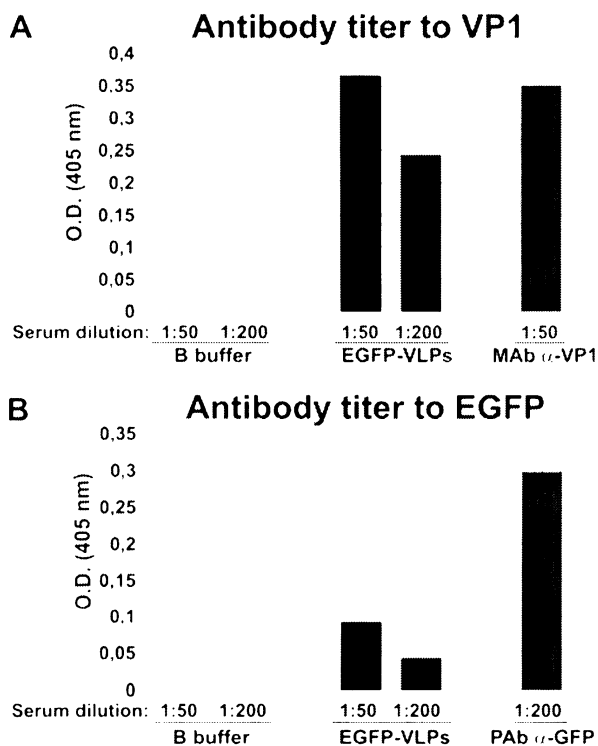
Obr. 5.21. Přítomnost EGFP-specifických T buněk v imunizovaných myších. Myši kmene Balb/c byly imunizovány (intranasální aplikace $2 \times 50 \mu\text{g/dávka}$) pomocí "zelených" polyomavirových částic (EGFP-VLPs), rekombinantního EGFP proteinu (rEGFP), kontrolní myši dostaly pouze B pufr (B buffer). Izolované T buňky z imunizovaných myši byly poté in vitro kultivovány s následujícími typy antigen-prezentujících buněk, vysvětlivky: iDCs, samotné neošetřené dendritické buňky; EGFP-VLPs pDCs, dendritické buňky ošetřené "zelenými" polyomavirovými částicemi ($5 \mu\text{g/ml}$); VP1 VLPs pDCs, dendritické buňky ošetřené VP1 polyomavirovými částicemi ($5 \mu\text{g/ml}$); rEGFP pDCs, dendritické buňky ošetřené rekombinantním EGFP proteinem ($5 \mu\text{g/ml}$). Úroveň proliferace T lymfocytů byla vyjádřena jako míra inkorporace ^3H -thymidinu. Tyto výsledky byly získány na samotném konci zpracování diplomové práce, tudíž budou ještě opakovány za účelem ověření sledovaných trendů.

Z naměřených hodnot plyne, že v imunizovaných myších (EGFP-VLPs) dochází ke generaci T lymfocytů specifických pro nesený antigen uvnitř pseudokapsid (EGFP protein). Tyto výsledky dále ukázaly silnější tvorbu EGFP-specifických T buněk v myších imunizovaných právě "zelenými" polyomavirovými částicemi než při imunizaci samotným proteinem EGFP. Tato skutečnost přímo poukazuje na imunoadjuvantní efekt antigenního nosiče v podobě umělých polyomavirových částic.

5.2.4 V imunizovaných myších nevznikají neutralizační protilátky proti přepravovanému antigenu

V našich analýzách jsme rovněž věnovali pozornost stanovení hladin neutralizačních protilátek v těle imunizovaných myší. Pomocí standardní ELISA analýzy jsme ověřovali přítomnost jak anti-VP1, tak i čistě anti-EGFP protilátek v sérech imunizovaných myší. Při těchto pokusech jsme identifikovali vysokou hladinu anti-VP1 protilátek v těle imunizovaných myší, avšak přítomnost protilátek proti nesenému antigenu uvnitř pseu-

dokapsid (anti-EGFP) nebyla zjištěna viz obr. 5.22.

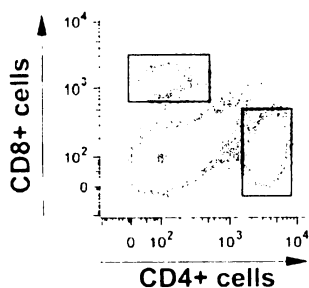


Obr. 5.22. Imunizace "zelenými" virovými částicemi indukuje vysoký titer anti-VP1 protilátek (A), avšak přítomnost anti-EGFP protilátek (B) nebyla identifikována. Pomocí standardní ELISA analýzy byly v sérech z imunizovaných (EGFP-VLPs) a kontrolních (B buffer) myší detekovány neutralizační protilátky. Jako pozitivní kontroly byly použity monoklonální anti-VP1 (MAb α -VP1 nebo polyklonální anti-GFP (PAb α -GFP) protilátky.

5.2.5 Polyomavirové částice ovlivňují hladinu CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulačních T (Treg) buněk

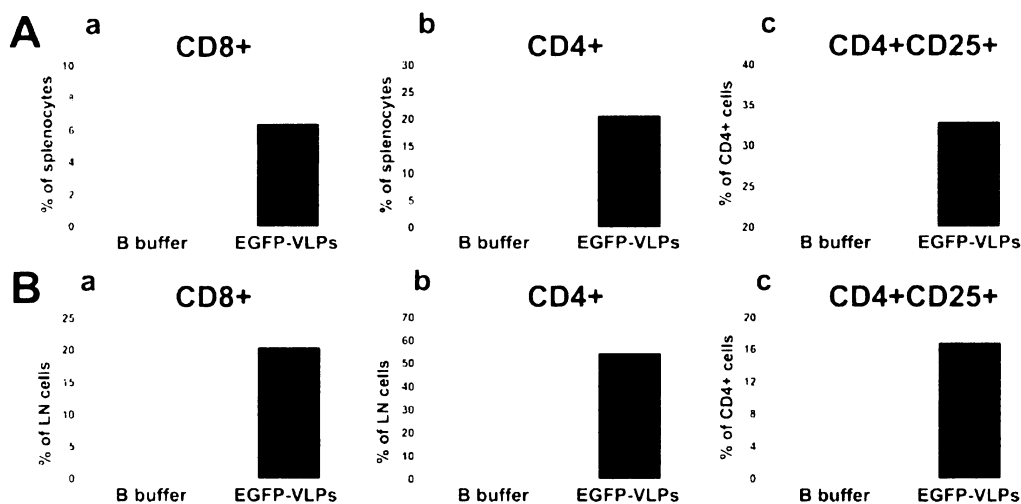
Polyomavirové částice vykazují mnohostranné efekty na jednotlivé složky imunitního systému. Proto jsme v dalších analýzách chtěli zjistit, zda polyomavirové částice nějakým způsobem neovlivňují regulační (CD4⁺CD25⁺) T buňky. Z tohoto důvodu jsme při zachování imunizačního schématu (2× intranasální aplikace 50 μ g "zelených" pseudokapsid, 28. den od první imunizace provedeny následující analýzy) analyzovali hladiny jednotlivých typů T buněk ve slezinách a lymfatických uzlinách imunizovaných myších. Příslušné typy T buněk byly selektivně barveny pomocí fluorescenčně značených protilátek a dále analyzovány průtokovou cytometrií viz obr 5.23. Naše prvotní pokusy uká-

zaly, že nedošlo k ovlivňování počtu $CD8^+$ T buněk ve slezinách imunizovaných ($6,34 \pm 0,92$ %) versus kontrolních ($6,24 \pm 0,28$ %) myší.



Obr. 5.23. Ukázka dot-plotu zaznamenaného průtokovým cytometrem při simultánním značení splenocytů pomocí anti- $CD8$ a anti- $CD4$ fluorescenčních protilátek. V označeném poli $CD4^+$ buněk byly dále identifikovány jednotlivé typy regulačních $CD4^+CD25^-$ T buněk viz obr. 5.25.

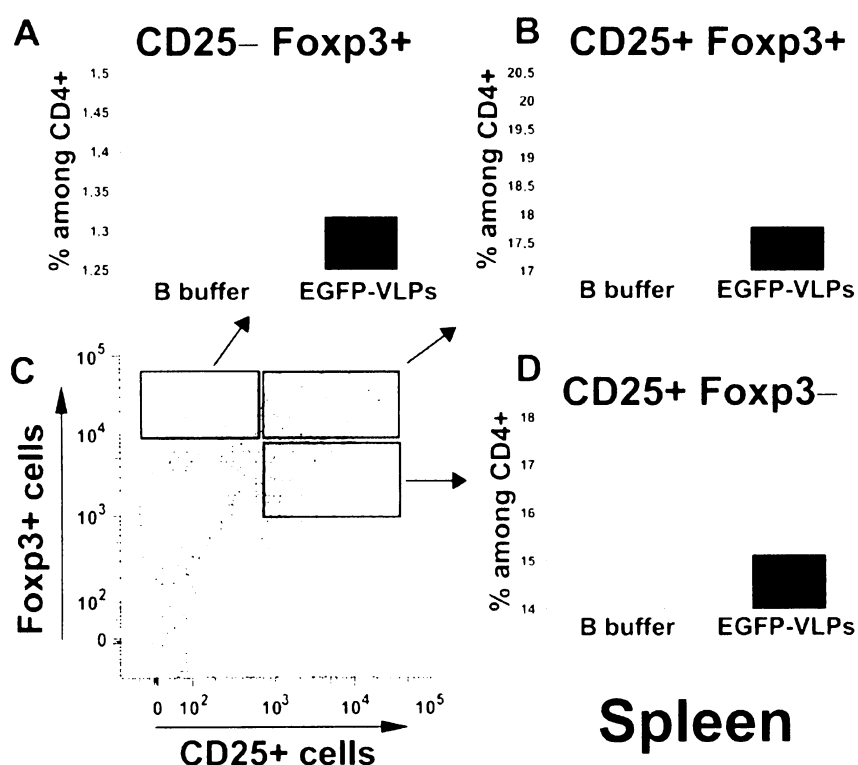
Rovněž v lymfatických uzlinách jsme nezachytili žádné rozdíly v relativním zastoupení $CD8^+$ T buněk u imunizovaných ($20,33 \pm 1,53$ %) oproti kontrolním myším ($19,36 \pm 0,81$ %) viz obr. 5.24. Ani u $CD4^+$ T buněk jsme nezaznamenali změny v jejich hladinách ve slezině ($20,58 \pm 1,72$ % u imunizovaných myší versus u kontrolních myší $19,95 \pm 1,74$ %), ani v lymfatických uzlinách ($54,2 \pm 1,9$ % u imunizovaných versus $53,99 \pm 2,53$ % u kontrolních myší) viz obr. 5.24.



Obr. 5.24. Monitorování hladin $CD8^+$ a $CD4^+$ T buněk ve slezinách (A) a lymfatických uzlinách (B) imunizovaných (EGFP-VLPs) versus kontrolních (B buffer) myší. Příslušné T buňky byly selektivně značeny pomocí fluorescenčních protilátek a analyzovány průtokovou cytometrií. V každé skupině vždy bylo pět myší ($n=5$).

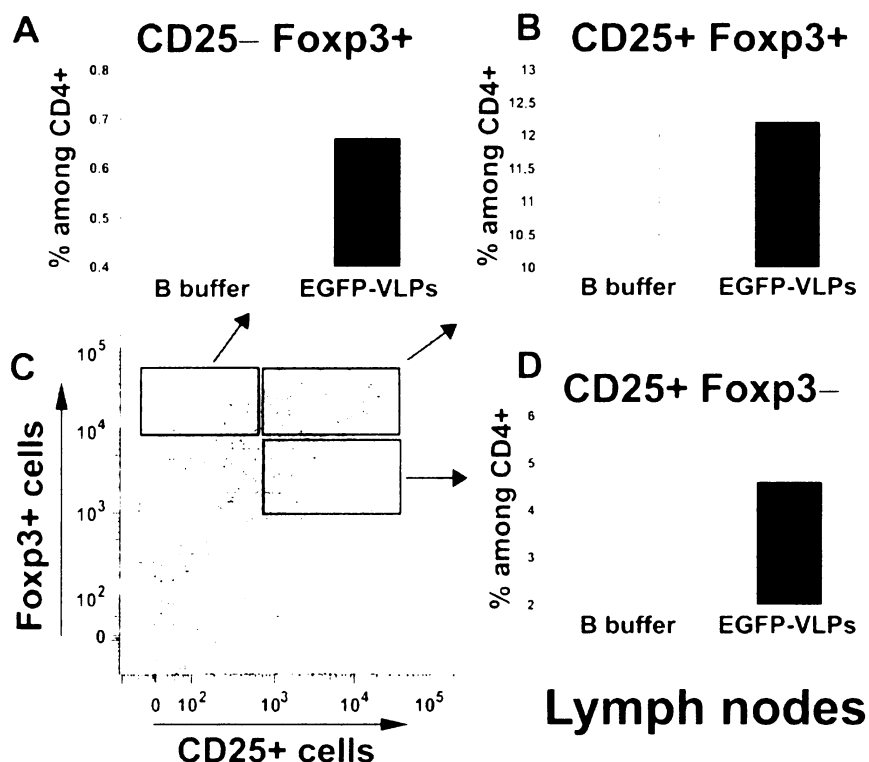
Nicméně, když jsme hlouběji analyzovali relativní zastoupení regulačních $CD4^+CD25^+$ T buněk v rámci populace $CD4^+$ T buněk identifikovali jsme jisté, byť malé disproporce. V rámci slezinných $CD4^+$ T buněk jsme zaznamenali mírné, avšak průkazné snížení hladiny regulačních $CD4^+CD25^+$ T buněk u skupiny imunizovaných myší ($32,87 \pm 2,12$ %) ve srovnání se skupinou kontrolních myší ($36,5 \pm 2,56$ %). Tento efekt však nebyl pozorován u $CD4^+CD25^+$ T buněk přítomných v lymfatických uzlinách, kde jsme naměřili jejich hladinu u obou skupin srovnatelnou ($16,8 \pm 0,73$ % u imunizovaných myší a $16,47 \pm 0,13$ % u kontrolních myší). Na základě těchto zjištění jsme začali dále pátrat,

kteřé typy regulačních T buněk především mizí po intranasální aplikaci polyomavirových částic. Expres transkripčního faktoru Foxp3 v T lymfocytech je úzce spjata s regulačními funkcemi těchto buněk. Zatímco $CD4^+CD25^+Foxp3^-$ T buňky jsou aktivované efektorové buňky, buněčné typy $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ a $CD4^+CD25^-Foxp3^+$ T lymfocytů vykazují výhradně regulační vlastnosti (Fontenot et al., 2005). Pro ověření, které výše uvedené typy $CD4^+$ T buněk ovlivňuje aplikace polyomavirových částic jsme intracelulárně značili $CD4^+$ T buňky na transkripční faktor Foxp3. Jednotlivé subtypy $CD4^+$ T buněk pak byly vytříděny pomocí průtokové cytometrie viz obr. 5.25. Tyto pokusy ukázaly, že v populaci slezinných $CD4^+$ T buněk u imunizovaných myší dochází k průkaznému snížení populace $CD25^+Foxp3^+$ ($17,8 \pm 0,24$ % u imunizovaných versus $19,7 \pm 0,29$ % u kontrolních myší). V případě $CD25^-Foxp3^+$ nebylo pozorováno statisticky průkazné snížení ($1,32 \pm 0,14$ % u imunizovaných versus $1,4 \pm 0,16$ % u kontrolních myší), a konečně u $CD25^+Foxp3^-$ byly naměřeny tyto hodnoty ($15,1 \pm 1,9$ % u imunizovaných versus $16,8 \pm 2,7$ % u kontrolních myší).



Obr. 5.25. Úbytek regulačních $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T buněk ve slezinách myší kmene Balb/c. Myši byly intranasálně imunizovány polyomavirovými částicemi (EGFP-VLPs). Kontrolní myši dostaly B pufr (B buffer). Procentické zastoupení **(A)** $CD4^+CD25^-Foxp3^+$, **(B)** $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ a **(D)** $CD4^+CD25^+Foxp3^-$ mezi $CD4^+$ splenocyty byly stanoveny 28 den od první imunizace. V každé skupině bylo vždy pět myší ($n=5$). **(C)** Reprezentativní rozdělení $CD25^+$ a $Foxp3^+$ značených $CD4^+$ splenocytů, které jsou analyzovány v grafech A, B a D. Jedná se o kombinované povrchové (anti- $CD4$ a anti- $CD25$) a vnitrobuněčné (anti- $Foxp3$) fluorescenční barvení a stanovení průtokovou cytometrií.

Obdobné analýzy byly provedeny i u buněk lymfatických uzlin. Nicméně zde opět nebyly zaznamenány žádné prokazatelné rozdíly v zastoupení jednotlivých subtypů $CD4^+$ T buněk u imunizovaných a kontrolních myši viz obr. 5.26. Konkrétní vypočítané hodnoty byly u $CD4^+CD25^-Foxp3^+$ $0,66 \pm 0,07\%$ u imunizovaných versus $0,68 \pm 0,06\%$ u kontrolních myši, pro sybtyp $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ $12,2 \pm 0,7\%$ u imunizovaných versus $12,1 \pm 0,4\%$ u kontrolních myši, a konečně pro buňky $CD4^+CD25^+Foxp3^-$ to byly hodnoty $4,6 \pm 0,17\%$ u imunizovaných versus $4,3 \pm 0,23\%$ u kontrolních myši.

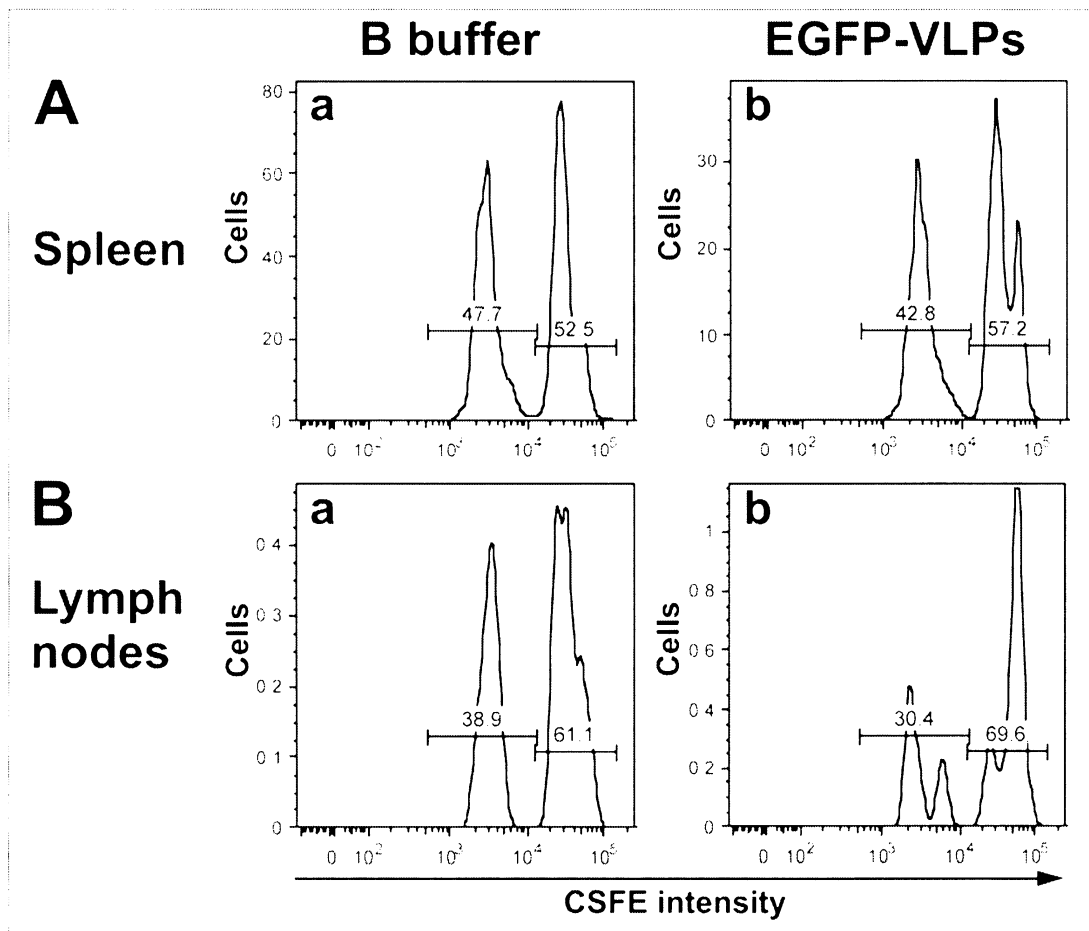


Obr. 5.26. Hladiny regulačních $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T buněk v lymfatických uzlinách myši kmene Balb/c. Myši byly intranasálně imunizovány polyomavirovými částicemi (EGFP-VLPs), kontrolní myši dostaly pouze B pufr (B buffer). Procentické zastoupení (A) $CD4^+CD25^-Foxp3^+$, (B) $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ a (D) $CD4^+CD25^+Foxp3^-$ mezi $CD4^+$ splenocyty byly stanoveny 28 den od první imunizace, v každé skupině byly vždy pět myši ($n=5$). (C) Reprezentativní rozdělení $CD25^+$ a $Foxp3^+$ značených $CD4^+$ splenocytů, které jsou analyzovány v grafech A, B a D. Jedná se o kombinované povrchové (anti- $CD4$ a anti- $CD25$) a vnitrobuněčné (anti- $Foxp3$) fluorescenční barvení a stanovení průtokovou cytometrií.

Souhrně lze konstatovat, že aplikace "zelených" polyomavirových částic vede k redukcii počtu $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T buněk ve slezinách imunizovaných myši, nikoliv však v lymfatických uzlinách. Alespoň to naznačují naše pilotní pokusy. Prozatím nevíme jakým mechanismem by mělo docházet k tomuto efektu, zda mají polyomavirové částice přímo vliv na Treg buňky, či zda se jedná o nepřímé působení.

5.2.6 Cytotoxický test *in vivo*

Mezi požadavky kladené na rekombinantní nosiče antigenů pro využití v imunoterapeutických aplikacích je generace efektorových cytotoxických buněk. V našich analýzách s chimerickými "zelenými" polyomavirovými částicemi jsme se tudíž pokoušeli ověřit přítomnost těchto buněk v tělech imunizovaných myši. Podali jsme myším intraperitoneálně 50 μg EGFP-VLP částic a po osmi dnech bylo aplikováno těmto myším do ocasní žíly 10^7 směsi (1:1) syngenních dendritických buněk diferenciálně značených CSFE. Vždy jedna část buněk byla před aplikací kromě značení (CSFE) ošetřena "zelenými" polyomavirovými částicemi (viz Materiál a metody). Po 24 hodinách byly sledovány pomocí průtokové cytometrie hladiny značených buněk ve slezinách a lymfatických uzlinách viz obr. 5.27.



Obr. 5.27. Cytotoxický test *in vivo*. Monitorování úbytku dendritických buněk ošetřených polyomavirovými částicemi v tělech imunizovaných myši (EGFP-VLPs) a kontrolních myši, které dostaly pouze B pufr (B buffer) ve Vlastní stanovení bylo vždy provedeno ve slezinách (A) a lymfatických uzlinách (B). Dendritické buňky ošetřené polyomavirovými částicemi byly značeny při nižší koncentraci CSFE ($0.04 \mu\text{M}$), zatímco referenční dendritické (neošetřené) byly značeny při vyšší koncentraci CSFE ($0.6 \mu\text{M}$). Prezentované výsledky jsou reprezentativním vzorkem třech nezávislých experimentů.

Tyto výsledky ukázaly, že určitá část dendritických buněk prezentujících peptidy odvozené od polyomavirových částic mizí i v kontrolních (neimunizovaných) myších. Tento úbytek představoval v případě detekce v lymfatických uzlinách až 36% zabití, ve slezinách to bylo 9% zabití viz tab. 5.1. Tento fenomén si prozatím neumíme vysvětlit. Domníváme se, že polyomavirové částice by mohly navozovat vyšší citlivost buněk vůči apoptotickým vlivům, avšak jedná se čistě o hypotéze, které musí být nejprve ověřeny. Dalším vysvětlením by mohla být aktivita některých složek nespecifické imunity. Vlastní specifické zabití EGFP-VLP ošetřených splenocytů ve slezinách imunizovaných myší činilo 25 %, v lymfatických uzlinách to bylo 56 % viz tab 5.1. Jinými slovy ve slezinách imunizovaných myší jsme pozorovali $\sim 2,7\times$ vyšší míru specifického zabití EGFP-VLP ošetřených splenocytů než v kontrolních myších. V lymfatických uzlinách tato míra byla pouze $\sim 1,5\times$ vyšší než v kontrolních myších.

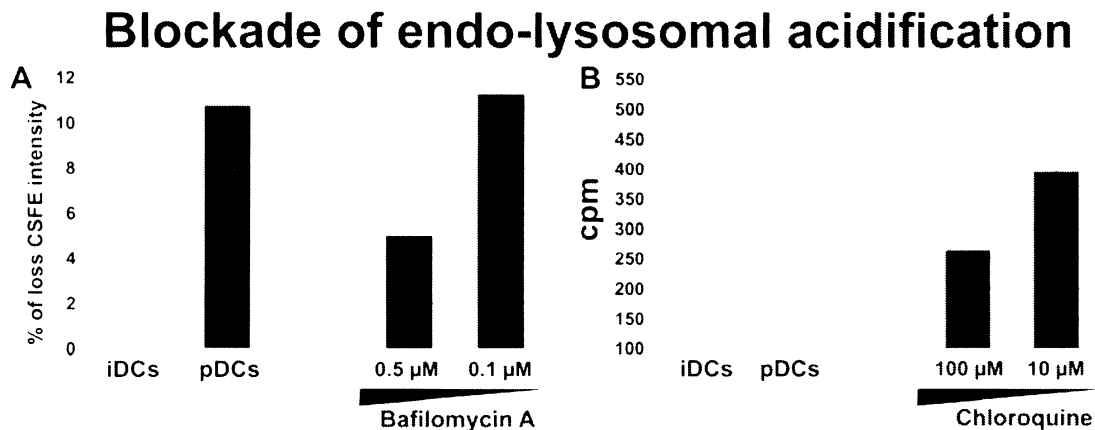
Tab. 5.1. Přehled výsledků cytotoxického *in vivo* testu. V tabulce jsou uvedeny hodnoty specifického zabití (%) ošetřených (EGFP-VLP) splenocytů v kontrolních a imunizovaných myších.

Orgán	Kontrolní myši (% zabití)	Imunizované myši (% zabití)
Slezina	9	25
Lymfatické uzliny	36	56

5.2.7 Rozplétání mechanismů zpracování a prezentace antigenních peptidů odvozených od polyomavirových nanočástic

Nedílnou součástí našeho studia interakcí polyomavirových částic s myšími imunocyty je rovněž nahlédnutí do mechanismů zpracování a prezentace antigenních peptidů odvozených právě od těchto částic v profesionálních antigen-prezentujících buňkách. Pro tyto snahy jsme využili již zavedené *ex vivo* proliferační analýzy, kde se kokultivují T lymfocyty z imunizovaných myší s dendritickými buňkami, které jim předkládají v kontextu svých MHCgp komplexů antigenní peptidy. Liebl et al. (2006) prokázali, že infekčnost myšího polyomaviru je citlivá na inhibici okyselování endo-lysosomálních kompartmentů. Proto i naše první kroky vedly právě na blokaci acidifikace endosomů za použití bafilomycinu A a chloroquinu. Při těchto pokusech jsme zaznamenali, že koncentrace 0,5 μM bafilomycin A a 100 μM chloroquine v kultivačním médiu má za následek snížení intezity proliferace CD4⁺ T lymfocytů o $\sim 75\%$ ve srovnání s variantou bez použití inhibitorů viz obr. 5.27. Nižší koncentrace bafilomycinu A (0,1 μM) již neměla žádný efekt na intezitu proliferace T buněk. V případě chloroquinu (10 μM) jsme stanovili $\sim 33\%$ inhibici při srovnání s variantou bez inhibitoru viz obr. 5.28. Z našich analýz

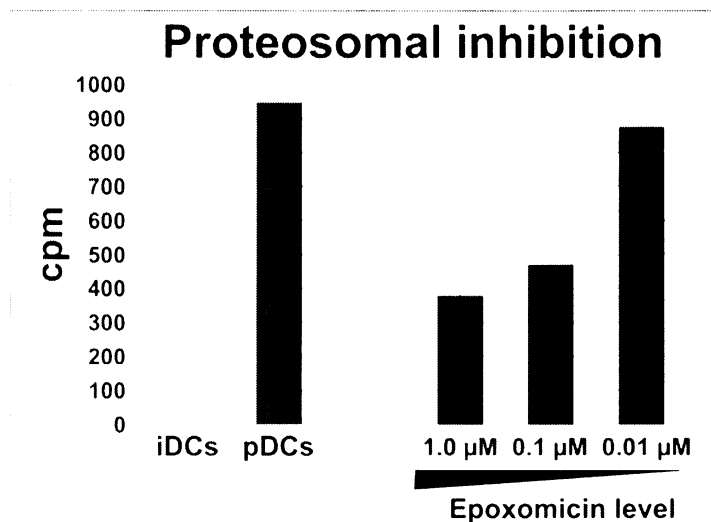
je možné konstatovat, že zpracování a prezentace antigenních peptidů odvozených od polyomavirových částic v kontextu MHCgp II jsou citlivé na inhibici endo-lysosomálního okyselování.



Obr. 5.28. Inhibice endo-lysosomální acidifikace a její vliv na proliferaci CD4⁺ T lymfocytů v *ex vivo* pokusech. (A) Použití bafilomycinu A, intenzita proliferace CD4⁺ T lymfocytů je vyjádřena jako procentické snížení intenzity CSFE značených lymfocytů. (B) Aplikace chloroquinu, intenzita proliferace T lymfocytů je vyjádřena jako míra inkorporace ³H-thymidinu (cpm). Vysvětlivky: iDCs, samotné neošetřené dendritické buňky; pDCs, dendritické buňky ošetřené "zelenými" polyomavirovými částicemi (5 μ g/ml); u jednotlivých inhibitorů byly vždy ko-kultivovány dendritické buňky ošetřené "zelenými" polyomavirovými částicemi (5 μ g/ml) a v médiu byla příslušná koncentrace inhibitoru.

Dalšími buněčnými ději, které jsme si vytypovali pro inhibiční analýzy byly cytosolická proteosomální degradace a endosomální cysteinová proteasa Cathepsin S, která není citlivá vůči změnám pH. V případě inhibice proteosomální aktivity jsme použili vysoce selektivní inhibitor proteasomu epoxomicin, který v koncentraci 1 μ M měl za následek ~80% inhibici proliferace CD4⁺ T lymfocytů v proliferační analýze. Přítomnost epoxomicinu v koncentraci 0,1 μ M působila ~65% snížení proliferační aktivity CD4⁺ T buněk, při koncentraci epoxomicinu 0,01 μ M již nebyla pozorována téměř žádná inhibice viz obr 5.29.

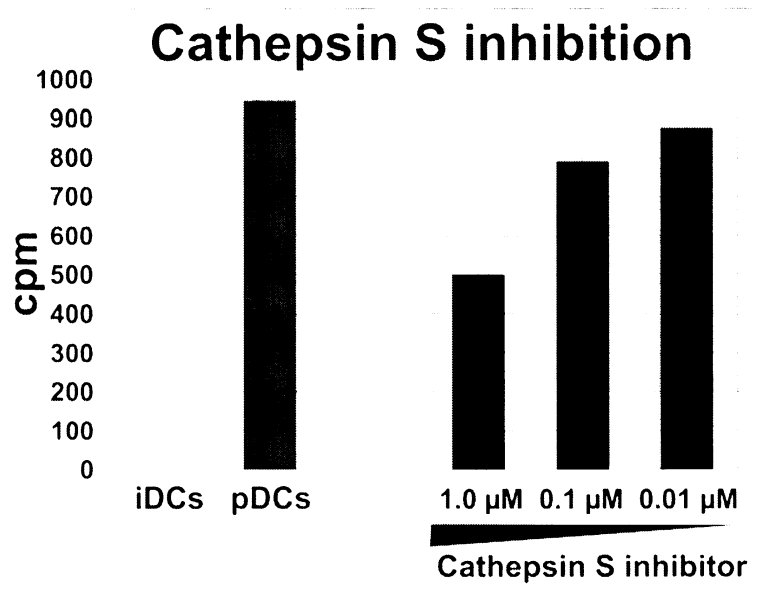
Jelikož zásobní roztoky epoxomicinu a inhibitoru Cathepsinu S jsou naředěny v DMSO, v rámci inhibičních pokusů jsme paralelně přidávali k dendritickým buňkám ekvivalentní množství čistého DMSO (negativní kontrola). Žádný efekt samotného DMSO na prezentaci dendritických buněk a proliferaci T buněk jsme nezaznamenali (*data neuvedena*).



Obr. 5.29. Inhibice proteosomální degradace a její vliv na proliferaci CD4⁺ T lymfocytů v *ex vivo* pokusech. Použití selektivního inhibitoru proteasomu epoxomicinu v koncentracích 10 μM, 0.1 μM a 0.01 μM, intenzita proliferace CD4⁺ T lymfocytu je vyjádřena jako míra inkorporace ³H-thymidinu (cpm). Vysvětlivky: iDCs, samotné neošetřené dendritické buňky; pDCs, dendritické buňky ošetřené "zelenými" polyomavirovými částicemi (5 μg/ml); u jednotlivých variant epoxomicinu byly vždy ko-kultivovány dendritické buňky ošetřené "zelenými" polyomavirovými částicemi (5 μg/ml) a médiu byla příslušná koncentrace inhibitoru.

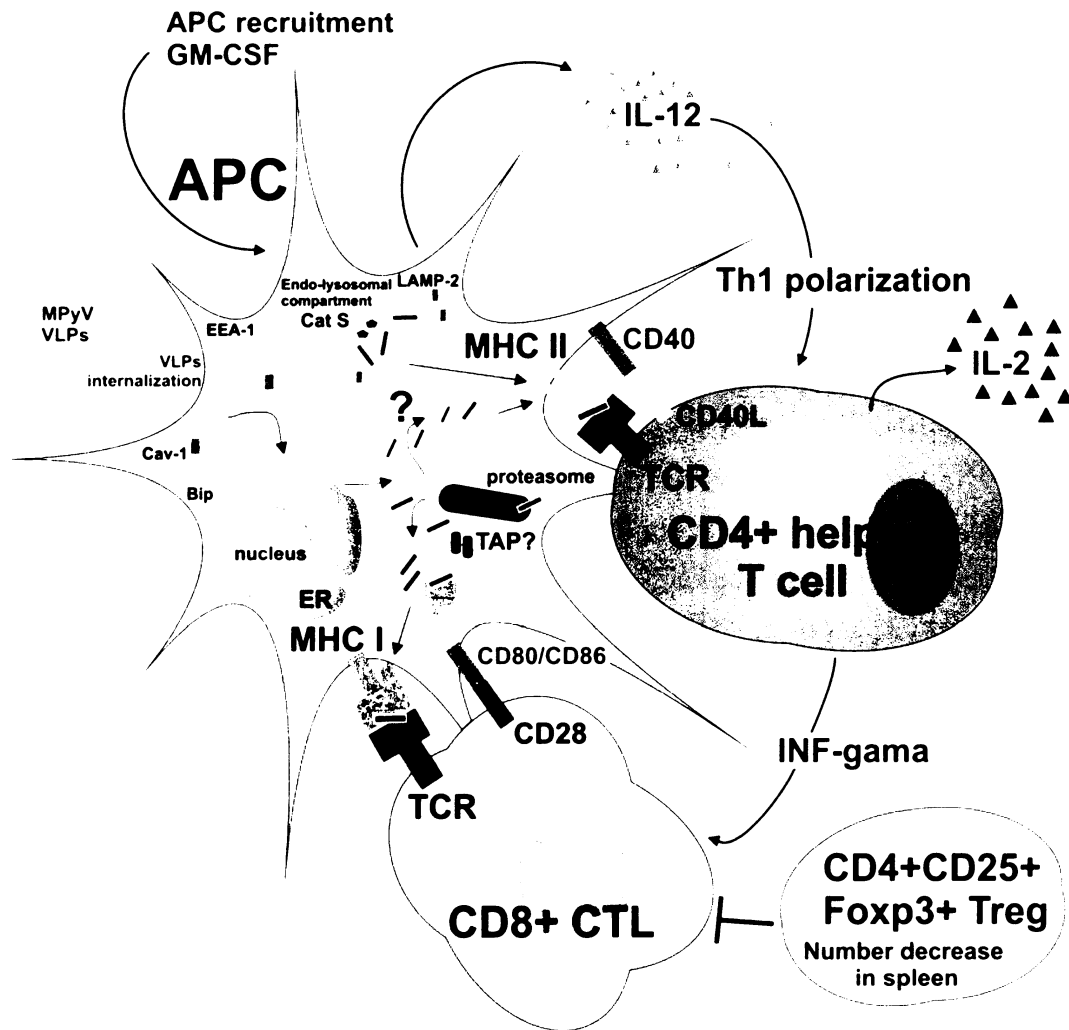
Při aplikaci inhibitoru endosomální proteasy Cathepsinu S jsme pozorovali při koncentraci 10 μM inhibitoru Cathepsinu S ~63% snížení proliferace CD4⁺ T lymfocytů. Při koncentraci 0.1 μM tomu bylo již pouze ~22% a při koncentraci 0.01 μM již nebyla pozorována žádná inhibice viz obr. 5.30.

Překvapivé je zjištění, že prezentace antigenních peptidů odvozených od polyomavirových částic je citlivé na blokování funkce proteosomální degradace. Základní model antigenní prezentace na komplexech MHCgp II je postaven na degradaci exogenních proteinů v pozdních endosomech a jejich navlečení a vyvezení v kontextu MHCgp II na povrch buňky. Na tomto místě bych rád upozornil, že tyto inhibiční pokusy byly naplánovány paralelně s proliferačními analýzami CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocytů tak, abychom získali nějaké informace o mechanismu křížové prezentaci (angl. cross-presentation) antigenních peptidů odvozených od polyomavirových částic. Bohužel však z technických důvodů se nepodařilo série proliferací CD8⁺ T buněk dokončit včas do odevzdání této práce.



Obr. 5.30. Inhibice cysteinové proteasy Cathepsinu S a její vliv na proliferaci CD4^+ T lymfocytů v *ex vivo* pokusech. Použití selektivního inhibitoru Cathepsinu S v koncentracích 10 μM , 0.1 μM a 0.01 μM , intenzita proliferace CD4^+ T lymfocytu je vyjádřena jako míra inkorporace ^3H -thymidinu (cpm). Vysvětlivky: iDCs, samotné neošetřené dendritické buňky; pDCs, dendritické buňky ošetřené "zelenými" polyomavirovými částicemi (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$); u jednotlivých variant koncentrace inhibitoru Cathepsinu S byly vždy kokultivovány dendritické buňky ošetřené "zelenými" polyomavirovými částicemi (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a v médiu byla příslušná koncentrace inhibitoru.

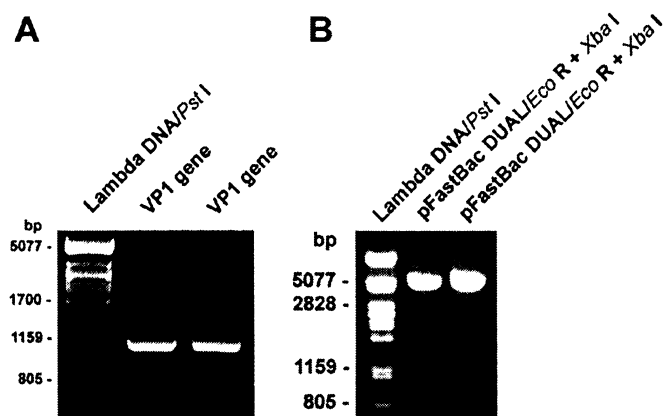
Processing and presentation of MPyV VLPs



Obr. 5.31. Souhrn dosažených poznatků při studiu interakcí umělých polyomavirových částic s myšimi imunitními buňkami. Polyomavirové částice velice ochotně vstupují do antigen prezentujících buněk (denritických buněk), kde byla prokázána jejich kolokalizace s markerem časných endosomů EEA-1. V pozdějších časech po adsorpci (1,5 h) byla zaznamenána kolokalizace frakcí virových částic s lysosomálním markerem LAMP-2 (Bouřa et al., 2005) a 3 h p.a. kolokalizace s markerem endoplasmatického retikula Bip (GRP78). Tyto kolokalizační analýzy rovněž prokázaly přítomnost velké frakce polyomavirových částic 6 h p.a. v perinukleárním prostoru, následně 8 h p.a. byla zachycena kolokalizace s ubiquitinem, která naznačuje účast proteosomální aktivity na degradaci polyomavirových částic. Naše funkční analýzy ukázely, že polyomavirové částice indukují zvýšenou expresi MHCgp II při vysokých poměrech VLP/DC (10^5 a výše), obdobný trend byl zaznamenán i u kostimulačních molekul CD80 a CD86 avšak ve výrazně menší míře. Polyomavirové částice stimulují dendritické buňky k produkci cytokinu IL-12, což naznačuje polarizaci imunitní odpovědi ve prospěch Th1. V *ex vivo* proliferačních analýzách jsme prokázali, že dendritické buňky ošetřené polyomavirovými částicemi specificky indukují proliferaci jak $CD4^+$, tak i $CD8^+$ T lymfocytů (angl. cross-priming) izolovaných z imunizovaných myší. Toto zjištění dokládá, že antigenní peptidy odvozené od polyomavirových částic jsou prezentovány na MHCgp II, tak i MHCgp I komplexech příslušným T lymfocytům. Jinými slovy je možné rovněž konstatovat, že polyomavirové částice jsou efektivně cross-presentovány myšimi myeloidními buňkami. V neposlední řadě jsme prokázali indukcii produkce IL-2 a INF- γ T buňkami v *ex vivo* proliferačních analýzách. Inhibiční pokusy prokázaly, že prezentace peptidů na MHCgp II je závislá na kyselém pH endo-lysosomálních kompartmentů. Blokování funkce endosomální cysteinové proteasy Cathepsinu S rovněž vedlo k snížení antigenní prezentace. Celkem kontroverzní je zjištění, že i inhibice proteosomální aktivity vede k dramatickému snížení prezentace peptidů odvozených od polyomavirových částic. Lze se domnívat, že i cross-presentace polyomavirových částic je vedena tzv. klasickou cytosolickou dráhou. Nicméně tyto analýzy jsou předmětem současných experimentů. Prozatím jsme neprokázali přímou účast transportéru TAP na prezentaci antigenních peptidů odvozených od polyomavirových částic. V imunizovaných myších jsme zaznamenali mírné snížení hladiny regulačních $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T buněk, což by mohlo být spojeno s vyšší intenzitou *ex vivo* proliferace $CD8^+$ T buněk při jejich stimulaci alogenními (B6) spleenocyty. Rovněž i tyto výsledky jsou velice čerstvé, a tudíž musí být potvrzeny následnými pokusy.

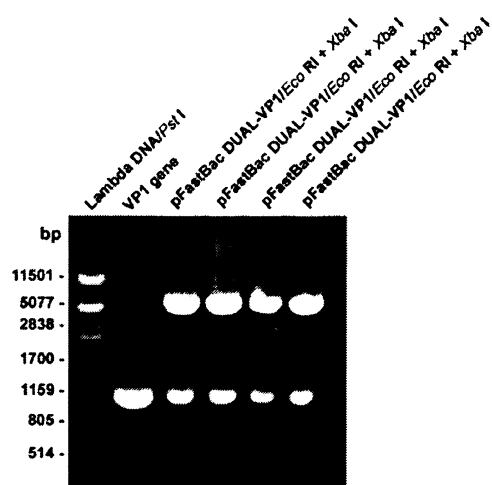
5.3 Konstrukce expresní kazety pro simultánní produkci proteinů VP1 a t-VP3 myšního polyomaviru

V rámci svojí diplomové práce jsem se rovněž věnoval přípravě několika genových konstruktů, které by měly usnadnit přípravu rekombinantních bakulovirů nesoucích strukturální geny myšního polyomaviru. Prvním dílčím úkolem bylo vytvořit na základě donorového plasmidu pFastBac DUAL (Bac-to-Bac Expression Systém, Invitrogen) expresní kazetu, kde bude pod silným polyhedrinovým promotorem (pPH) umístěn gen pro VP1 protein, zatímco pod druhým silným promotorem p10 bude vložena C-koncová část genu pro VP3 protein. Pro tyto účely jsem pomocí PCR amplifikace s využitím oligonukleotidů zavádějících příslušné restriční místa (VP1-*Eco* RI a VP1-*Xba* I) připravil gen pro VP1 protein, jako DNA templát byl použit plasmid pMJG-MPyV nesoucí celý genom myšního polyomaviru. Takto amplifikovaný gen (VP1) byl poté obdobně jako donorový plasmid pFastBac DUAL štěpen restričními endonukleasami *Eco* RI a *Xba* I za účelem tvorby komplementárních konců pro ligaci. Plasmidový vektor byl ještě následně defosforylován. Na obr. 5.32. je zachycena kontrolní elektroforéza připraveného insertu (VP1) a donorového plasmidu.



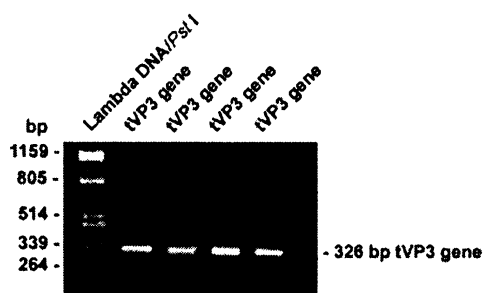
Obr. 5.32. (A) Kontrolní elektroforetická separace amplifikovaného a restričně opracovaného (*Eco* RI a *Xba* I) genu pro VP1 protein, (B) kontrolní elektroforéza linearizovaného (*Eco* RI a *Xba* I) plasmidu pFastBac DUAL. Jako hmotnostní standard byla použita genomová DNA fága Lambda štěpená *Pst* I enzymem.

Ligovaný genový konstrukt byl následně transformován do buněk *E. coli*, kde byl vyhledáván zpětným vyštěpováním pomocí *Eco* RI a *Xba* I správný rekombinantní plasmid pFastBac DUAL-VP1 viz obr. 5.33.



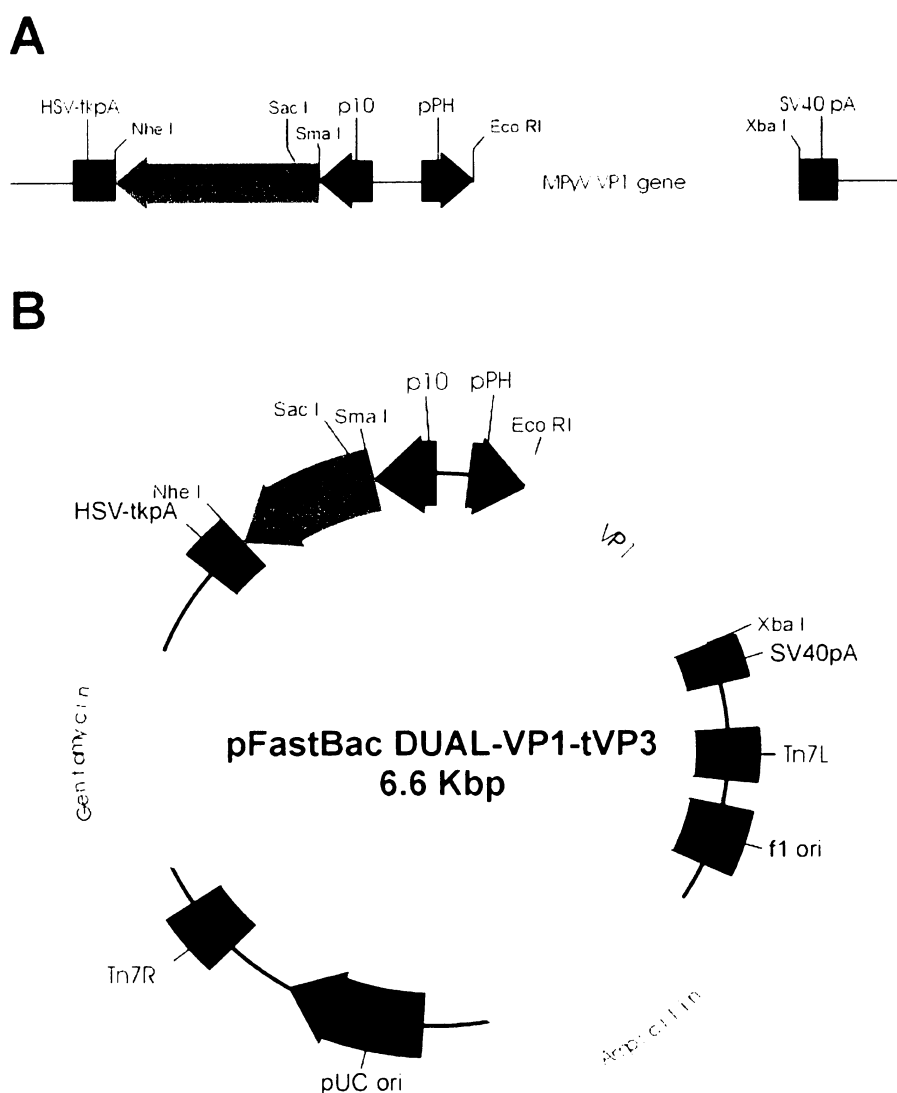
Obr. 5.33. Ukázka elektroforetické separace minipreparace plasmidů z pozitivních kolonií *E. coli* nesoucích rekombinantní plasmid pFastBac DUAL-VP1. Gen VP1 byl zpětně vyštěpen enzymy *Eco* RI a *Xba* I. Jako hmotnostní standard byla použita genomová DNA fága Lambda štěpená *Pst* I enzymem.

K tomuto konstruktů byla dále pod promotor p10 klonována C-terminální doména genu pro minoritní strukturní protein VP3. Opět pomocí PCR amplifikace s využitím primerů tVP3-*Sma* I a tVP3-*Nhe* I byla připravena příslušná sekvence zkrácené verze VP3 genu viz obr. 5.34. Takto amplifikovaná sekvence byla paralelně s plasmidem pFastBac DUAL-VP1 enzymaticky (*Sma* I a *Nhe* I) opracována pro následnou ligaci. Plasmidový vektor byl opět defosforylován. Po ligaci a transformaci byly restriktivně vyhledány rekombinantní plasmidy nesoucí jak VP1, tak i t-VP3 sekvence myšího polyomaviru (*data neuvedena*).



Obr. 5.34. Amplifikace C-terminální části genu pro VP3 protein (tVP3) a jeho elektroforetická separace. Jako hmotnostní standard byla použita genomová DNA fága Lambda štěpená *Pst* I enzymem.

Výsledná expresní kazeta rekombinantního plasmidu pFastBac DUAL-VP1+t-VP3 je schématicky znázorněna na obr. 5.35. Genový konstrukt je sestaven tak, aby šlo cíleně vkládat přes restriktivní místo *Sac* I k C-terminální doméně proteinu VP3 další sekvence kandidátních virových, bakteriálních či nádorových antigenů. Expresí této kazety v hmyzích buňkách je možné získat polyomavirové nanočástice nesoucí jakýkoliv přepravovaný antigen uvnitř pseudokapsid. V současné době byly v naší laboratoři na základě tohoto vektoru připraveny polyomavirové pseudokapsidy nesoucí antigeny chronické myeloidní leukémie – zlomové místo Bcr-Abl (~171 Amk) a tyrosinkinasovou doménu SH1 c-abl (~208 Amk) (Mgr. V. Boháčová).

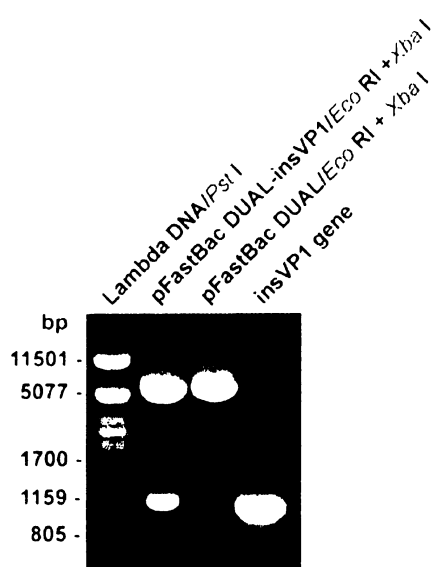


Obr. 5.35. (A) Schéma připravené expresní kazety pro simultánní produkci VP1 a C-terminální domény VP3 proteinů a (B) celkového plasmidu pFastBac DUAL-VP1+t-VP3. Gen pro VP1 protein byl vložen do tohoto vektoru přes restrikční místa *Eco RI* a *Xba I* pod polyhedrinový (pPH) promotor. Zkrácená verze genu pro VP3 protein (t-VP3) byla vložena do tohoto vektoru přes restrikční místa *Sma I* a *Nhe I* pod p10 promotor. Přebes restrikční místo *Sac I* v genu t-VP3 je možné vkládat další sekvence kódující kandidátní virové, bakteriální či nádorové antigeny tak, aby byly připraveny chimerické polyomavirové pseudokapsidy nesoucí uvnitř právě tyto antigeny.

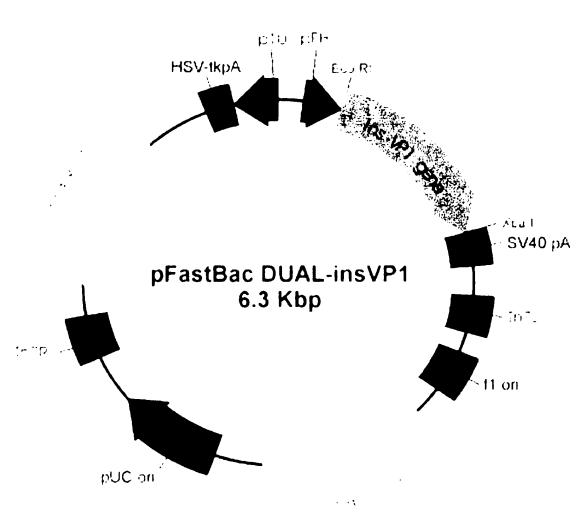
Kromě přípravy výše uvedeného genového konstruktů jsem se zabýval přípravou obdobného vektoru, který ovšem nese pod polyhedrinovým promotorem mutovanou verzi genu pro VP1 protein (laboratorní označení ins-VP1) myšího polyomaviru. Tato modifikovaná sekvence má v oblasti HI smyčky genu VP vloženo klonovací místo a sekvence kódující flexibilní linkery (serin-glycinové motivy). PCR amplifikace tohoto genu probíhala obdobně jako jeho intaktní forma s tím rozdílem, že jako DNA templát byl použit plasmid pUC18-insVP1. Kontrolní restrikční ověření tohoto konstruktů je zachyceno na obr. 5.36, na obr. 5.37 je schématicky znázorněn připravený plasmid pFastBac

DUAL-insVP1. Tento vektor je v současné době v naší laboratoři dále upravován za účelem přípravy chimerických polyomavirových částic nesoucích cizí epitopy exponované na povrchu virových nanočástic, tak i uvnitř

pseudokapsid (Lucie Klímová).



Obr. 5.36. Restrikční ověření vytvořeného plasmidu pFastBac DUAL-insVP1. Gen insVP1 byl vyštěpen pomocí enzymů *Eco* RI a *Xba* I. Paralelně byly rovněž separovány linearizovaný plasmid pFastBac DUAL a PCR produkt amplifikace insVP1 genu. Jako hmotnostní standard byla použita genomová DNA Lambda fága štěpená enzymem *Pst* I.



Obr. 5.37. Schéma připraveného plasmidu pFastBac DUAL-insVP1. Gen insVP1 byl vložen do tohoto vektoru přes restrikční místa *Eco* RI a *Xba* I a je umístěn pod polyhedrinovým (pPH) promotorem. Vektor je v současné době v naší laboratoři dále upravován za účelem přípravy chimerických polyomavirových částic nesoucích cizí epitopy exponované na povrchu virových nanočástic, tak i uvnitř pseudokapsid (Lucie Klímová).

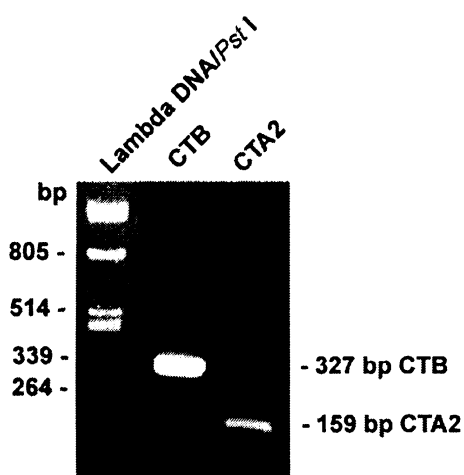
5.4 Příprava antigenního nosiče na bázi netoxické formy cholerového toxinu

V rámci poslední části své diplomové práce jsem se věnoval přípravě nosiče pro dopravu antigenů do savčích buněk odvozeného od cholerového toxinu.

5.4.1 Struktura expresní kazety pro produkci cholerového toxinu

Pro produkci cholerového toxinu jsme snažili využít vlastností bakulovirového expresního systému. Prvním dílčím úkolem bylo vytvořit na základě donorového plasmidu pFastBac DUAL (Bac-to-Bac Expression System, Invitrogen) expresní kazetu, kde bude

pod silným polyhedrinovým promotorem (pPH) umístěn gen pro B podjednotku chole-
rového toxinu (CTB), zatímco pod druhým silným promotorem p10 bude vložena mo-
difikovaná část genu pro CTA2 podjednotku. Pro tyto účely jsem pomocí PCR amplifi-
kace s využitím oligonukleotidů zavádějících příslušné restriční místa (CTB-*Bam* HI a
CTB-*Hind* III, resp. CTA2-*Sma* I a CTA2-*Nhe* I) připravil geny pro CTB a CTA2 pod-

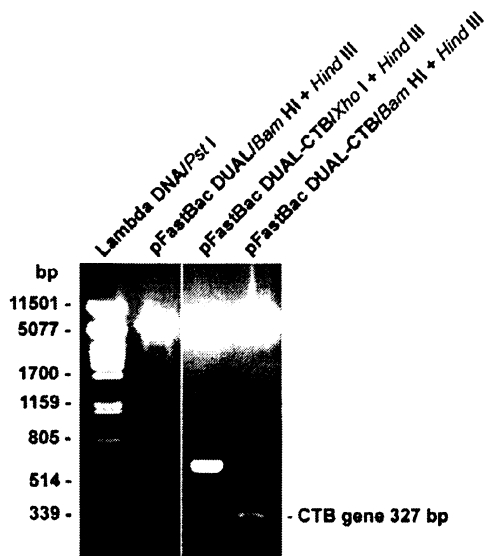


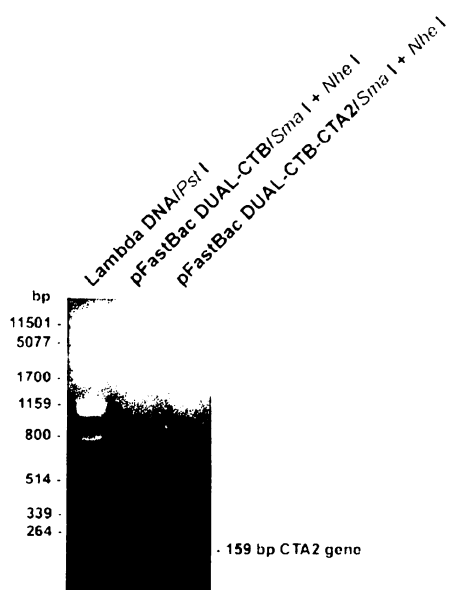
jednotky, jako DNA templát byl použit plasmid pCVD621 nesoucí fragmenty operonu CTxB a CtxA2 z patogenní bakterie *Vibrio cholerae* viz obr. 5.38.

Obr. 5.38. PCR amplifikace CTB a CTA2 genů a jejich elektroforetická separace. Jako hmotnostní standard byla použita genomová DNA fága Lambda štěpená *Pst* I enzymem.

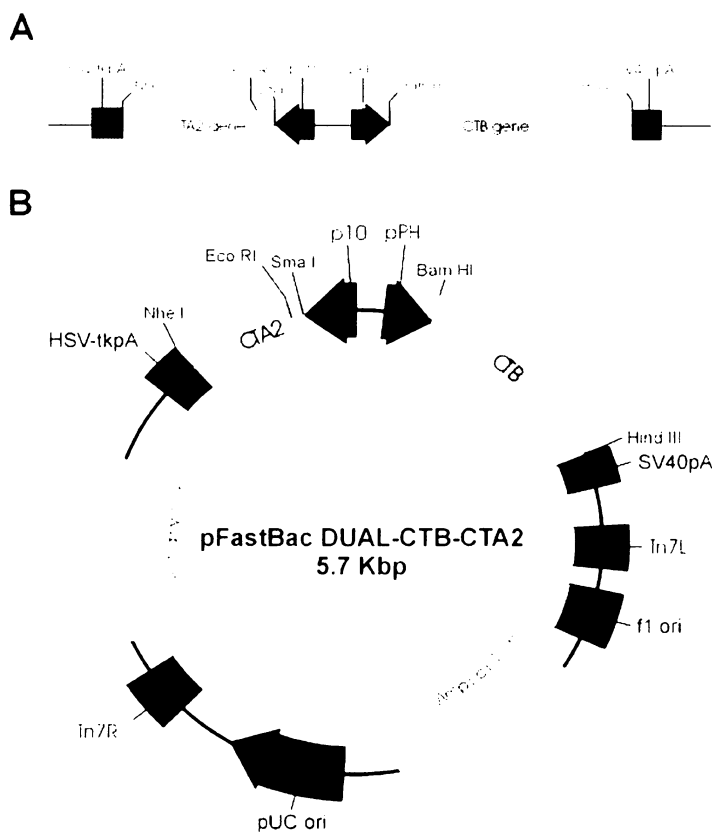
V první fázi byl vytvořen rekombinantní plasmid pFastBac DUAL-CTB, kde byla DNA sekvence CTB podjednotky vložena přes restriční místa *Bam* HI a *Hind* III pod pPH viz obr. 5.39. Po ověření správnosti vložení CTB genu byl do tohoto vektoru dále klonován modifikovaný gen pro CTA2 podjednotku pod p10 promotor. Vytvořený plasmid pFastBac DUAL-CTB+CTA2 byl opět kontrolně restričně ověřován na přítomnost daných insertů viz. obr. 5.40. Na obr. 5.41 je schématicky znázorněna expresní kazeta pro simultánní produkci CTB a CTA2 proteinů v hmyzích buňkách. Detailní návrh modifikované sekvence pro CTA2 podjednotku je zachycen na obr. 5.42.

Obr. 5.39. Restriční ověření vytvořeného plasmidu pFastBac DUAL-CTB. Gen CTB byl vyštěpen pomocí enzymů *Bam* HI a *Hind* III, paralelně byl rovněž tento plasmid kontrolně rozštěpen enzymy *Xho* I a *Hind* III. Jako hmotnostní standard byla použita genomová DNA Lambda fága štěpená enzymem *Pst* I.

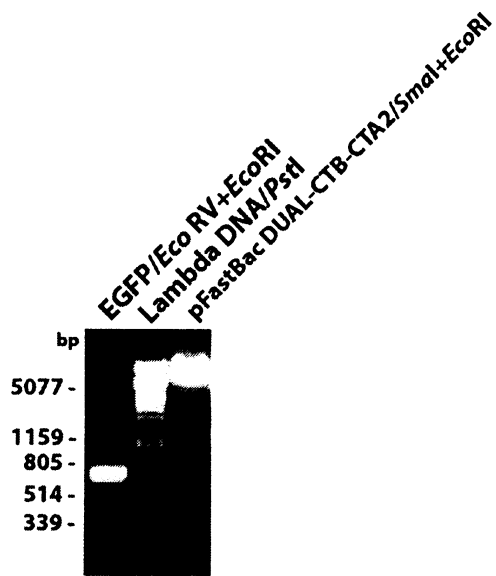




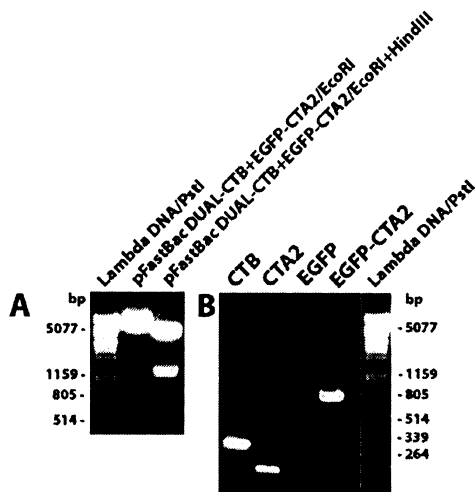
Obr. 5.40. Restrikční ověření vytvořeného plasmidu pFastBac DUAL-CTB+CTA2. Gen CTA2 byl vyštěpen pomocí enzymů *Sma* I a *Nhe* I. Jako hmotnostní standard byla použita genomová DNA Lambda fága štěpená enzymem *Pst* I.



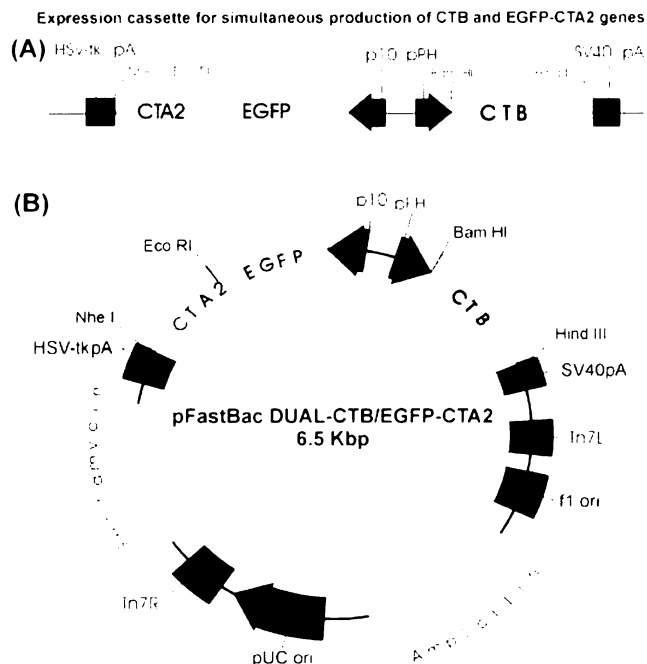
Obr. 5.41. Schéma připravené expresní kazety (A) a výsledného donorového plasmidu pFastBac DUAL-CTB+CTA2 (B). Gen pro B podjednotku cholerového toxinu (CTB) byl vložen do tohoto vektoru přes restrikční místa *Bam* HI a *Hind* III pod polyhedrinový (pPH) promotor. Modifikovaná verze genu pro CTA2 podjednotku cholerového toxinu (CTA2) byla vložen do tohoto vektoru přes restrikční místa *Sma* I a *Nhe* I pod p10 promotor. Na N-konci CTA2 genu bylo připraveno miniklonovací místo (*Eco* RI, *Sal* I, *Xho* I a *Sma* I), přes které je možné připravovat různé fúzní proteiny s CTA2 genem.



Obr. 5.43. Kontrolní elektroforetická separace amplifikovaného a restriktivně opracovaného (*Eco* RV a *Eco* RI) genu pro EGFP protein (levá část gelu) a kontrolní elektroforéza linearizovaného (*Sma* I a *Eco* RI) plasmidu pFastBac DUAL-CTB+CTA2 (pravá část gelu). Jako hmotnostní standard byla použita genomová DNA fága Lambda štěpená *Pst* I enzymem.

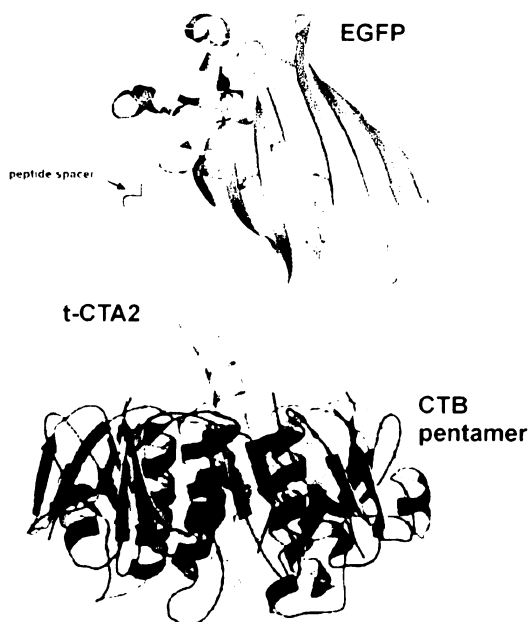


Obr. 5.44. Charakterizace připraveného plasmidu pFastBac DUAL-CTB+EGFP-CTA2. (A) Kontrolní štěpení enzymy *Eco* RI a *Hind* III a elektroforetická separace vzniklých DNA fragmentů. (B) PCR detekce DNA sekvencí pro proteiny CTB, CTA2, EGFP a EGFP-CTA2. V dráze EGFP není žádný PCR produkt, jelikož C-koncová sekvence tohoto genu byla odstříhnuta enzymem *Eco* RI, a tudíž nemůže být zachycena pomocí PCR. Nicméně nově formovaná sekvence genu pro fúsní protein EGFP-CTA2 je již normálně amplifikována. Jako hmotnostní standard byla použita genomová DNA fága Lambda štěpená *Pst* I enzymem.



Obr. 5.45. (A) Schéma sestavené expresní kazety pro paralelní produkci proteinu CTB a fúsního proteinu EGFP-CTA2, (B) celkové schéma výsledného plasmidu pFastBac DUAL-CTB+EGFP-CTA2. Gen pro CTB protein byl vložen do tohoto vektoru přes restrikční místa *Bam* HI a *Hin* III pod polyhedrinový (pPH) promotor. Modifikovaná verze genu pro CTA2 polypeptid byla vložena do tohoto vektoru přes restrikční místa *Sma* I a *Nhe* I pod p10 promotor. K N-konci této sekvence byla dále fúsována sekvence pro EGFP protein přes restrikční místa *Eco* RI a *Sma* I, resp. *Eco* RV. Spojením tupých konců vzniklých štěpením *Sma* I a *Eco* RV byla obě místa zrušena v novém konstrukt, tudíž nemohla být využita při kontrolní detekci.

Schematic model of chimeric "green" cholera toxin



Obr.5.46. Schématický 3D obraz netoxické formy cholerového toxinu, kde je jeho katalytická (toxická) podjednotka nahrazena proteinem EGFP. Barevné značení odpovídá mapě plasmidu na obr. 5.45.

5.4.2 Produkce, purifikace a charakterizace "zeleného" (netoxického) cholerového toxinu

Na základě sestavených donorových plasmidů pFastBac DUAL-CTB+CTA2 a pFastBac DUAL-CTB+EGFP-CTA2 byly s využitím systému Bac-to-Bac Expression System (Invitrogen) připraveny rekombinatní bakuloviry: rBac-CTB+mCTA2 a rBac-CTB+EGFP-CTA2. Prvotní produkce CTB a EGFP-CTA2 proteinů v hmyzích buňkách infikovaných příslušnými bakuloviry byla zjišťována imunochemicky viz. 5.47. Tato analýza ukázala, že skutečně dochází v hmyzích buňkách k expresi CTB a EGFP-CTA2 proteinů. Produkce těchto proteinů byla dále potvrzena pomocí fluorescence a imuno-fluorescence viz obr. 5.48.

Immunodot-blot detection

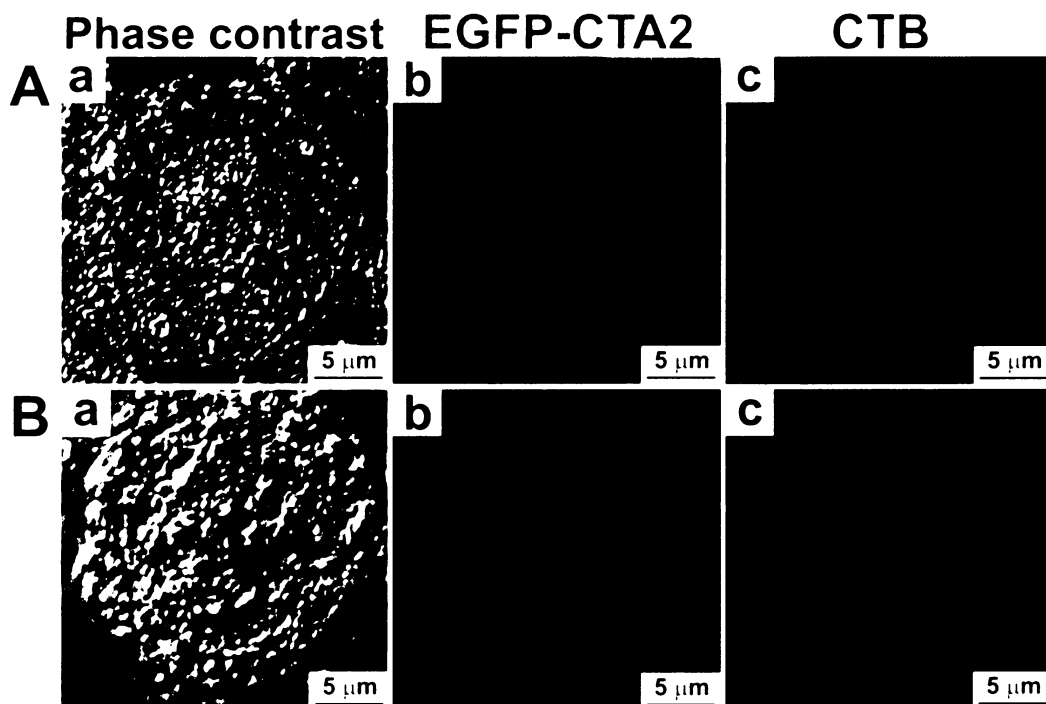
MAb anti-CTB ●

PAb anti-CTB ●

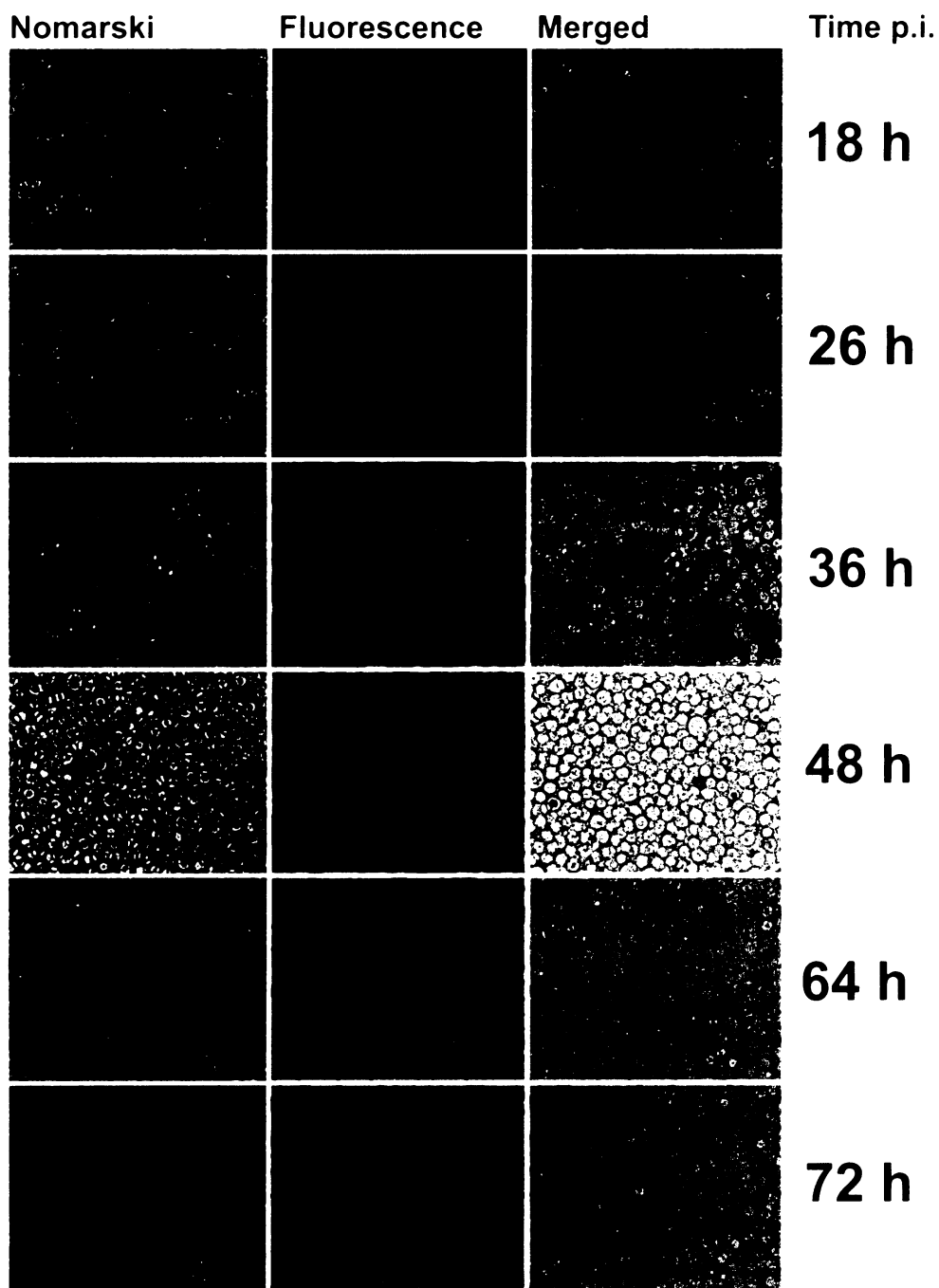
PAb anti-EGFP ●

Infected Sf9 cells
Non-infected Sf9 cells

Obr. 5.47. Imunochemická detekce proteinů CTB a EGFP-CTA2 v lysátu infikovaných (rBac-CTB+EGFP-CTA2) hmyzích buňkách pomocí dot-blot analýzy. Protein CTB byl detekován pomocí monoklonální myší protilátky anti-CTB (Mab anti-CTB), resp. králičí polyklonální protilátky anti-CTB (PAb anti-CTB) a protein EGFP-CTA2 pomocí králičí polyklonální protilátky anti-EGFP (PAb anti-EGFP). Tyto primární protilátky byly následně značeny pomocí sekundární kozi protilátky proti myším imunoglobulinům nebo kozi protilátky proti králičím imunoglobulinům konjugované s křenovou peroxidasou. Detekce byla provedena 72 h p.i. Jako negativní kontrola byly použity lysáty neinfikovaných hmyzích buněk.



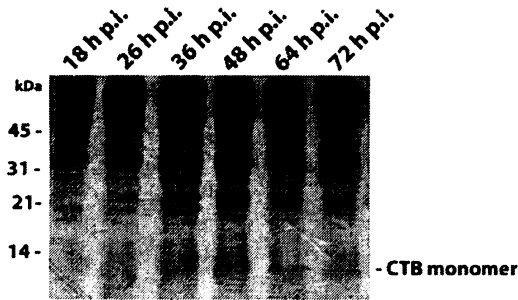
Obr. 5.48. Řezy konfokálního mikroskopu hmyzími buňkami infikovanými rekombinatním bakulovirem (rBac-CTB+EGFP-CTA2 (A) a neinfikovanými hmyzími buňkami (B). V levé části (a) fázový kontrast, (b) fluorescence EGFP-CTA2 proteinu a (c) imuno-fluorescence CTB proteinu. Buňky byly fixovány 3% paraformaldehydem 72 h p.i. a protein CTB byl značen pomocí králičí polyklonální protilátky anti-CTB, která byla následně vizualizována sekundární kozi protilátkou proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s AlexaFluor 546. Měřítko: 5 µm.



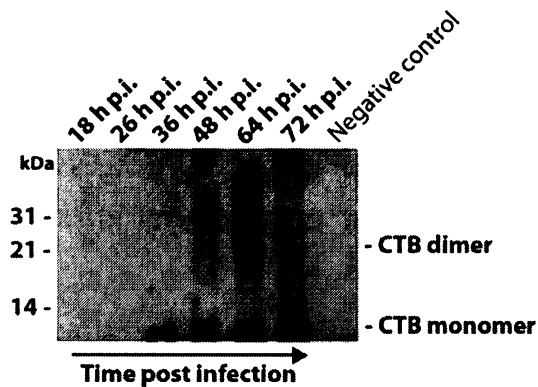
Obr. 5.49. Vliv doby sklizně na množství a kvalitu chimerického cholerového toxinu. Hmyzí buňky Sf9 byly paralelně infikovány rekombinantním bakulovirem rBac-CTB+EGFP-CTA2 a v různých časech po infekci bylo detekováno množství syntetizovaného EGFP-CTA2 proteinu pomocí fluorescenční mikroskopie. Rovněž byly v těchto časech buňky sklizeny a imuchemicky testovány na přítomnost CTB proteinu. Z obrázku je patrné, že k největší produkci EGFP-CTA2 došlo 64 h, resp. 72 h p.i.

V dalších analýzách jsme se zaměřili na časovou závislost produkce CTB a EGFP-CTA2 proteinů v hmyzích buňkách. V různých časech po infekci jsme pomocí fluorescenční mikroskopie ověřovali dynamiku produkce EGFP-CTA2 v hmyzích buňkách viz obr. 5.49. Při stanoveních 64 h a 72 h p.i. jsme zaznamenali maximum intenzity fluorescenčního signálu, kdy bylo téměř 100 % buněk pozitivních na produkci EGFP-

CTA2. Produkce proteinu CTB byla ověřována ve stejných časech po infekci pomocí SDS-elektroforézy a imunochemické analýzy viz obr. 5.50 a obr. 5.51. Pomocí imunochemické analýzy lze rovněž konstatovat, že nejvíce CTB proteinu je v lysátech přítomno rovněž mezi 64-72 h p.i.



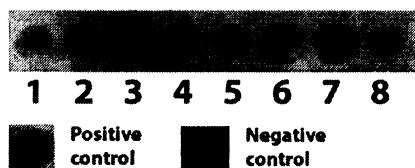
Obr. 5.50. SDS-elektroforéza lysátů infikovaných (rBac-CTB+EGFP-CTA2) hmyzích buněk sklizených v různých časech po infekci. 15% polyakrylamidový gel, barveno Commasie Brilliant Blue.



Obr. 5.51. SDS-elektroforéza lysátů infikovaných (rBac-CTB+EGFP-CTA2) hmyzích buněk sklizených v různých časech po infekci. Proteiny byly přeneseny na membránu, kde byl imunochemicky pomocí polyklonální králičí protilátky anti-CTB identifikován protein CTB (11 kDa). Primární protilátka byla následně značena sekundární kozí protilátkou proti králičím imunoglobulinům konjugovanou s křenovou peroxidasou. Jako negativní kontrola byl použit lysát neinfikovaných hmyzích Sf9 buněk.

Připravený rekombinantní bakulovirus rBac-CTB+EGFP-CTA2 byl použit pro infekci hmyzích buněk za účelem produkce většího množství netoxické formy cholerového toxinu. Z infikovaných buněk jsme po sklizni připravili lysáty, které byly buď přímo nanášeny na chromatografickou kolonku s náplní imobilisované D-galaktosy nebo byly nejprve rozděleny ultracentrifugací v CsCl gradientu či sráženy síranem amonným při 70% saturaci a dialyzovány proti 50 mM Tris-HCl (pH 8,0). Navázaný cholerový toxin byl z kolonky uvolněn roztokem 1 M D-galaktosy v 50 mM Tris-HCl (pH 8,0). V jednotlivých frakcích byl imunochemicky stanovován CTB protein viz obr. 5.52.

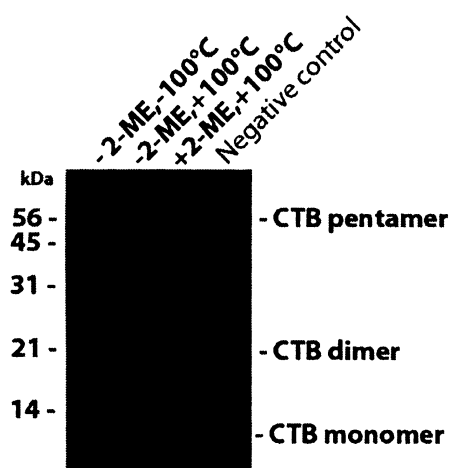
D-galactose affinity chromatography



Obr. 5.52. Imunodetekce CTB proteinu v jednotlivých frakcích získaných afinitních chromatografií. Protein CTB byl imunochemicky identifikován pomocí polyklonální králičí protilátky anti-CTB. Primární protilátka byla následně značena sekundární kozí protilátkou proti králičím imunoglobulinům konjugovanou s křenovou peroxidasou. Jako pozitivní kontrola byl použit lysát infikovaných (rBac-CTB-CTA2) Sf9 hmyzích buněk, negativní kontrolou byl použit lysát neinfikovaných hmyzích Sf9 buněk.

Na základě imunodetekce jednotlivých frakcí získaných při afinitních chromatografií byla prokázána přítomnost proteinu CTB. Nicméně množství cholerového toxinu izolovaného z kolonky bylo tak nízké, že nebylo možné jej spektrofotometricky (A_{280} ani analýzou dle Bradfordové) kvantifikovat. V současné době řešíme problém nízkých výtěžků při afinitní chromatografii cholerového toxinu.

Poslední analýzou bylo ověřit, zda se v hmyzích buňkách formují pentamery proteinu CTB tak, jak již bylo dříve popsáno v jiných expresních systémech. Za tímto účelem byla využita SDS-elektroforéza izolovaného cholerového toxinu, který byl nanášen ve vzorkovém pufru v nepřítomnosti, resp. v přítomnosti redukčního činidla β -merkaptioetanolu viz obr. 5.53. Z následujících imunoanalýz jsme zjistili, že v neredukujících podmínkách se pohybuje CTB protein v oblastech délek kolem 50 kDa. Tato analýza poukazuje, že dochází při expresi CTB proteinu v hmyzích buňkách k formování pentamerů tohoto proteinu (~55 kDa). V plně redukujících podmínkách jsme detekovali signál v oblasti délek ~11 kDa (CTB monomery) a ~22 kDa (CTB dimery).



Obr. 5.53. SDS-elektroforéza izolovaného (afinitní chromatografie) rekombinantního cholerového toxinu. V první drážce zleva je separován vzorek, který byl nanášen ve vzorkovém (Laemmli) pufru bez přítomnosti β -merkaptioetanolu a rovněž nebyl povařen. V druhé drážce je vzorek, který je rovněž nanášen v pufru bez přítomnosti β -merkaptioetanolu, avšak byl povařen (5 min, 100 °C). Ve třetí drážce je nanášen vzorek v tradičním Laemmli pufru (5% β -merkaptioetanol), který byl rovněž povařen. Proteiny byly po proběhnutí elektroforézy přeneseny na membránu, kde byl imunochemicky pomocí polyklonální králičí protilátky anti-CTB identifikován protein CTB (11 kDa). Primární protilátka byla následně značena sekundární kozí protilátkou proti králičím imunoglobulinům konjugovanou s křenovou peroxidasou. Jako negativní kontrola byl použit lysát neinfikovaných hmyzích Sf9 buněk.

Kapitola 6

DISKUSE

6.1 Interakce umělých virových částic malých neobalených DNA virů s dendritickými buňkami

V průběhu evoluce obratlovci vyvinuli velice sofistikovaný imunitní systém, který dokáže rozpoznat přítomnost patogenních mikroorganismů a zahájit proti nim patřičné obranné kroky. Nadmíru dobře jsou prostudovány receptory rozpoznávající jisté evolučně konzervované struktury (angl. **pattern recognition receptors, PRRs**) bakteriálních patogenů. Profesionální buňky předkládající antigen, zejména dendritické buňky, využívají pro tyto účely **receptory proteinových rodin Toll či NOD** (Takeda et al. 2003; Girardin et al., 2003). Nicméně role těchto receptorů při rozpoznávání kapsidových struktur neobalených virů je prozatím velice málo probádána. Lenz et al. (2001) jako první prokázali, že umělé papilomavirové částice jsou efektivně internalizovány myšimi dendritickými buňkami. Jejich pokusy přímo dokládají, že tyto virové částice indukují *in vitro* fenotypovou maturaci dendritických buněk vyjádřenou zvýšenou povrchovou expresí **MHC gp I i II třídy, kostimulačních molekul CD 80, CD86 a CD40 a adhesivní molekuly CD54**. Kromě zvýšené exprese těchto klíčových molekul pozorovali rovněž zvýšenou produkci zánětlivých **cytokinů IL-6 a TNF- α** . Indukovanou produkci dalšího klíčového cytokinu **IL-12p70** po aplikaci virových částic zaznamenali až při společné *in vitro* ko-kultivaci dendritických buněk se syngenními T lymfocyty.

Velice zajímavý je rovněž poznatek, že tyto stimulační vlastnosti na dendritické buňky měly pouze **plně sestavené papilomavirové částice**, zatímco při aplikaci nese-stavených kapsomer (L1 pentamerů) byl tento efekt pozorován jen v nízké míře. Jakoby pouze perfektně sestavené, geometricky pravidelné virové částice měly schopnost oligomerozovat některé buněčné receptory, jejichž vnitrobuněčné signalizační domény jsou pak snáze excitovatelné. Tyto strukturální implikace vycházejí i z pokusů s virovými

částicemi odvozenými od myšího polyomaviru provedené autory Vlastos et al. (2003). Tito autoři paralelně srovnávali *in vivo* imunogenní vlastnosti intaktních polyomavirových VP1 částic s pentamery tvořenými fúsním proteinem GST-VP1. Jejich pokusy taktéž ukazují, že intaktní polyomavirové nanočástice jsou mnohem více potentní při indukci imunitních odpovědí.

Jako nejvhodnější koncentrace papilomavirových částic pro *in vitro* indukci maturace dendritických buněk byla 10 µg/ml média (tato koncentrace odpovídá $\sim 3 \times 10^5$ virových částic/dendritickou buňku) v pokusech provedených Lenz et al. (2001). Tito autoři dále ověřovali schopnost indukce maturace dendritických buněk při jejich vystavení strukturně podobným pseudokapsidám odvozených od lidských polyomavirů – BK viru a JC viru. Tyto pokusy však ukázaly neschopnost těchto VLP struktur navodit maturaci dendritických buněk i při výrazně vyšších koncentracích (až 100 µg/ml) VLP struktur v kultivačním médiu. Naše pokusy s umělými nanočásticemi myšího polyomaviru ukázaly, že tyto VLP struktury jsou schopny indukovat zvýšenou povrchovou expresi MHC gp II a kostimulačních molekul CD80 a CD86 pouze při vysokých poměrech VLP/DC – 10^5 a výše. Jinými slovy, při koncentraci VP1 pseudokapsid $\sim 2,7$ µg/ml média jsme byli schopni zaznamenat tuto indukci, ovšem při koncentracích ~ 27 µg/ml byly pozorované trendy mnohem výraznější. Ve srovnání s papilomavirovými částicemi, kde Lenz et al. (2001) nepozorovali bezprostředně zvýšenou produkci prozánětlivého **cytokinu IL-12** dendritickými buňkami, v našich pokusech byl tento cytokin již přímo silně specificky produkován po vystavení dendritických buněk polyomavirovým částicím. Naše výsledky byly potvrzeny autory Bickert et al. (2006), kteří rovněž při aplikaci VP1 pseudokapsid MPyV nesoucích epitopy ovalbuminu pozorovali indukci exprese MHC gp II a kostimulačních molekul CD80, CD86 a CD40 na povrchu myších dendritických buněk. Tito autoři poukazují, že míra aktivace dendritických buněk je závislá na množství (angl. dose-dependent) aplikovaných polyomavirových částic. Jako optimální množství pro maturaci dendritických buněk uvádějí koncentraci VP1 částic 40 µg/ml média (tato koncentrace odpovídá $\sim 1,5 \times 10^6$ VP1 částic/dendritickou buňku). Při koncentraci 1 µg/ml pozorovali velmi slabou, téměř žádnou aktivaci uvedených markerů maturace dendritických buněk. Obdobně našim výsledkům, i Bickert et al. (2006) a Tegerstedt et al. (2006) prokázali přímou produkci cytokinu IL-12 dendritickými buňkami po jejich vystavení MPyV VP1 částicím. V našich pokusech jsme jako odpovědnou za stimulační vlastnosti polyomavirových částic rovněž podezřívali jejich možnou kontaminaci, ať už molekulami nukleových kyselin či některých proteinů (HSP, apod.).

Proto jsme paralelně při aktivačních pokusech dendritických buněk porovnávali polyomavírové částice purifikované pouze v CsCl gradientu a částice čištěné přes gradient CsCl, tak i hustotní gradient sacharosu. V našich pozorováních jsme však nezaznamenali jakýkoliv významný rozdíl v aktivaci dendritických buněk různě čistými frakcemi polyomavírových částic. Obdobně ani vliv nukleových kyselin hmyzího či bakulovirového původu uvnitř pseudokapsid neměl vliv na stimulaci dendritických buněk. I v práci Bickert et al. (2006) předcházeli možnému zkreslení dat chemickým ošetřením preparátů virových částic "Detoxi-Gel Endotoxin Removal Gel" (Pierce).

Ne náhodou výzkum papilomavírových umělých částic, které jsou již dnes klinicky podávány dívkám jako preventivní vakcína před vývojem rakoviny děložního čípku, dosáhl jistého pokroku v objasnění samotných mechanismů maturace dendritických buněk. Yang et al. (2004) za použití robustní biočipové technologie prokázali, že po aplikaci papilomavírových částic dochází v dendritických buňkách k aktivaci transkripce genů pro INF- α/β a celé řady dalších prozánětlivých cytokinů a chemokinů. Tyto analýzy posléze potvrdily i na proteinové úrovni imunochemicky. Již dříve se vědělo, že řada mikrobiálních patogenů aktivuje přes interakci s Toll receptory v profesionálních buňkách překládajících antigen signalizační dráhy vedoucí přes adaptorový protein **MyD88** až k transkripci závislé na faktorech **NF κ B**, **NF-AT** a **AP-1**. Překvapivé bylo zjištění těchto autorů, kteří přímo prokázali po aplikaci papilomavírových částic aktivaci signalizačních drah NF κ B, NF-AT a AP-1 v buněčné linii makrofágů RAW264.7. Následné blokování funkce adaptorového proteinu MyD88 ukázalo, že tento protein hraje klíčovou roli při indukci těchto signalizačních drah pomocí umělých papilomavírových částic. Další *in vitro* pokusy s dendritickými buňkami MyD88^{-/-} skutečně ukázaly, že takovéto buňky není možné maturovat papilomavírovými částicemi. Tyto výsledky naznačují, že papilomavírové částice jsou pravděpodobně rozpoznávány v dendritických buňkách některým z modulů Toll receptorů, které poté aktivují příslušné signalizační dráhy. Zajímavé výsledky potvrzující tyto hypotézy přinesli záhy Yan et al. (2005). Jejich pracovní skupina ukázala, že aktivace myeloidních dendritických buněk papilomavírovými částicemi je zprostředkována **proteoglykanovými receptory**, **TLR4** a **NF κ B**. K těmto závěrům je dovedly pokusy s použitím heparinu a monoklonálních protilátek proti TLR4 receptoru, jejichž aplikace vedly k blokování přenosu jednoho člena proteinové rodiny NF κ B – RelB z cytosolu do jádra. **Proteinová podjednotka RelB** je nezbytnou molekulou pro navození maturace myeloidních dendritických buněk a Langerhansových buněk (Weih et al., 1995). Translokace RelB do jádra

těchto buněk vede následně ke zvýšené expresi MHC gp a kostimulačních molekul. Pokusy provedené Yan et al. (2005) přináší první přímé důkazy, které prokazují roli **receptoru TLR4** a jeho signalizační dráhy na aktivaci dendritických buněk umělými papilomavirovými částicemi. Receptor TLR4 byl původně popsán jako receptor rozznávající lipopolysacharidové struktury, avšak později se ukázalo, že dokáže interagovat s některými virovými proteiny. Příklady takovýchto proteinů mohou být F protein viru RSV (angl. respiratory syncytial virus) či obalový protein retroviru MMTV (angl. mouse mammary tumor virus) (Kurt-Jones et al., 2000; Burzyn et al., 2004). Poslední studie přinesly důkazy o roli **C-lektinové adhesivní molekuly DC-SIGN** (CD209) v procesu aktivace dendritických buněk papilomavirovými částicemi (García-Pineros et al., 2006). Tato pracovní skupina prokázala, že aktivace maturačních markerů dendritických buněk indukovaná papilomavirovými částicemi je citlivá na blokování DC-SIGN. Rovněž pokusy s transfekcí buněčné linie Raji genem pro DC-SIGN ukázaly, že HPV VLP struktury se váží k této molekule, což bylo doloženo i inhibičními pokusy s použitím protilátek proti DC-SIGN. Povrchová molekula DC-SIGN vystupuje jako adhesivní molekula (interakce s T lymfocyty přes ICAM-3), avšak rovněž je velice efektivním receptorem a zprostředkovatelem internalizace řady patogenních organismů – HIV-1 (Geijtenbeek et al., 2000) a Ebola viru (Alvarez et al., 2002) a dalších.

Neméně zajímavé výsledky dosažené autory Yan et al. (2005) přinesly pokusy s aktivací **Langerhansových buněk**, což jsou myeloidní dendritické buňky mající své pole působnosti v epidermis a epiteliálních tkáních. Pro jejich vývoj je nezbytný cytokin **TGF- β** , který je velice hojně přítomný právě v těchto tkáních. Jejich analýzy ukázaly, že Langerhansovy buňky nejsou aktivovatelné papilomavirovými částicemi v přítomnosti TGF- β . Při odstranění tohoto faktoru z média pozorovali obdobnou indukci maturace jako v případě myeloidních dendritických buněk. Tento efekt TGF- β poukazuje na klíčovou roli cytokinového mikroprostředí v epiteliálních tkáních, kde dochází k indukci imunitních odpovědí ať už proti infekci HPV či proti vakcíně založené na HPV VLP částicích.

Proč umělé papilomavirové částice jsou tak efektivními stimulatory dendritických buněk již trochu víme, ale proč jsou ve stimulaci tak neschopné strukturně podobné částice lidských polyomavirů ještě nevíme. Možným vysvětlením by mohla být rozdílná životní strategie těchto dvou strukturně blízce příbuzných skupin virů. V průběhu evoluce se pravděpodobně vyvinuly receptory (v rámci systému "pattern recognition receptors", PRRs) rozpoznávající ikosahedrální kapsidy virů. Přirozená infekce papilo-

maviry se odehrává na úrovni epitelálních buněk, jejich propagace pak až v terminálně diferencovaných epitelálních buňkách, kde je papilomavirus do jisté míry ukryt před složkami systémové imunity. K expresi strukturních L1 a L2 proteinů dochází masivně právě až v povrchových diferencovaných keratinocytech. K aktivaci dendritických buněk papilomavírovými částicemi dochází při relativně velkých poměrech >1000 VLP/DC (Lenz et al. (2001), tudíž pravděpodobně v průběhu evoluce nebyl tak velký selekční tlak na papilomavirus, aby se záměrně vyhýbal receptorovému rozpoznání a odpovídající signalizaci uvnitř dendritických buněk. Tuto hypotézu podporují z druhé strany i analýzy s Langerhansovými buňkami (Yan et al., 2005), které ve svém přirozeném prostředí bohatém na TGF- β (epitelální tkáň, pokožka), nejsou aktivovatelné papilomavírovými částicemi. Radikálně odlišná je však situace u lytických virů, které navozují persistentní systémovou infekci jako součást svého životního cyklu, mezi které patří právě lidské polyomaviry – **BK virus a JC virus**. V zájmu těchto virů je naopak uniknout mechanismům rozpoznávání složkami imunitního systému, tudíž patrně v průběhu evoluce uskutečnily kroky k jejich obejití. Některé viry jako herpes simplex virus, vaccinia virus umí dokonce efektivně inhibovat maturaci dendritických buněk (Salio et al., 1999; Engelmayer et al., 1999). Tyto extrémní snahy souvisí s tím, že tyto viry přímo infikují dendritické buňky.

V naší práci jsme taktéž chtěli nahlédnout do mechanismů zpracování a prezentace peptidů odvozených od polyomavírových částic. Při ošetření dendritických buněk **inhibitory okyselování endo-lysosomálních kompartmentů** (bafilomycin A, chloroquine) jsme pozorovali citlivost prezentace peptidů odvozených od polymavírových částic. Podobný efekt blokování acidifikace endosomů na antigenní prezentaci byla dříve zaznamenána i u parvovírových částic (Morón et al., 2003). Při aplikaci **inhibitoru Cathepsinu S**, což je endosomální cysteinová proteasa, jsme rovněž pozorovali inhibici antigenní prezentace. Inhibice funkce této proteasy jsme vybrali záměrně, jelikož vykazuje proteolytickou aktivitu ve velkém rozmezí pH hodnot a předpokládá se, že hraje ústřední roli ve vakuolární dráze cross-presentace. Nicméně v našich pokusech jsme zaznamenali určitý vliv inhibice této proteasy při prezentaci peptidů v kontextu MHC gp II. Tato inhibice ovšem nemusí znamenat přímý podíl této proteasy na degradaci polyomavírových částic, ale rovněž může souviset se samotným vyzráváním MHC gp II, jak již bylo dříve popsáno autory Saegusa et al. (2002). Efekt inhibice této proteasy jsme především chtěli sledovat při *in vitro* proliferačních analýzách CD8⁺ T buněk, které se ovšem nepodařilo dokončit do sepisování této práce. Stejně záměry jsme měli i se

selektivním **inhibitorem proteosomální aktivity – epoxomicinem**. Jeho účinek jsme chtěli studovat rovněž při presentaci přes MHC gp I, o to víc pro nás bylo překvapivé, že jeho aplikace měla za následek inhibici proliferace CD4⁺ T buněk. Dřívější výsledky z naší laboratoře ukázaly, že frakce polyomavirových částic 6-8 h po pseudoinfekci lokalizují s ubiquitinem (Bouře et al., 2005). Již tyto výsledky naznačily, že zpracování a cross-presentace peptidů odvozených od polyomavirových částic se bude odehrávat klasickou "**endosom-cytosol**" dráhou. Možná v případě polyomavirových částic by bylo lepší poopravit na "**endosom-endoplasmatické retikulum-cytosol**" dráhu. Z jakého důvodu však aplikace proteosomálního inhibitoru má vliv na presentaci exogenních peptidů odvozených z polyomavirových částic v dráze MHC gp II prozatím nevíme. Ohromnou nevýhodou těchto pokusů je nepřítomnost antigenního peptidu neseného našimi virovými částicemi, který bychom jsme mohli v *in vitro* pokusech rozetnat pomocí antigen-specifických T buněk. V současné době se nám otevřely nové možnosti v tomto směru, neboť v naší laboratoři byly připraveny polyomavirové částice nesoucí antigen chronické myeloidní leukémie – zlomové místo Bcr-Abl (Mgr. V. Boháčová). Proti tomuto antigenu jsou již vytvořené transgenní buněčné linie T lymfocytů, které by bylo možno použít pro studium mechanismů zpracování a presentace antigenních peptidů. Tento směr vývoje nám pravděpodobně odhalí skutečné mechanismy antigenní presentace polyomavirových částic.

6.2 Nosiče antigenů odvozené od myšího polyomaviru a jejich imunoterapeutické aplikace

Do antigenních nosičů odvozených od myšího polyomaviru jsou vkládány racionální naděje, neboť v lidské populaci nekolují neutralizační protilátky a není přítomna buněčná imunita proti tomuto viru. Naše pokusy se "zelenými" polyomavirovými částicemi jasně prokázaly, že tyto částice jsou efektivně přijímány a zpracovávány dendritickými buňkami a antigenní peptidy od nich odvozené jsou presentovány jak **pomocným CD4⁺, tak i efektorovým CD8⁺ T lymfocytům**. Separátní proliferační analýzy s CD8⁺ T lymfocyty naznačují, že peptidy odvozené od těchto virových částic jsou účelně cross-presentovány dendritickými buňkami, což jim umožňuje stimulovat efektorové CD8⁺ T buňky (angl. cross-priming). V našich analýzách jsme jako modelový antigen nesený uvnitř pseudokapsid sledovali protein EGFP, který je fúsován s C-koncovou částí proteinu VP3. Použití tohoto antigenu pro imunologické analýzy je poněkud nešťastné, neboť nejsou k dispozici žádné transgenní EGFP-specifické linie T lymfocytů,

pomocí kterých by bylo možno nejlépe ověřit antigenní prezentaci. Nicméně z našich výsledků je patrné, že i neinvazivní intranasální aplikace "zelených" virových částic indukuje v těle imunizovaných myši buněčně zprostředkovanou imunitu jak proti proteinu VP1, tak i proti modelovému EGFP proteinu. Pomocí *ex vivo* proliferačních pokusů jsme prokázali přítomnost těchto antigen-specifických T lymfocytů ($CD4^+$ i $CD8^+$), které rovněž specificky produkovaly cytokiny IL-2 a INF- γ . Naše výsledky ukazují, že aplikace antigenu (EGFP) konjugovaného s polyomavirovými částicemi indukuje silnější buněčnou imunitu proti EGFP ve srovnání s imunizací samotným rEGFP. V práci Tegerstedt et al. (2006) testovali rovněž polyomavirové částice, které však již nesly skutečný onkoprotein Her2 fúsováný s N-koncem proteinu VP2. Jejich výsledky rovněž hovoří ve prospěch imunoadjuvantních vlastností polyomavirových částic. Již jedna imunizace VP1+Her2-VP2 částicemi chránila myši (Balb/c) před rozvojem nádoru indukovaného letální dávkou transformovaných buněk D2F2/E2.

Podobně jako v našich pokusech, tak i v práci Tegerstedt et al. (2006) byla zaznamenána v imunizovaných myších indukce vysoké hladiny neutralizačních protilátek proti proteinu VP1. Na druhou stranu, přítomnost protilátek proti nesenému antigenu (EGFP či Her2) nebyla zjištěna. Silná produkce neutralizačních protilátek proti VP1 proteinu může být jistou nevýhodou tohoto antigenního nosiče, obzvláště pak při jeho následných použití. Tento negativní efekt polyomavirových částic se snažili eliminovat ve své práci Tegerstedt et al. (2006), kde imunizovali myši dendritickými buňkami ošetřenými polyomavirovými částicemi nesoucími Her2 onkoprotein. Tento způsob imunizace následně opět plně ochránil myši před vznikem nádoru z D2F2/E2 buněk. Zároveň byla snížena přibližně 6 \times hladina protilátek proti VP1 proteinu ve srovnání s přímou aplikací polyomavirových částic. Tento způsob imunizace pomocí dendritických buněk prezentujících příslušné antigenní peptidy výrazně snížil spotřebu polyomavirových částic. Zatímco na jednu aplikaci samotných VLP částic je potřeba 50 μ g, při podání dendritických buněk (2×10^5) stačí k jejich ošetření pouze 5 μ g virových částic.

V našich pokusech jsme kromě samotné proliferační aktivity a produkce cytokinů IL-2 a INF- γ chtěli ověřit i cytotoxické aktivity T lymfocytů. Pro tento účel jsme použili cytotoxický *in vivo* test, kdy jsme vpravovali do ocasní žily imunizovaných a kontrolních myši ekvivalentní směs syngenních splenocytů. Tato směs obsahovala polovinu buněk, které byly ošetřeny EGFP-VLP částicemi, druhá polovina buněk byla kontrolních. Každá populace buněk byla značena do jiné míry pomocí CFSE (při různých koncentracích CFSE). Při tomto uspořádání pokusu jsme se setkali se skutečností,

že i v kontrolních (naivních) myších vždy mizela určitá část splenocytů prezentujících peptidy z VLP částic. V lymfatických uzlinách dosahoval úbytek až 36 % specifického zabití. Tento efekt ve své práci nepozorovali Esslinger et al. (2003), kteří rovněž používali obdobnou strategii pro hodnocení cytotoxické aktivity $CD8^+$ T lymfocytů. Nicméně i v imunizovaných myších jsme čekali vyšší míru specifického zabití než dosažených 25 % ve slezinách a 56 % v lymfatických uzlinách. Možnou příčinou nízké intenzity vybití příslušných cílových buněk je způsob imunizace myší. V našich pokusech jsme používali intranasální způsob imunizace, který není tak agresivní. V současné době pracujeme na opakování těchto pokusů s tím, že aplikujeme polyomavirové částice podkožní imunizací. Tento způsob imunizace používali i autoři Esslinger et al. (2003).

6.3 Patogenní mikroorganismy a regulační T buňky

Imunologická tolerance, tj. nevnímavost složek imunitního systému ke strukturám organismu vlastním, je udržována nejen negativní selekcí autoreaktivních T lymfocytů v centrálních lymfoidních orgánech, ale také jejich kontrolovanou aktivací a expanzí na perifériích. Klíčovou roli v procesu kontroly aktivace/expanse autoreaktivních T lymfocytů mají regulační T (Treg) buňky. Regulační T buňky konstitutivně exprimují molekuly **CD25 (α řetězec IL-2R)**, **CTLA-4** a **transkripční faktor Foxp3** (Ramsdell, 2003). Hlavní vizitkou těchto buněk je jejich schopnost tlumit aktivaci efektorových T buněk. Přesný mechanismus jejich účinku není prozatím znám, avšak velkou roli v něm hrají CTLA-4 a produkce protizánětlivých cytokinů (Fehervari a Sakaguchi, 2004). Treg buňky produkující CTLA-4 mohou ovlivňovat vlastnosti profesionálních antigen prezentujících buněk díky indukci exprese tryptofan katabolizujícího enzymu indolamin 2,3-dioxygenasy (IDO). Takto indukované antigen prezentující buňky se potom chovají poněkud utluměně a mají supresivní účinky (Munn et al., 2004). Není divu, že řada virových a bakteriálních patogenů se nějakým způsobem snaží ovlivnit hladinu, distribuci či funkce těchto regulačních T buněk.

U pacientů chronicky infikovaných retrovirem **HIV-1**, kterým byly odstraněny z krve Treg buňky bylo zaznamenáno výrazné zvýšení protivirově laděné cytotoxické aktivity CTL buněk (Aadahl et al., 2004). Byly prokázány redistribuce a významné zvýšení hladiny $CD25^+Foxp3^+$ T buněk v krvi pacientů s chronickou infekcí HIV-1 (Andersson et al., 2005). V naší práci jsme se pokusili zmapovat hladiny $Foxp3^+$ Treg buněk ve slezinách a lymfatických uzlinách imunizovaných (EGFP-VLP částicemi) myší. Tyto

pilotní pokusy ukázaly, že v imunizovaných myších došlo k mírnému poklesu ($\Delta = \sim 2\%$) $CD25^+Foxp3^+$ v rámci populace $CD4^+$ T buněk ve srovnání s hladinou $CD25^+Foxp3^+$ T buněk u naivních myší. V lymfatických uzlinách tento trend nebyl pozorován. V poslední době byl podobný efekt pozorován při aplikaci ADP-ribosylačního toxinu bakterie *Bordetella pertussis* (Cassan et al., 2006). Tito autoři poukazují na snížení hladiny dominantní populace Treg ($CD25^+Foxp3^+$) buněk ve slezinách myší, kterým byl podán tento toxin do ocasní žíly. Snížení hladiny Treg buněk ve slezinách mělo dočasný charakter, nejvýraznější rozdíl byl zaznamenán 3 dny po aplikaci toxinu, po 2-4 týdnech byl tento rozdíl téměř nulový. Snížení populace $Foxp3^+$ T buněk ve slezině bylo v jejich pokusech spjato s preferenčním stěhováním těchto buněk do jater. Mechanismus účinku snížení $Foxp3^+$ T buněk autoři přičítají jeho ADP-ribosylační aktivitě, která by mohla interferovat se signalizací IL-2R v Treg buňkách. V našich pokusech jsme vždy stanovovali hladinu $Foxp3^+$ Treg buněk 2 týdny po intranasální aplikaci EGFP-VLP částic, tudíž v následujících pokusech bychom se chtěli zaměřit na kratší časy po aplikaci. Prozatím nevíme, zda má úbytek $CD25^+Foxp3^+$ T buněk přímou souvislost s vyšší mírou proliferace $CD8^+$ T buněk z imunizovaných myší ve srovnání s $CD8^+$ T buňkami naivních myší viz obr. 5.17. Velice zajímavé bude v našich experimentech ověřit, zda samotný myší polyomavirus navozující perzistentní infekci nebude nějakým způsobem ovlivňovat Treg populace podobně jako HIV-1. V případě, že by se prokázalo ovlivnění těchto regulačních T buněk v infikovaných myších, vyvstaly by nové pohledy na patogenezi chorob vyvolaných lidskými polyomaviry.

6.3 Produkce netoxické formy cholerového toxinu v hmyzích buňkách

Je tomu již 25 let co Jobling a Holmes (1992) jako první ukázali na možnost vytvářet chiméry odvozené od cholerového toxinu, ve kterých byla CTA2 podjednotka fúsována s cizími polypeptidy. Tyto chiméry byly velice stabilní, fúsní protein perfektně asocioval s CTB pentamerem a celý komplex se vázal na GM1 gangliosidy jako v případě intaktní makromolekuly cholerového toxinu. Od té doby celá řada autorů připravila několik chimerických komplexů odvozených od cholerového toxinu či teplotně labilního toxinu *E. coli* (Sultan et al., 1998; Lee et al., 2003). V posledních letech vzrostl celosvětově zájem o tyto unikátní proteinové komplexy, zejména pro jejich potencionální využití jako nosiče antigenů či jiných nízkomolekulárních látek do savčích buněk, dále pro

léčbu autoimunitních chorob či alespoň jako nástroje pro studium vnitrobuněčných transportů.

Naše pracovní skupina se rovněž začala zajímat o tyto velmi slibné toxiny, zejména jako potenciální nosiče polypeptidů. Pro tento účel jsme si vybrali cholero­vý toxin. V naší laboratoři máme široké zkušenosti s expresí rekombinantních proteinů v hmyzích buňkách. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli připravit rekombinantní bakulo­viry produkující příslušné proteiny tohoto toxinu a ověřit možnost jeho produkce v hmyzích buňkách. Připravili jsme expresní kazetu, která obsahovala jak gen pro CTB podjednotku pod polyhedrinovým promotorem, tak gen pro CTA2 podjednotku pod promotorem p10. V dalším kroku jsme jako modelový antigen fúsovali gen pro EGFP protein k N-koncové části CTA2 podjednotky. Rekombinantní bakulovirus nesoucí tuto expresní kazetu skutečně produkoval oba tyto proteiny. Pomocí imunochemické analýzy a fluorescenční mikroskopie byla potvrzena produkce těchto proteinů. Z následných analýz jsme zjistili, že nejvyšší obsah těchto proteinů je dosažen v intervalu 64-72 h po infekci. Většina autorů popisujících produkci cholero­vého toxinu v některých z heterologních systému používala pro jeho purifikaci afinitní chromatografii, kde se tento toxin selektivně vychytává na imobilizovanou D-galaktosu (Tinker et al., 2005). V našich snahách izolovat tento toxin z hmyzích buněk jsme rovněž využili tohoto systému. Bohužel jsme se však setkali s velmi nízkými výtežky purifikace. Příčinou tohoto nezdaru mohou být strukturní změny v místě vazby cholero­vého toxinu k D-galaktose způsobené některými posttranslačními modifikacemi. Většina prací zabývajících expresí cholero­vého toxinu pracuje s bakteriálními systémy, kde k těmto případným modifikacím nedochází. Při dalších pokusech s purifikací antigenního nosiče odvozeného od cholero­vého toxinu bychom chtěli využít jinou strategii, např. iontoměničovou chroma­tografii, která byla použita v práci Fingerut et al. (2005) při izolaci enterotoxinu *E. coli*. Tito autoři využili pro produkci této vakcíny založené na bakteriálním enterotoxinu rovněž eukaryotní expresní systém, konkrétně kvasinku *Pichia pastoris*.

Pomocí SDS-elektroforézy při použití vzorkových pufrů bez redukčního činidla (β -merkaptetanolu) se nám podařilo prokázat, že protein CTB v hmyzích buňkách formuje pentamerní struktury. Produkované proteiny (CTB a EGFP-CTA2) byly homogenně rozptýleny v hmyzích buňkách, nebyla pozorována žádná koncentrace do některých buněčných kompartmentů. Netoxickou formu cholero­vého toxinu bychom rádi, kromě přípravy kandidátních vakcín, použili i pro srovnávací analýzy endocytických drah s polyomaviry (např. virus SV40 rozeznává stejný receptor – GM1 gangliosid).

Kapitola 7

SOUHRN

7.1 Interakce umělých polyomavirových částic s myšími dendritickými buňkami

- V hmyzích buňkách byly produkovány polyomavirové částice složené buď pouze z hlavního strukturního proteinu VP1 či chimerické pseudokapsidy sestavené jak z proteinu VP1, tak i fúsního proteinu EGFP-tVP3. Částice byly purifikovány ultracentrifugací v hustotních gradientech CsCl a sacharosy. Izolované frakce tzv. "prázdných" a "plných" pseudokapsid byly následně detailně charakterizovány za použití elektronové mikroskopie, SDS-polyakrylamidové elektroforézy a imunochemické analýzy.
- V *in vitro* analýzách byly sledovány fenotypové a funkční znaky maturace myeloidních dendritických buněk po jejich interakci s polyomavirovými částicemi. Z našich pokusů vyplývá, že pouze při vyšších poměrech $>10^5$ VLP částic/DC dochází ke zvýšení povrchové exprese MHCgp II a kostimulačních molekul CD80 a CD86. V pokusech nebyl pozorován rozdíl mezi tzv. "prázdnými" a "plnými" polyomavirovými pseudokapsidami ve schopnosti indukovat znaky maturace dendritických buněk. Ani kvalita purifikačního procesu neovlivnila míru aktivace dendritických buněk.
- Virové částice odvozené od myšího polyomaviru stimulují dendritické buňky ke specifické produkci cytokinu IL-12. V pokusech byla pozorována pozitivní korelace mezi množstvím VLP částic/DC a produkcí tohoto klíčového prozánětlivého cytokinu polarizujícího imunitní odpovědi ve směru Th1.
- Inhibiční pokusy naznačily, že zpracování a prezentace antigenních peptidů odvozených od polyomavirových částic je závislá na kyselém pH endolysosomálních kompartmentů a proteosomální aktivitě.

7.2 Chování "zelených" polyomavirových částic v tělech imunizovaných myší

- Při intranasální aplikaci "zelených" polyomavirových částic dochází k produkci neutralizačních protilátek proti proteinu VP1. V sérech imunizovaných myší nebyla prokázána přítomnost protilátek proti přenášenému antigenu – EGFP proteinu.

- Při *ex vivo* proliferacích bylo zjištěno, že v imunizovaných myších vznikají jak VP1, tak i EGFP specifické CD4⁺ i CD8⁺ T lymfocyty. Rovněž byl prokázán imunoadjuvatní charakter polyomavirových částic ve srovnání s restimulací T lymfocytů samotným rekombinativním EGFP proteinem. Byla prokázána produkce IL-2 a INF- γ EGFP-VLP specifickými T lymfocyty.
- Ve slezinách imunizovaných myší byl zaznamenán mírný pokles regulačních CD4⁺CD25⁺ T buněk oproti s kontrolním myším. Největší pokles ($\Delta = \sim 2\%$) byl zjištěn u CD25⁺Foxp3⁺ Treg buněk. V lymfatických uzlinách tento úbytek pozorován nebyl. Tyto pilotní pokusy naznačují, že polyomavirové částice nějakým způsobem redistribují populace Treg buněk v těle svého hostitele.
- Zavedli jsme neradioaktivní *in vivo* cytotoxický test, který prokázal přítomnost efektorových cytotoxických CD8⁺ T buněk v imunizovaných myších. Pozorovali jsme i nepředpokládané zabíjení cílových buněk v neimunizovaných myších. Příčinu tohoto efektu prozatím neznáme. Účinnost specifického vybíjení cílových buněk byla nízká. V následujících pokusech budeme imunizovat myši podkožní aplikací, která vyvolává intenzivnější imunitní odpověď.

7.3 Příprava expresní kazety pro simultánní produkci VP1 a t-VP3 proteinů myšího polyomaviru

- Pro účely produkce chimerických polyomavirových částic nesoucích cizí antigeny jako fúzní protein s C-koncovou doménou VP3 proteinu byla připravena příslušná expresní kazeta. Do donorového plasmidu pFastBac DUAL (Bac-to-Bac expression system) byly vloženy nukleotidové sekvence pro VP1 protein a zkrácenou verzi proteinu VP3 (t-VP3). Gen pro VP1 protein byl vložen pod silný polyhedrinový promotor, zatímco gen pro t-VP3 byl umístěn pod další silný promotor p10. Tento vektor již posloužil jako výchozí konstrukt pro přípravu chimerických polyomavirových částic nesoucích antigeny chronické myeloidní leukémie (Mgr. V. Boháčová).
- Byl připraven vektor pFastBac DUAL-insVP1, kde byl vložen mutovaný gen pro VP1 protein myšího polyomaviru pod polyhedrinový promotor. Tento vektor by měl sloužit pro přípravu polyomavirových částic nesoucích cizí epitopy v HI smyčce VP1 proteinu. V případě vložení genu t-VP3 pod p10 promotor do tohoto vektoru bude možné vytvářet polyomavirové částice nesoucí cizí antigeny jak v HI smyčce VP1 proteinu, tak i jako fúzní protein s C-koncovou částí proteinu VP3.

7.4 Exprese a charakterizace netoxické "zelené formy" cholerového toxinu v hmyzích buňkách

- S cílem připravit nosič antigenů odvozený od cholerového toxinu bylo vytvořeno několik expresních vektorů na bázi plasmidu pFastBac DUAL (Bac-to-Bac expression system). Pod polyhedrinový promotor tohoto vektoru byl klonován gen pro B podjednotku cholerového toxinu. Pod protilehlý promotor p10 byla vložena modifikovaná sekvence pro CTA2 podjednotku cholerového toxinu. Do zavedeného klonovacího místa na 5'-konci genu pro CTA2 byla vložena nukleotidová sekvence pro modelový antigen – EGFP protein.

- Na základě připravených donorových plasmidů byly vytvořeny rekombinantní bakuloviry: rBac-CTB+mCTA2 a rBac-CTB+EGFP-CTA2. Pomocí fluoresceční a imunofluoresceční mikroskopie byla prokázána produkce těchto proteinů v hmyzích buňkách. Produkce CTB a EGFP-CTA2 proteinů byla rovněž potvrzena z použití SDS-elektroforézy a imunochemické analýzy. S využitím SDS-elektroforézy v nepřítomnosti redukčního činidla (β -merkaptoetanolu) bylo prokázáno, že protein CTB vytváří v hmyzích buňkách pentamerní útvary.
- Pro purifikaci komplexu cholerového toxinu byla použita afinitní chromatografie. Nicméně jsme se setkali s nízkou vazbou cholerového toxinu k náplni kolony (D-galaktose), která byla zřejmě příčinou neúspěchu purifikačního postupu. V současné době hledáme vhodnou alternativní metodu pro izolaci netoxické formy cholerového toxinu.

8. Seznam použité literatury

- Aandahl E. M., Michaelsson J., Moretto W. J., Hecht F. M., Nixon D. F. (2004). Human CD4+CD25+ regulatory T cells control T-cell responses to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens. *J. Virol.* 78:2454-2462
- Abbing A., Blaschke U. K., Grein S., Kretschmar M., Stark C. M., Thies M. J., Walter J., Weigand M., Woith D. C., Hess J., Reiser C. O. (2004). Efficient intracellular delivery of a protein and a low molecular weight substance via recombinant polyomavirus-like particles. *J. Biol. Chem.* 279: 27410-27421
- Airenne, K. J., M. O. Hiltunen, M. P. Turunen, A. M. Turunen, O. H. Laitinen, M. S. Kulomaa, and S. Yla-Herttuala. 2000. Baculovirus-mediated periadventitial gene transfer to rabbit carotid artery. *Gene Ther.* 7:1499-1504.
- Alignani D., Maletto B., Liscovsky M., Rópolo A., Morón G., Pistoiresi-Palencia M. C. (2005). Orally administered OVA/Cpg-ODN induces specific mucosal and systemic immune response in young and aged mice. *J. Leukoc. Biol.* 77:
- Alvarez C. P., Lasala F., Carrilo J., Muniz O., Corbi A. I., Delgado R. (2002). C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN mediate cellular entry by Ebola virus in cis and in trans. *J. Virol.* 76: 6841-6844
- Anderson H. A., Chen Y., Norkin L. C. (1998). Major histocompatibility complex class I molecules are enriched in caveolae but do not enter with simian virus 40. *J. Gen. Virol.* 79:1469-1477
- Andersson J., Boasso A., Nilsson J., Zhang R., Shire N. J., Lindback S., Shearer G. M., Chougnet C. A. (2005). The Prevalence of Regulatory T Cells in Lymphoid Tissue Is Correlated with Viral Load in HIV-Infected Patients. *J. Immunol.* 174: 3143-3147
- Arnautova I., Jackson C. L., Al-Awar O. S., Donaldson J. G., Loh Y. P. (2003). Recycling of Raft-associated prohormone sorting receptor carboxypeptidase E requires interaction with ARF6. *Mol. Biol. Cell* 14: 4448-4457
- Badizadegan K., Wolf A. A., Rodighiero C., Jobling M., Hirst T. R., Holmes R. K., Lencer W. I. (2000). Floating cholera toxin into epithelial cells: functional association with caveolae-like detergent-insoluble membrane microdomains. *Int. J. Med. Microbiol.* 290: 403-408
- Barackman J. D., Ott G., Pine S., O'Hagan D. T. (2001). Oral administration of influenza vaccine in combination with the adjuvants LT-K63 and LT-R72 induces potent immune responses comparable to or stronger than traditional intramuscular immunization. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8: 652-657
- Barouch D. H., Harrison S. C. (1994). Interactions among the major and minor coat proteins of polyomavirus. *J. Virol.* 68: 3982-3989
- Barr S. M., Keck K., Aposhian H. V. (1979). Cell-free assembly of a polyoma-like particle from empty capsid and DNA. *Virology* 96: 656-659
- Barsoum, J., R. Brown, M. McKee, and F. M. Boyce. 1997. Efficient transduction of mammalian cells by a recombinant baculovirus having the vesicular stomatitis virus G glycoprotein. *Hum. Gene Ther.* 8: 2011-2018
- Bergquist C., Lagergard T., Lindblad M., Holmgren J. (1995). Local and systemic antibody responses to dextran-cholera toxin B subunit conjugates. *Infect. Immun.* 63: 2021-2025
- Bergquist C., Lagergard T., Holmgren J. (1997). AnticARRIER immunity suppresses the antibody response to polysaccharide antigens after intranasal immunization with the polysaccharide-protein conjugate. *Infect. Immun.* 65: 1579-1583
- Berzofsky J. A., Terabe M., Oh S., Belyakov I. M., Ahlers J. D., Janik J. E., Morris J. C. (2004). Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer. *J. Clin. Invest.* 113: 1515-1525
- Berzofsky J. A., Ahlers J. D., Janik J., Morris J., Oh S., Terabe M., Belyakov I. M. (2004). Progress on new vaccine strategies against chronic viral infections. *J. Clin. Invest.* 114: 450-462

- Bickert T., Wohlleben G., Brinkman M., Trujillo-Vargas M. C., Ruehland C., Reiser C. O. A., Hess J., Erb K. J. (2006). Murine polyomavirus-like particles induce maturation of bone marrow-derived dendritic cells and proliferation of T cells. *Med. Microbiol. Immunol.*
- Bolen J. D., Anders D. G., Trampy J., Consigli R. A. (1981). Differences in the subpopulations of the structural proteins of polyoma virions and capsids: biological function of the VP1 species. *J. Virol.* 37: 80-91
- Bouřa E., Liebl D., Spíšek R., Frič J., Marek M., Štokrová J., Holář V., Forstová J. (2005). Polyomavirus EGFP-pseudocapsids: Analysis of model particles for introduction of proteins and peptides into mammalian cells. *FEBS Letters* 579: 6549-6558
- Boyce, F. M., and N. L. Bucher. 1996. Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2348-2352.
- Braun H., Boller K., Lower J., Bertling W. M., Zimmer A. (1999). Oligonucleotide and plasmid DNA packaging into polyoma VP1 virus-like particles expressed in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 29: 31-43.
- Brown F. D., Rozelle A. L., Yin H. L., Balla T., Donaldson J. G. (2001). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and Arf6-regulated membrane traffic. *J. Cell Biol.* 154: 1007-1017
- Brown W. L., Mastico R. A., Wu M., Heal K. G., Adams C. J., Murray J. B., Simpson J. C., Lord J. M., Taylor-Robinson A. W., Stockley P. G. (2002). RNA bacteriophage capsid-mediated drug delivery and epitope presentation. *Intervirology* 45: 371-380
- Burzyn D., Rassa J. C., Kim D., Nepomnaschy I., Ross S. R., Piazzon I. (2004) Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by a retrovirus. *J. Virol.* 78: 576-584
- Caplan S., Naslavsky N., Hartnell L. M., Lodge R., Polischuk R. S., Donaldson J. G., Bonifacino J. S. (2002). A tubular EHD1-containing compartment involved in the recycling of major histocompatibility complex class I molecules to the plasma membrane. *EMBO J.* 21: 2557-2567
- Carozzi S., Salit M., Cantaluppi A. (1989). Effect of monophosphoryl A on the in vitro function of peritoneal leukocytes from uremic patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J. Clin. Microbiol.* 27: 1748-1753
- Caruso M., Belloni L., Sthandier O., Amati P., Garcia M. I. (2003). Alpha4beta1 integrin acts as a cell receptor for murine polyomavirus at the postattachment level. *J. Virol.* 77: 3913-3921
- Cassan C., Piaggio E., Zappulla J. P., Mars L. T., Couturier N., Bucciarelli F., Desbois S., Bauer J., Gonzales-Dunia D. Liblau R. S. (2006). Pertussis toxin reduces the number of splenic Foxp3+ regulatory T cells. *J. Immunol.* 177: 1552-1560
- Clements J. D., Hartzog N. M., Lyon F. L. (1988). Adjuvant activity of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and effect on the induction of oral tolerance in mice to unrelated protein antigens. *Vaccine* 6: 269-277
- Cocchi F., DeVico A. L., Garzino-Demo A., Arya S. K., Gallo R. C., Lusso P. (1995). Identification of RANTES, MIP-1 alpha and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 270: 1811-1815
- Copping L. G., Menn J. J. (2000). Biopesticide: a review of their action, applications and efficacy. *Pest Manag. Sci.* 56: 561-676
- Cory J. S., Hirst M. L., Williams L., Halls R. S., Goulson D., Green B. M., Carry T. M., Posse R. D., Cayley P. J., Bishop D. H. I. (1994). Field trial of genetically improved baculovirus insecticide. *Nature* 370: 138-140
- Daniels R., Rusan N. M., Wilbuer A. K., Norkin L. C., Wadsworth P., and Hebert D. N. (2006). Simian virus 40 late proteins possess lytic properties that render them capable of permeabilizing cellular membranes. *J. Virol.* 80: 6575-6587
- Daniels R., Rusan N. M., Wadsworth P., Hebert D. N. (2006). SV40 VP2 and VP3 Insertion into ER Membranes Is Controlled by the Capsid Protein VP1: Implications for DNA Translocation out of the ER. *Mol. Cell* 24: 955-966
- Deeks E. D., Cook J. P., Day P. J., Smith D. C., Roberts L. M., Lord J. M. (2002). The low lysine content of ricin A chain reduces the risk of proteolytic degradation after translocation from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Biochem.* 41: 3405-3413
- Dessens J. T., Lomonosoff G. P. (1993). Cauliflower mosaic virus 35S promoter-controlled DNA copies of cowpea mosaic virus RNAs are infectious on plants. *J. Gen. Virol.* 74: 889-892

- Dickinson B. L., Clements J. D. (1995). Dissociation of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin adjuvancity from ADP-ribosyltransferase activity. *Infect. Immun.* 63: 1617-1623
- Elkabetz Y., Shapira I., Rabinovich E., Bar-Nun S. (2004). Distinct steps in dislocation of luminal endoplasmic reticulum-associated degradation substrates: roles of endoplasmic reticulum-bound p97/Cdc48p and proteasome. *J. Biol. Chem.* 279: 3980-3989
- Elson C. O. (1989). Cholera toxin and its subunits as potential oral adjuvants. *Immunol. Today* 146: 29-33
- Engelmayer J., Larsson M., Subklewe M., Chahroudi A., Cox W. I., Steinman R. M., Bhardawaj N. (1999). Vaccinia virus inhibits the maturation of human dendritic cells: a novel mechanism of immune evasion. *J. Immunol.* 163: 6762-6778
- Eriksson K., Frederiksson M., Nordstom I., Holmgren J. (2003). Cholera toxin and its B subunits promote dendritic cell vaccination with different influence on Th1/Th2 development. *Infect. Immun.* 71: 1740-1747
- Esslinger C., Chapatte L., Finke D., Miconnet I., Guillaume P., Lévy F., MacDonald H. R. (2003). In vivo administration of a lentiviral vaccine targets DCs and induces efficient CD8+ T cell responses. *J. Clin. Invest.* 111: 1673-1681
- Evans, T.G. (2001). A phase I study of a recombinant viruslike particle vaccine against human papillomavirus type 11 in healthy adult volunteers. *J. Infect. Dis.* 183: 1485-1493
- Fausch S.C., Da Silva D. M., Kast W. M. (2003) Differential uptake and cross-presentation of human papillomavirus virus-like particles by dendritic cells and Langerhans cells. *Cancer Res.* 63: 3478-3482
- Fehervari Z., Sakaguchi S. (2004). CD4+ Tregs and immune control. *J. Clin. Invest.* 114:1209-1214
- Fingerut E., Gutter B., Meir R., Eliahoo D., Pitcovski J. (2005). Vaccine and adjuvant activity of recombinant subunit B of *E. coli* enterotoxin produced in yeast. *Vaccine* 23: 4685-4696
- Fontenot J. D., Rasmussen J. P., Williams L. M., Dooley J. L., Farr E. G., Rudensky A. Y. (2005). Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* 22: 329-341
- Forstová J. (1996). Habilitační práce, PŘF UK Praha
- Forstová J., Krauzewicz N., Sandig V., Elliot J., Páková Z., Strauss M., Griffin B. E. (1995). Polyoma virus pseudocapsids as efficient carriers of heterologous DNA into mammalian cells. *Hum. Gene Ther.* 6: 297-306
- French T. J. (1990). Assembly of double-shelled, virus-like particles of bluetongue virus by the simultaneous expression of four structural proteins. *J. Virol.* 64:5695-5700
- Freytag L. C., Clements J. D. (2005). Mucosal adjuvants. *Vaccine* 23: 1804-1813
- Fujinaga Y., Wolf A. A., Rodighiero C., Wheeler H., Tsai B., Allen L., Jobling M. G., Rapoport T., Holmes R. K., Lencer W. I. (2003). Gangliosides that associate with lipid rafts mediate transport of cholera and related toxins from the plasma membrane to ER. *Mol. Biol. Cell* 14: 4783-4793
- Gagliardi M. C., Sallusto F., Marinaro M., Langenkamp A., Lanzavecchia A., De Magistris M. T. (2000). Cholera toxin induces maturation of human dendritic cells and licenses them for Th2 priming. *Eur. J. Immunol.* 30: 2394-2403
- Gagliardi M. C., De Magistris M. T. (2003). Maturation of human dendritic cells induced by the adjuvant toxin: role of cAMP on chemokine receptor expression. *Vaccine* 21: 856-861
- Gagnon E., Duclos S., Rondeau C., Chevet E., Cameron P. H., Steele-Mortimer O., Paiement J., Bergeron J. J., Desjardins M. (2002). Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell* 110: 119-131
- Garcea R. L., Salunke D. M., Caspaar D. L. (1987). Site-directed mutation affecting polyomavirus capsid self-assembly in vitro. *Nature* 329: 86-87
- Garcea R. L., Gissmann L. (2004). Virus-like particles as vaccines and vessels for the delivery of small molecules. *Curr. Opin. Biotech.* 15: 513-517
- García-Pineros A., Hindelsheim A., Triwett M., Williams M., Wu L., KewalRamani V. N., Pinto L. A. (2006). Role of DC-SIGN in the activation of dendritic cells by HPV-16 L1 virus-like particle vaccine. *Eur. J. Immunol.* 36: 437-445
- Geijtenbeek T. B., Kwon D. S., Torensma R., van Vliet, van Duijnhoven G. C., Middel J., Cornelissen I. L. (2000). DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1 binding protein enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100: 587-597

- Gerber S., Lane C., Brown D. M., Lord E., Dilorenzo M., Clements J. D., Rybicki E., Williamson A. L., Rose R. C. (2001). Human papillomavirus virus-like particles are efficient oral immunogens when coadministered with Escherichia coli heat-labile enterotoxin mutant R192G or CpG DNA. *J. Virol.* 75: 4752-4760
- Gilbert J. M., Benjamin T. L. (2000). Early steps of polyomavirus entry into cells. *J. Virol.* 74:8582-8588
- Gilbert J. M., Benjamin T. L. (2004). Uptake pathway of polyomavirus via ganglioside GD1a. *J. Virol.* 78: 12259-12267
- Girardin S. E., Boneca I. G., Viala J., Chamaillard M., Labigne A., Thomas G. (2003). Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J. Biol. Chem.* 278: 8869-8872
- Gleiter S., Stubenrauch K., Lilie H. (1999). Changing the surface of a virus shell fusion of an enzyme to polyoma VP1. *Protein Sci.* 8: 2562-2569
- Gleiter S., Lilie H. (2001). Coupling of antibodies via protein Z on modified polyoma virus-like particles. *Protein Sci.* 10: 434-444
- Gleiter S., Lilie H. (2003). Cell-type specific targeting and gene expression using a variant of polyoma VP1 virus-like particles. *Biol. Chem.* 384: 247-255
- Greenstone H. L., Nieland J. D., de Visser K. E., De Bruijn M. L., Kirnbauer R., Roden R. B., Lowy D. R., Kast W. M., Schiller J.T. (1998). Chimeric papillomavirus virus-like particles elicit antitumor immunity against the E7 oncoprotein in an HPV16 tumor model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95: 1800-1805
- Griffith G. P., Griffith D. L., Rayment I., Marakami W. T., Caspar D. L. D. (1992). Inside polyomavirus at 25 Å resolution. *Nature* 355: 652-654
- Gussow D., Clackson T. (1989). Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acid Res.* 17: 3989-4000
- Hagensee E. M., Yaegashi N., Galloway D. A. (1993). Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins. *J. Virol.* 67: 315-322
- Harandi A. M., Eriksson K., Holmgren J. (2003) A protective role of locally administered immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotide in mouse model of genital herpes infection. *J. Virol.* 77: 953-962
- Harandi A. M., Holmgren J. (2004). CpG DNA as a potent inducer of mucosal immunity: implications for immunoprophylaxis and immunotherapy of mucosal infection. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 5: 141-145
- Hazes B., Read R. J. (1997). Accumulating evidence suggests that several AB-toxins subvert the endoplasmic reticulum-associated protein degradation pathway to enter target cells. *Biochemistry* 36: 11051-11054
- Hilleman M. R. (2001). Overview of the pathogenesis, prophylaxis and therapeutics of viral hepatitis B, with focus on reduction to practical applications. *Vaccine* 19: 1837-1848
- Hoare, J., S. Waddington, H. C. Thomas, C. Coutelle, and M. J. McGarvey (2005). Complement inhibition rescued mice allowing observation of transgene expression following intraportal delivery of baculovirus in mice. *J. Gene Med.* 7:325-333
- Hofman C., Sandig V., Jennings G., Rudolph M., Schlag P., Strauss M. (1995). Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 10099-10103.
- Hořejší V., Bartůňková J. (2002). *Základy imunologie* (2. vydání). Nakl. TRITON, 260 str.
- Chang D., Cai X., Consigli R. A. (1993). Characterization of the DNA binding properties of polyomavirus capsid protein. *J. Virol.* 67: 6327-6331
- Chen X. S., Stehle T., Harrison S.C. (1998). Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry. *EMBO J.* 17, 3233.3240
- Childers N. K., Miller K. L., Tong G. (2000). Adjuvant activity of monophosphoryl lipid A for nasal and oral immunization with soluble or liposome-associated antigen. *Infect. Immun.* 68: 5509-5516
- Chromy L. R., Pipas J. M., Garcea R. L. (2003). Chaperone-mediated in vitro assembly of Polyomavirus capsids. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 100: 10477-10482

- Isomura I., Yasuda Y., Tsujimura K., Takahashi T., Tochikubo K., Morita A. (2005). Recombinant cholera toxin B subunit activates dendritic cells and enhances antitumour immunity. *Microbiol. Immunol.* 49: 79-87
- Jackson M. E., Simpsom J. C., Girod A., Pepperkok R., Roberts L. M., Lord J. M. (1999). The KDEL retrieval system is exploited by *Pseudomonas* exotoxin A, but not by Shiga-like toxin-I, during retrograde transport from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Sci.* 112: 467-475
- Jarosch E., Geiss-Friedlander R., Meusser B., Walter J., Sommer T. (2002). Protein dislocation from the endoplasmic reticulum--pulling out the suspect. *Traffic* 3: 530-536
- Jobling M. G., Holmes R. K. (1992). Fusion proteins containing the A2 domain of cholera toxin assemble with B polypeptides of cholera toxin to form immunoreactive and functional holotoxin-like chimeras. *Infect. Immun.* 60: 4915-4924
- Kahn R. A., Gilman A. G. (1984). ADP-ribosylation of Gs promotes the dissociation of its alpha and beta subunits. *J. Biol. Chem.* 259: 6235-6240
- Kalinski P., Hilkens C. M., Wierenga E. A., Kapsenberg M. L. (1999). T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of the third signal. *Immunol. Today* 20: 561-567
- Kang S. M., Yao Q., Guo L., Compans R. W. (2003). Mucosal immunization with virus-like particles of Simian immunodeficiency virus conjugated with cholera toxin subunit B. *J. Virol.* 77: 9823-9830
- Kim T. W., Lee J. H., Hung Ch., Peng S., Roden R., Wang M., Wiscidi R., Tsai Y., He L., Chen P., Boyd D. A. K., Wu T. C. (2004). Generation and characterization of DNA vaccines targeting the nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J. Virol.* 78: 4638-4645
- Kimchi-Sarfaty C., Arora M., Sandalon Z., Oppenheim A., Gottesman M. M. (2003) High cloning capacity of in vitro packaged SV40 vectors with no SV40 virus sequences. *Hum. Gene Ther.* 14:167-177.
- King L. A., Possee R. B. (1992). The baculovirus expression system: a laboratory guide. Chapman and Hill, New York, 229 str.
- Kitagawa, Y., H. Tani, C. K. Limn, T. M. Matsunaga, K. Moriishi, and Y. Matsuura. 2005. Ligand-directed gene targeting to mammalian cells by pseudotype baculoviruses. *J. Virol.* 79: 3639-3652
- Koopmann J. O., Albring J., Huter E., Bulbuc N., Spee P., Neefjes J., Hammerling G. J. (2002). Export of antigenic peptides from the endoplasmic reticulum intersects with retrograde protein translocation through the Sec61p channel. *Immunity* 13: 117-27
- Koutsky L. A., Ault K. A., Wheeler C. M., Brown D. R., Barr E., Alvarez F. B., Chiacchierini L. M., Jansen K. U. (2002). A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N. Engl. J. Med.* 347: 1645-1651
- Krieg A. M., Wu T., Weeratna R. (1998). Sequence motifs in adenoviral DNA block immune activation by stimulatory CpG motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 12631-12636
- Krieg A. M., Davis H. L. (2001). Enhancing vaccine with immunestimulatory CpG DNA. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 3: 15-24
- Krieg A. M. (2002). CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu. Rev. Immunol.* 20: 709-760
- Kurt-Jones E. A., Popova L., Kwinn L., Haynes L. M., Jones L. P., Tripp R. A. (2000) Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat. Immunol.* 1: 398-401.
- Lee S., Halperin S., Salloum D., MacMillan A., Morris A. (2003). Mucosal immunization with a genetically engineered pertussis toxin S1 fragment-cholera toxin subunit A chimeric protein. *Infect. Immun.* 71: 2272-2275
- Lencer W. I., Constable C., Moe S., Jobling M., Webb H. M., Ruston S., Madara J. L., Hirst T., Holmes R. (1995). Targeting of cholera toxin and *E. coli* heat-labile toxin in polarized epithelia: role of C-terminal KDEL. *J. Cell Biol.* 131: 951-962
- Lencer W. I., Tsai B. (2003). The intracellular voyage of cholera toxin: going retro. *Trends Biochem. Sci.* 28: 639-645
- Lenz P., Thompson T. D., Day M. P., Pang Y. Y., Frye S. A., Jensen P. N., Lowy D. R., Schiller J. T. (2001). Papillomavirus-like particles induce acute activation of dendritic cells. *J. Immunol.* 166: 5346-5355

- Levine M. M., Kaper J. B., Black R. E., Clements M. L. (1983). New knowledge on pathogenesis of bacterial enteric infections as applied to vaccine development. *Microbiol. Rev.* 47: 510-550
- Liebl D., Difato F., Horníková L., Mannová P., Štokrová J., Forstová J. (2006). Mouse Polyomavirus Enters Early Endosomes, Requires Their Acidic pH for Productive Infection, and Meets Transferrin Cargo in Rab11-Positive Endosomes. *J. Virol.* 80: 4610-4622
- Liddington R. C., Yan Y., Moulai J., Sahli R., Benjamin T. L., Harrison S. C. (1991). Structure of simian virus 40 at 3,8 Å resolution. *Nature* 354: 278-284
- Lord J. M., Roberts L. M. (1998). Toxin entry: retrograde transport through the secretory pathway. *J. Cell Biol.* 140: 733-736
- Lycke N., Karlsson U., Sjolander A., Magnusson K. E. (1991). The adjuvant effect of cholera toxin is associated with an increased intestinal permeability for luminal antigens. *Scand. J. Immunol.* 33: 691-698
- Lycke N. (2005). From toxin to adjuvant: basic mechanisms for the control of mucosal IgA immunity and tolerance. *Immunol. Letters* 97: 193-198
- Magnuson B., Rainey E.K., Benjamin T., Baryshev M., Mkrtchian S., Tsai B. (2005). ERp29 triggers a conformational change in polyomavirus to stimulate membrane binding. *Mol. Cell* 20: 289-300
- Majoul I., Sohn K., Wieland F. T., Pepperkok R., Pizza M., Hillemann J., Soling H. D. (1996). KDEL receptor (Erd2p)-mediated retrograde transport of the cholera toxin A subunit from Golgi involves COPI, p23, and the COOH terminus of Erd2p. *J. Cell Biol.* 143: 601-612
- Maletto B., Ropolo A., Moron V., Pistoresi-Palencia M. C. (2002). CpG-DNA stimulates cellular and humoral immunity and promotes Th1 differentiation in aged BALB/c mice. *J. Leukoc. Biol.* 72: 447-454
- Mannová P., Forstová J. (2003). Mouse Polyomavirus Utilizes Recycling Endosomes for a Traffic Pathway Independent of COPI Vesicle Transport. *J. Virol.* 77: 1672-1681
- Mao C., Solis D. J., Reiss B. D., Kottmann S. T., Sweeney R. Y., Hayhurst A., Georgiou G., Iverson B., Belcher A. M. (2004). Virus-based toolkit for the directed synthesis of magnetic and semiconducting nanowires. *Science* 303: 213-217
- Martens J. W. M., Honee G., Zuidema D., Lent J. W. M. V., Visser B., Vlak M. (1990). Insecticidal activity of bacterial crystal protein expressed by recombinant baculovirus in insect cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2764-2770
- Massol R. H., Larsen J. E., Fujinaga Y., Lencer W. I., Kirchhausen T. (2004). Cholera toxin toxicity does not require functional Arf6- and dynamin-dependent endocytic pathways. *Mol. Biol. Cell* 15: 3631-3641
- McAleer W. J. (1984). Human hepatitis B vaccine from recombinant yeasts. *Nature* 307: 178-180
- Mendoza R. B., Cantwell M. J., Kipps T. J. (1997). Immunostimulatory effect of a plasmid expressing CD40 ligand (CD154) on gene immunization. *J. Immunol.* 159: 5777-5783
- Miyahara Y., Akiba H., Katae M., Kubota K., Kobayashi S., Takeuchi T., Garcia-Sastre A., Fukuchi Y., Okumura K., Yagita H., Aoki T. (2003). A potent adjuvant effect of ligand to receptor activator of NF κ B gene for inducing antigen-specific CD8⁺ T cell response by DNA and viral vector vaccination. *J. Immunol.* 171: 6344-6348
- Montross L., Watkins S., Moreland R. B., Mamon H., Caspar D. L. D., Garcea R. L. (1991). Nuclear assembly of polyomavirus capsid in insect cells expressing the major capsid protein VP1. *J. Virol.* 65: 4991-4998
- Morón V. G., Rueda P., Sedlik C., Leclerc C. (2003). In vivo, dendritic cells can cross-present virus-like particles using an endosome-to-cytosol pathway. *J. Immunol.* 171: 2242-2250
- Moscardi F. (1999). Assessment of the application of baculoviruses for control of lepidoptera. *Annu. Rev. Entomol.* 44: 257-289
- Mowat A. M., Donachie A. M., Jagewall S. (2001). CTA1-DD-immune stimulating complexes: a novel, rationally designed combined mucosal vaccine adjuvant effective with nanogram doses of antigens. *J. Immunol.* 167: 3398-3405
- Munn D. H., Sharma M. D., Mellor A. L. (2004). Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4⁺ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells. *J. Immunol.* 172: 4100-4111
- Nichols B. J., Kenworthy A. K., Polishchuk R. S., Lodge R., Roberts T. H., Hirschberg K., Phair R. D., Lippincott-Swartz J. (2001). Rapid-cycling of lipid raft markers between the cell surface and Golgi complex. *J. Cell Biol.* 153: 529-541

- Nichols B. J. (2002). A distinct class of endosome mediates clathrin-independent endocytosis to the Golgi complex. *Nat. Cell Biol.* 4: 374-378
- Noad R., Roy P. (2003). Virus-like particles as immunogens. *Trends Microbiol.* 11: 438-444
- Norkin L. C., Anderson H. A., Scott W. A., Oppenheim A. (2002). Caveolar endocytosis of simian virus 40 is followed by brefeldin A-sensitive transport to the endoplasmic reticulum, where the virus disassembles. *J. Virol.* 76:5156-5166
- Orlandi P. A., Fishman P. H. (1998). Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. *J. Cell Biol.* 141: 905-915
- Pattenden L. K., Middelberg A. J., Niebert M., Lipin D. I. (2005). Towards the preparative and large-scale precision manufacture of virus-like particles. *Trends Biotech.* 23: 523-529
- Pelkmans L., Kartenbeck T., Helenius A. (2001). Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two step vesicular-transport pathway to the endoplasmic reticulum. *Nat. Cell Biol.* 3: 473-483
- Porta C., Spall V. E., Findlay K. C., Gergerich R. C., Farrance C.E., Lomonosoff G. (2003). Cowpea mosaic virus-based chimeras. Effects of inserted peptides on the phenotype, host range, and transmissibility of the modified viruses. *Virology* 310: 50-63
- Radhakrishna H., Donaldson J. G. (1997). ADP-ribosylation factor 6 regulates a novel plasma membrane recycling pathway. *J. Cell Biol.* 139: 49-61
- Raghavan R., Nystrom J., Frederiksson M., Holmgren J., Harandi A. M. (2003). Orally administered CpG oligodeoxynucleotide induces production of CXC and CC chemokines in the gastric mucosa and suppresses bacterial colonization in a mouse model of *Helicobacter pylori* infection. *Infect. Immune* 71: 7014-7022
- Ramsdell F. (2003). Foxp3 and natural regulatory T cells: key to a cell lineage? *Immunity* 19:165
- Ramzey J. A., Seema D., Phyllis I. H., Rockford K. D. (2005). p97 is in a complex with cholera toxin and influences the transport of cholera toxin and related toxins to the cytoplasm.
- Rice G., Tang L., Stedman K., Roberto F., Spuhler J., Gillitzer E., Johnson J. E., Douglas T., Young M. (2004). The structure of a thermophilic archaeal virus shows a double-stranded DNA viral capsid type that spans all domains of life. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 7716-7720
- Richards A. A., Stang E., Pepperkok R., Parton. R. G. (2002). Inhibitors of COP-mediated transport and cholera toxin action inhibit simian virus 40 infection. *Mol. Biol. Cell* 13:1750-1764
- Richterová Z., Liebl D., Horák M., Palková Z., Štokrová J., Hozák P., Korb J., Forstová J. (2001). Caveolae are involved in the trafficking of mouse polyomavirus virions and artificial VP1 pseudocapsids toward cell nuclei. *J. Virol.* 75:10880-10891
- Rodighiero C., Tsai B., Rapoport T. A., Lencer W. I. (2002). Role of ubiquitination in retro-translocation of cholera toxin and escape of cytosolic degradation. *EMBO Rep.* 3: 1222-1227
- Rohrmann G. F. (1992). Baculovirus structural proteins. *J. Gen. Virol.*, 73, 749-761.
- Roy S., Luetterforst R., Harding A., Apolloni A., Etheridge M., Stang E., Rolls B., Hancock J. F., Parton F. G. (1999). Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains. *Nat. Cell Biol.* 2: 98-105
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2th ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1056 str.
- Saegusa K., Ishimaru N., Yanagi K., Arakaki R., Ogawa K., Saito I., Katunuma N., Hayashi N. (2002). Cathepsin S inhibition prevents autoantigen presentation and autoimmunity. *J. Clin. Invest.* 110: 361-369
- Salio M., Cella M., Suter M., Lanzavecchia A. (1999). Inhibition of dendritic cell maturation by herpes simplex virus. *Eur. J. Immunol.* 29: 3245-3254
- Salunke D. M., Caspar D. L. D., Garcea R. L. (1986). Self-assembly of purified polyomavirus capsid protein VP1. *Cell* 46: 895-904
- Sandvig K., Van Deurs B. (2002). Membrane traffic exploited by protein toxins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18: 1-24
- Seo N. S., Hollister J. R., Jarvis D. L. (2001). Mammalian glycosyltransferase expression allows sialoglycoprotein production by baculovirus-infected insect cells. *Protein Expr. Purif.* 22:234-41
- Sedlik C., Saron M., Sarraseca J., Casal I., Leclerc C (1997). Recombinant parvovirus-like particles as an antigen carrier: a novel nonreplicative exogenous antigen to elicit protective antiviral cytotoxic T cells. *Proc. Natl. Acad. USA* 94: 7503-7508

- Scott J. D. (2003). A-kinase-anchoring proteins and cytoskeletal signalling events. *Biochem. Soc. Trans.* 31:87-89
- Schlick T.L., Ding Z., Kovacs E. W., Francis M. B. (2005). Dual-surface modification of the tobacco mosaic virus. *J. Am. Chem. Soc.* 127: 3718–3723
- Singh P., Gonzales M. J., Manchester M. (2006). Viruses and their uses in nanotechnology. *Drug Develop. Res.* 67: 23-41
- Sixma T. K., Pronk S. E., Kalk K. H., Wartna E. S., van Zanten B. A. M., Witholt B., Hol W. G. J. (1991). Crystal structure of a cholera toxin-related heat-labile enterotoxin from *E. coli*. *Nature* 351: 371-377
- Sixma T. K., Pronk S. E., Kalk K. H., van Zanten B. A. M., Berghuis A. M., Hol W. G. J. (1992). Lactose binding to heat-labile enterotoxin revealed by X-ray crystallography. *Nature* 355: 561-564
- Schmidt U., Gunter C., Rudolph R., Bohm G. (2001) Protein and peptide delivery via engineered polyomavirus-like particles. *FASEB J.* 15: 1646-1648
- Schmitz A., Herrgen H., Winkeler A., Herzog V. (2000). Cholera toxin is exported from microsomes by the Sec61p complex. *J. Cell Biol.* 148: 1203-1212
- Schneemann A, Young MJ. (2003). Viral assembly using heterologous expression systems and cell extracts. *Adv. Protein Chem.* 64: 1-36
- Snider D. P., Marshall J. S., Perdue M. H., Liang H. (1994). Production of IgE antibody and allergic sensitization of intestinal and peripheral tissues after oral immunization with protein Ag and cholera toxin. *J. Immunol.* 53: 647-657
- Spangler B. D. (1992). Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat labile enterotoxin. *Microbiol. Rev.* 56: 622-647
- Speir J. A., Munshi S., Wang G., Baker T. S., Johnson J. E. (1995). Structures of the native and swollen forms of cowpea chlorotic mottle virus determined by X-ray crystallography and cryoelectron microscopy. *Structure* 3: 63-78
- Štokrová J., Pálková Z., Fischer L., Richterová Z., Korb J., Griffin B. E., Forstová J. (1999). Interactions of heterologous DNA with polyomavirus major structural protein, VP1. *FEBS Lett.* 445: 119-125
- Storni T., Ruedl C., Schwarz K., Schwendener R. A., Renner W. A., Bachmann M. F. (2004). Nonmethylated CG motifs packaged into virus-like particles induce protective cytotoxic T cell responses in the absence of systemic side effects. *J. Immunol.* 172: 1777-1785
- Su Z., Vieweg J., Weizer A. Z., Dahm P., Yancey D., Turaga V., Higgins J., Bockowski D., Gilboa E., Dannull J. (2002). Enhanced induction of telomerase-specific CD4⁺ T. *Cancer Res.* 62: 5041-5048
- Sultan F., Jin L., Jobling M. G., Holmes R. K., Stanley S. (1998). Mucosal immunogenicity of a holotoxin-like molecule containing the serine-rich *Entamoeba histolytica* protein (SREHP) fused to the A2 domain of cholera toxin. *Infect. Immun.* 66: 462-468
- Sun J. S., Mielcarek N., Lakew M., Grzych J. M., Capron J., Holmgren C., Czerkinsky C. (1999). Intranasal administration of a *Schistosoma mansoni* glutathione S-transferase-cholera toxin conjugate vaccine evokes antiparasitic and antipathological immunity in mice. *J. Immunol.* 163: 1045-1052
- Takeda K., Kaisho T., Akira. S. (2003). Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21:335-376
- Tegerstedt K., Franzén A., Ramqvist T., Dalianis T. (2006). Dendritic cells loaded with polyomavirus VP1/VP2Her2 virus-like particles efficiently prevent outgrowth of a Her2/neu expressing tumor. *Cancer Immunol. Immunother.*
- Tinker J. K., Erbe J. L., Holmes R. K. (2005). Characterization of fluorescent chimeras of cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins produced by use of the twin arginine translocation system. *Infect. Immun.* 73: 3627-3635
- Torgersen M. L., Skretting G., van Deurs B., Sandvig K. (2001). Internalization of cholera toxin by different endocytic mechanisms. *J. Cell Sci.* 114: 3737-3747
- Tsai B., Rodighiero C., Lencer W. I., Rapoport T. A. (2001). Protein disulfide isomerase acts as a redox-dependent chaperone to unfold cholera toxin. *Cell* 104: 937-938
- Tsai B., Gilbert M. J., Stehle T., Lencer W., Benjamin T. L., Rapoport T. A. (2003). Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40. *EMBO J.* 22: 4346-4355

- Tsunetsugu-Yokota Y., Morikawa Y., Isogai M., Kawana-Tachikawa A., Odawara T., Nakamura T., Grassi F., Autran B., Iwamoto A. (2003). Yeast-derived human immunodeficiency virus type 1 p55(gag) virus-like particles activate dendritic cells (DCs) and induce perforin expression in Gag-specific CD8⁺ T cells by cross-presentation of DCs. *J. Virol.* 77: 10250-10259
- Vlastos A., Andreason K., Tegerstedt K., Hollanderová D., Heidari S., Forstová J., Ramquist T., Dalianis T. (2003). VP pseudocapsids, but not a glutathione-s-transferase VP1 fusion protein, prevent polyomavirus infection in a T-cell immune deficient experimental mouse model. *J. Med. Virol.* 70: 293-300
- Wang Q., Lin T., Tang L., Johnson J. E., Finn M. G. (2002) Icosahedral virus particles as addressable nanoscale building blocks. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 41:459-462
- Warfield K. L., Bosio C. M., Welcher B. C., Deal E. M., Mohamadzadeh M., Schmaljohn A., Aman M. J., Bavari S. (2003). Ebola virus-like particles protect from lethal Ebola virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:15889-15894
- Weih F., Carrasco D., Durham S. K. (1995). Multiorgan inflammation and hematopoietic abnormalities in mice with a targeted disruption of RelB, a member of the NF-kappa B/Rel family. *Cell* 80: 331-340
- Wesche J., Rapak A., Olsnes S. (1999). Dependence of ricin toxicity on translocation of the toxin A-chain from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *J. Biol. Chem.* 274: 34 443-34 449
- White J., Johannes L., Mallard F., Girod A., Grill S., Reinsch S., Keller P., Tzschaschel B., Echard A., Goud B., Stelzer E.H. (1999). Rab6 coordinates a novel Golgi to ER retrograde transport pathway in live cells. *J. Cell Biol.* 147: 743-760
- Wolf A. A., Jobling M. G., Wimer-Mackin S., Madara J. L., Holmes R. K., Lencer W. I. (1998). Ganglioside structure dictates signal transduction by cholera toxin in polarized epithelia and associated with caveolae-like membrane domains. *J. Cell Biol.* 141: 917-927
- Wolf A. A., Fujinaga Y., Lencer W. I. (2002). Uncoupling of the cholera toxin-G_{M1} ganglioside receptor complex from endocytosis, retrograde Golgi trafficking, and downstream signal transduction by depletion of membrane cholesterol. *J. Biol. Chem.* 277: 16 249-16 256
- Xiang R., Primus F. J., Ruehlmann J. M., Niethammer A. G., Silletti S., Lode H. N., Dolman C. S., Gillies S. D., Reisfeld R. A. (2001). A dual-function DNA vaccine encoding carcinoembryonic antigen and CD40 ligand trimer induces T cell-mediated protective immunity against colon cancer in carcinoembryonic antigen-transgenic mice. *J. Immunol.* 167: 4560-4566
- Yan M., Peng J., Jabbar I. A., Liu X., Filgueira L., Frazer I. H. Thomas R. (2005) Activation of dendritic cells by human papillomavirus-like particles through TLR4 and NFκB-mediated signalling, moderated by TGF-β. *Immunol. Cell Biol.* 83: 83-91
- Yang Q. B., Martin M., Michalek S. M., Katz J. (2002). Mechanism of monophosphoryl lipid A augmentation of host responses to recombinant HagB from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect. Immun.* 70: 3557-3565
- Yang R., Murillo F. M., Cui H., Blosser R., Uematsu S., Takeda K., Akira S., Viscidi R. P., Roden R. B. S. (2004). Papillomavirus-like particles stimulates murine bone marrow-derived dendritic cells to produce alpha interferon and Th1 immune responses via MyD88. *J. Virol.* 78: 11152-11160
- Yao Q., Kuhlmann F. M., Eller R., Compans R. W., Chen C. (2000). Production and characterization of simian-human immunodeficiency virus-like particles. *AIDS res. Hum. Retrovir.* 16: 227-236
- Ye Y., Shibata Y., Yun C., Ron D., Rapoport T. A. (2004). A membrane protein complex mediates retrotranslocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature* 429: 841-847
- Yuan L., Geyer A., Hodgins D. C., Fan Z., Qian Y., Chang K., Crawford S. E., Parreno V., Ward L. A., Estes M. K., Conner M. E. Saif L. J. (2000). Intranasal administration of 2/6-Rotavirus-like particles with mutant *Escherichia coli* heat-labile toxin (LT-R192G) induces antibody-secreting responses but not protective immunity in gnotobiotic pigs. *J. Virol.* 74: 8843-8853

9. Publikace a příspěvky na konferencích

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

Marek M., Bouřa E., Liebl D., Spíšek R., Frič J., Forstová J. (2005). Abstract book of 13th Annual Congress of the European Society of Gene Therapy, October 29 – November 1, Prague, Czech Republic, 114 str.

Marek M., Frič J., Boháčová V., Forstová J. (2007). Chimeric Mouse Polyomavirus-like Particles Stimulate Murine Bone Marrow-derived Dendritic Cells, Induce Both CD4⁺ and CD8⁺ T-cell Responses, and affect the number of splenic Foxp3 regulatory T cells. EMBO Workshop on Structural Biology of Small Tumor DNA viruses, May 11 – 17, Siena, Italy

Polyomavirus EGFP-pseudocapsids: Analysis of model particles for introduction of proteins and peptides into mammalian cells

E. Bouřa^a, D. Liebl^a, R. Špíšek^b, J. Frič^{a,c}, M. Marek^a, J. Štokrová^{a,c}, V. Holáň^{a,c}, J. Forstová^{a,*}

^a *Genetics and Microbiology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Viničná 5, 128 44 Prague 2, Czech Republic*

^b *Institute of Immunology, 2nd Medical Faculty, Charles University in Prague, V Uvalu 84, 150 06 Prague 5, Czech Republic*

^c *Institute of Molecular Genetics Academy of Science, Flemingovo n. 2, Prague 6, Czech Republic*

Received 15 August 2005; revised 25 September 2005; accepted 31 October 2005

Available online 10 November 2005

Edited by Frances Shannon

Abstract A vector for preparation of mouse polyomavirus capsid-like particles for transfer of foreign peptides or proteins into cells was constructed. Model pseudocapsids carrying EGFP fused with the C-terminal part of the VP3 minor protein (EGFP-VLPs) have been prepared and analysed for their ability to be internalised and processed by mouse cells and to activate mouse and human dendritic cells (DC) *in vitro*. EGFP-VLPs entered mouse epithelial cells, fibroblasts and human and mouse DC efficiently and were processed by both, lysosomes and proteasomes. Surprisingly, they did not induce upregulation of DC co-stimulation molecules or maturation markers *in vitro*; however, they did induce interleukin 12 secretion.

© 2005 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Mouse polyomavirus; Empty artificial virus-like particle; Dendritic cell activation; Vector for peptide transfer

1. Introduction

Viral coats were selected by evolution for efficient entry of viruses through the plasma membrane into cells and for delivery of genetic information into the cell nucleus or other cell compartments for virus gene expression. Viruses thus represent natural, highly specialised transfer vehicles.

*Corresponding author. Fax: +420 221 951 729.
E-mail address: jitka@natur.cuni.cz (J. Forstová).

Abbreviations: AcNPV, *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus; BMDC, bone marrow-derived dendritic cells; CFSE, carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester; CM, complete culture medium; DC, immature human monocyte-derived dendritic cells; EEA1, early endosomal antigen; EGFP, enhanced green fluorescent protein; FCS, foetal calf serum; FSC and SSC, forward and side scatter characteristics; EM, electron microscopy; GM-CSF, granulocyte macrophage-colony stimulating factor; LAMP2, lysosomal associated membrane protein; LPS, lipopolysaccharide; NMuMG, normal murine mammary gland cells; p.a., post adsorption; p.i., post infection; PFU, plaque forming unit; poly(I:C), inosine-cytosine dsRNA polynucleotide; PyV, mouse polyomavirus; t-VP3, truncated, C-terminus of VP3 minor capsid protein; VLPs, empty artificial virus-like particles; VP1-VLPs, pseudocapsids composed of VP1 major capsid protein; EGFP-VLPs, pseudocapsids composed of VP1 major capsid protein and EGFP-t-VP3 fusion protein

Polyomaviruses, small non-enveloped DNA viruses, have a wide range of hosts, including human and different pathogenic responses in the infected organisms. Despite this variation, these viruses share similar virion structure. The icosahedral capsid formed by three structural proteins, VP1, VP2 and VP3, is arranged around the nucleocore consisting of 5.3 kbp circular genomic DNA, cellular histones (except H1) and VP1 protein. The crystal structure of two polyomaviruses (mouse polyomavirus (PyV) and Simian virus 40 (SV40)) has been determined. The capsid shell is composed of 72 capsomeres – pentamers of VP1 molecule. The major structural protein, VP1, of the PyV is formed by a sandwich core of β -sheets with several out-facing loops [1,2], it is able to self-assemble into capsid-like particles and is responsible for interaction with sialic acid of ganglioside receptor [2,3]. VP1 non-specific DNA-binding activity [4] suggests its role in the nucleocore assembly. Neither VP2 nor VP3, which seem to interconnect the VP1-surface lattice and the nucleohistone core [5], are required for the capsid-like structure assembly and their functions are still unclear. Nevertheless, PyV with the genome mutated in the ATG codon for either VP2 or VP3 is not infectious. Also, the absence of myristyl moiety on the N-terminal amino acid of VP2 results in a substantial decrease of polyomavirus infectivity [6,7]. On the basis of the unique properties of VP1 (ability of spontaneous self-assembly, receptor recognition, nuclear localisation signal, DNA non-specific binding activity), studies have been performed with the aim to use empty artificial murine polyomaviral virus-like particles (VLPs or VP1 pseudocapsids) for gene transfer [8–10]. VLPs derived from mouse PyV (PyV-VLPs) can cross the outer membrane of a variety of cell types – including cells of human origin [9,11]. Studies *in vivo* demonstrated: (i) the ability of PyV-VLPs to target many organs/tissues of mouse and (ii) the possibility to introduce them into experimental animals by different routes, including intranasally. VLPs were shown to be able to cross the blood–brain barrier since gene expression of the delivered gene in the brain was observed [12]. Several studies were performed to follow humoral and cellular immune responses to PyV VP1 pseudocapsids. They showed that such VLPs provoked a strong cellular T helper 1 (Th1) and humoral response and could protect mice against polyomavirus infection [13–15]. High immunogenicity of VLPs offers an exploitation of virus structures for development of vaccines based on VLPs as carriers for the delivery of other disease antigens.

In this study, we have focused on development of chimeric polyomavirus capsid structures for the transfer of epitopes

and other therapeutic peptides into mammalian cells. As a model protein to be transferred via PyV VLPs, we have chosen the enhanced green fluorescent protein (EGFP). We examined the ability of “green” VLPs to enter cells and followed their fate in the cells. Finally, we examined the effects of “green” particles on activation of dendritic cells.

2. Materials and methods

2.1. Plasmid construction

Sequences encoding the C-terminal fragment of protein VP3 (AA 105–204, nucleotides # 4345–4659) were amplified by PCR using primers: forward: 5'-CATCAGCGAGCTCAGGGTACTC-3', reverse: 5'-TTAGAGGATCCTTAGAGACGCCGCTT-3', and the plasmid pMJG (containing the whole PyV genome open in the unique *EcoRI* site; kindly provided by B.E. Griffin) as a template. The PCR fragment as well as the plasmid pEGFP-C2 (Clontech, Palo Alto, CA) were cut with *SacI*/*Bam*HI and ligated to generate the plasmid pEGFP-t-VP3, where EGFP sequences were fused in frame with truncated VP3 (t-VP3). To generate baculovirus transfer plasmid pAcDB3/VP1/EGFP-t-VP3, sequences encoding the fusion protein EGFP-t-VP3 were amplified by PCR using primers: forward: 5'-AGATAGGATCCACCATGGTGAGCAAG-3', reverse: 5'-TTAGAGGATCCTTAGAGACGCCGCTT-3', and the pEGFP-t-VP3 as a template. The PCR product was cut with *Bg*II/*Bam*HI and inserted into the plasmid pAcDB3/VP1 (with the gene for the major structural protein VP1 under the control of late p10 promoter; kind gift of T. Ramqvist and T. Dalianis) into the *Bg*II position under the control of a second p10 promoter.

2.2. Cell cultures and viruses

Spodoptera frugiperda (SF9) cells were grown as monolayer cultures at 27 °C in standard TNF-FK medium containing 10% foetal calf serum (FCS) as described by Hink [16]. *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) and recombinant baculoviruses were propagated as described by O'Reilly et al. [17]. Recombinant baculovirus AcDB3/VP1/EGFP-t-VP3 was prepared by in vivo allelic exchange between AcNPV DNA and recombinant transfer plasmid pAcDB3/VP1/EGFP-t-VP3, and purified by plaque assays as previously described [17].

Normal murine mammary gland (NMuMG) epithelial cells purchased from the American Type Culture Collection (no. CRL-1636) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% FCS (Sigma).

2.3. Human and mouse dendritic cell generation

Complete culture medium (CM) was used for the culture of human lymphocytes and dendritic cells and consisted of RPMI (BioWhittaker, Berkshire, England) supplemented with 10% heat-inactivated FCS (BioWhittaker), 2 mM L-glutamine, and 1% penicillin/streptomycin (BioWhittaker). Cells were cultured at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. Immature human monocyte-derived dendritic cells (DC) were generated as described previously [18]. Briefly, peripheral blood mononuclear cells were obtained from buffy coats of healthy donors and monocytes were separated by 2 h adhesion in 75 cm² culture flasks. Adherent monocytes were cultured for 5 days in CM in the presence of granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) (Leukine^R) and 15 ng/ml of IL-4 (Peprotech). When indicated, immature DC were activated by the addition of either inosine-cytosine dsRNA polynucleotide (poly(I:C)) 50 µg/ml or lipopolysaccharide (LPS) 10 µg/ml. For generation of mouse bone marrow dendritic cells (BMDC), bone marrow was flushed from femurs of C57BL/10Sn mice. Cells were plated for 5 days in 6 well plates (5 × 10⁵ cells/ml) in 4 ml RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 50 µM 2-mercaptoethanol, 10 mM HEPES, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml) and 5% Ag hybridoma culture supernatant as a source of GM-CSF [19]. Every second day the cultures were fed by aspirating 50% of medium and adding fresh medium with GM-CSF. Mature DC were generated by incubating BMDC with GM-CSF plus 1 µg/ml LPS for the last 18 h.

2.4. Interaction of DC with polyomavirus capsid-like particles

On day 5, immature DC (human or mouse) were seeded in 24-well plates at 5 × 10⁵ cells/ml in CM and cultured with artificial polyomavirus capsid-like particles at the DC:VLPs ratios of 1:10³, 1:10⁴, 1:10⁵ and 1:10⁶. Functional and phenotypic consequences of DC interaction with VLPs were investigated after 24 h.

2.5. Antibodies

Following primary antibodies were used for cell immunostaining: anti-PyVP1 A mouse monoclonal [8] or mouse or rabbit polyclonal antibody (prepared in our laboratory) against polyomavirus VP1; anti-PyVP2/3A mouse monoclonal antibody against the common region of VP2 and VP3 [8]; goat anti-EEA1 (Santa Cruz) against early endosome antigen EEA1, mixture of mouse anti- α and anti- β tubulin (Exbio) for microtubule staining; mouse monoclonal anti-ubiquitin antibody (Santa Cruz Biotechnology); rabbit polyclonal anti-GFP antibody for EGFP staining (AbCam antibodies); rabbit anti-BiP purified antiserum (Alexis) against the BiP (GRP78) marker of endoplasmic reticulum; rat monoclonal anti-LAMP-2 antibody (Developmental Studies Hybridoma Bank, The University of Iowa, Iowa City) against lysosomal associated membrane protein (LAMP2). Secondary antibodies: Alexa Fluor-546 (red) goat anti-mouse, anti-rabbit or anti-rat antibody (Molecular Probes), Alexa Fluor-546 (red) donkey anti-goat antibody (Molecular Probes) or the Alexa Fluor-488 (green) goat anti-mouse or anti-rabbit antibody (Molecular Probes) were used for fluorescence staining. For immunoelectron microscopy, goat anti-mouse IgG antibody conjugated with 5 nm colloidal gold was used (British Biocell Int.). DNA was stained by DAPI. For flow cytometry, FITC or PE-conjugated monoclonal antibodies (mAbs: PharMingen, San Diego, CA) against following molecules were used: CD80, CD83, CD86, CD11c, CD40, CD11c, CD40, HLA-ABC, HLA-DR for human dendritic cells and CD80, CD86, CD11c and MHC class II I-A^b for mouse cells.

2.6. Flow cytometry

DC were stained with antibodies for 30 min at 4 °C, washed twice in PBS + 0.1% bovine serum albumin (BSA) and analyzed in FACS Calibur (Becton Dickinson) using Cell Quest software. DC were gated according to their FSC and SSC properties and dead cells were excluded by TO-PRO3 (Molecular Probes) staining. Appropriate isotype controls were always included and 5 × 10³ viable DC were obtained in each experiment.

2.7. FITC-dextran endocytosis

DC (2 × 10⁵ cells) were incubated with 1 mg/ml of FITC-dextran (40000 mw, Sigma). After 1 h, cold medium was added to stop the experiment. Cells were washed three times with ice-cold PBS and analyzed in FACS Calibur.

2.8. Cytokine detection

After the interaction with polyomavirus capsid-like particles, IL-12 p70 production by human DC and IL-12 p40 production by mouse DC was analyzed in culture supernatants by a standard ELISA kit (Immunotech).

2.9. Induction of lymphocyte proliferation

CD4⁺ T cells were positively selected using CD4 microbeads (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany). The purity of CD4 population used for further studies always exceeded 95%. CD4⁺ T cells were subsequently labelled by 2 µM carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE, Molecular Probes) [20]. DC (10⁴ cells) activated by Poly(I:C), LPS or DC that interacted with VP1 particles were cultured with allogeneic CFSE-labelled CD4⁺ T cells (10⁵ cells) for 4 days and the induction of T-cell differentiation was evaluated by gradual CFSE dilution in dividing T cells by flow cytometry.

2.10. Chemotaxis

DC (5 × 10³ cells) in 100 µl of CM were plated in the upper chamber of 24-well transwell plate with 5 µm porous inserts (Corning Costar). Lower chambers contained 600 µl of medium or medium with 50 ng/

ml of chemokine MIP-3 β . After 2 h incubation at 37 °C, inserts were lifted and the cells migrated to the lower surface were washed into the lower chamber and counted.

2.11. Isolation of capsid-like particles from insect cells

Insect cells were infected with recombinant baculovirus (10 PFU/per cell). Cells were harvested 72 h post infection (p.i.), lysed, and VLPs were purified by CsCl and sucrose gradients as described previously [8].

2.12. Immunofluorescence of cells

VLPs were applied to cells grown on coverslips. At the indicated times post adsorption (p.a.), the cells were washed with PBS, fixed with 3% paraformaldehyde in PBS (15 min at 4 °C) and permeabilised with 0.5% Triton X-100 (Sigma) in PBS (5 min). Fixed cells were washed with PBS and blocked in 0.25% BSA (Sigma) and 0.25% porcine skin gelatine (Sigma) in PBS. Incubation with primary and secondary antibodies was carried out for 1.5 and 0.5 h, respectively, with extensive washing with PBS after each of incubations. Coverslips were mounted on droplets of glycerol with or without DAPI and samples were observed in a Leica TCS SP2 confocal microscope.

2.13. Electron and immunoelectron microscopy

Mouse 3T6 or NMuMG cells grown on coverslips were infected with pseudocapsids composed of VP1 major capsid protein and EGFP-t-VP3 fusion protein (EGFP-VLPs) (10^4 – 10^5 particles/cell). At appropriate times p.a., cells were processed for transmission electron microscopy. Briefly, the infected cells were washed in PBS, fixed with 3% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, post-fixed with 1% osmium tetroxide, dehydrated through increasing ethanol series (including 30 min contrasting in 1.5% uranylacetate in 70% ethanol) and propyleneoxide, infiltrated, and flat embedded in Agar 100 resin (Gröpl, Tulln, Austria). Ultrathin sections were contrasted with a saturated uranyl acetate solution and Reynold's lead citrate. Isolated VLPs (or capsomeres) were immunostained against VP1 and EGFP by the direct immunoelectron microscopy technique. VLPs were adsorbed on carbon-coated parlodion membrane on electron microscopy (EM) grids, activated with glow discharge. Grids were then incubated on drops of primary antibodies, washed intensively in PBS and exposed to colloidal gold-conjugated secondary antibodies. Grids were washed again in PBS and redistilled H₂O, contrasted on a drop of 2% phosphotungstic acid (pH 7.0) and dried. Samples were observed in a JEOL 1200EX electron microscope operating at 60 kV.

3. Results

3.1. Construction of a baculovirus for the production of mouse polyomavirus EGFP-VLPs and their characterisation

The construction has been designed to introduce EGFP as a fusion protein with the sequence of PyV minor capsid proteins responsible for their interaction with the central cavity of polyomavirus VP1 pentameric capsomeres (Fig. 1(a)). EGFP fused

with the C-terminal VP3 sequence was cloned into the *Bg/II* site (under the baculovirus late promoter p10) in baculoviral transfer plasmid pAcDB3 carrying the VP1 gene (in the *SmaI* site, under the second p10 promoter). Isolated recombinant baculovirus obtained by recombination in Sf9 insect cells gave green plaques (Fig. 1(b)) and cell lysates were positive for both, VP1 and fusion protein composed of EGFP and t-VP3 (not shown). Confocal microscopy showed nuclear localisation of the EGFP-t-VP3 product (Fig. 1(c)). We have observed previously that neither VP2 nor VP3 protein have nuclear localisation in insect cells when expressed separately. VP3 remained spread in the cytoplasm and its nuclear localisation appeared only in cells co-expressing the VP1 gene. This suggests that VP3 and apparently also EGFP-t-VP3 were transported into the cell nucleus as a complex with the major structural protein, VP1 [3].

When lysate of cells containing VP1 and EGFP-t-VP3 proteins was analysed by CsCl or sucrose gradient ultracentrifugation, we observed the green coloured band to co-purify with the VP1 band as proved by gradient fractionation and immuno-dot blot (not shown). EM analysis (Fig. 2) proved that this fraction contains high concentration of capsid-like particles. Particles isolated from cell lysates containing VP1 only are presented for comparison (Fig. 2, third panel).

In agreement with our assumption that EGFP-t-VP3 should be situated inside the capsid-like particle, antibody against GFP (5 nm gold) was observed mainly in connection with single capsomeres, or with partially disassembled but, not with intact VLPs (Fig. 2, left panel), while antibody against VP1 decorated particles with a high efficiency (Fig. 2, middle panel). Often imperfectly assembled "green" VLPs were of irregular shape in comparison to pseudocapsids formed by VP1 only. Nevertheless, green particles were stable during gradient centrifugations, dialysis and during (at least) 1 month storage at 4 °C.

3.2. EGFP-VLPs enter mammalian cells efficiently

Green particles were adsorbed efficiently on the surface of mouse NMuMG epithelial cells and became internalised by tightly fitted smooth invaginations (Fig. 3). Thirty minutes p.a., fusions of vesicles carrying particles into endosomes containing more than one particle could be observed by EM (Fig. 4A). However, these membrane structures could also represent one multivesicular body of inter-connected membrane cisternae. At the same time (30 min p.a.), confocal fluorescence microscopy showed co-localisation of particles with the early

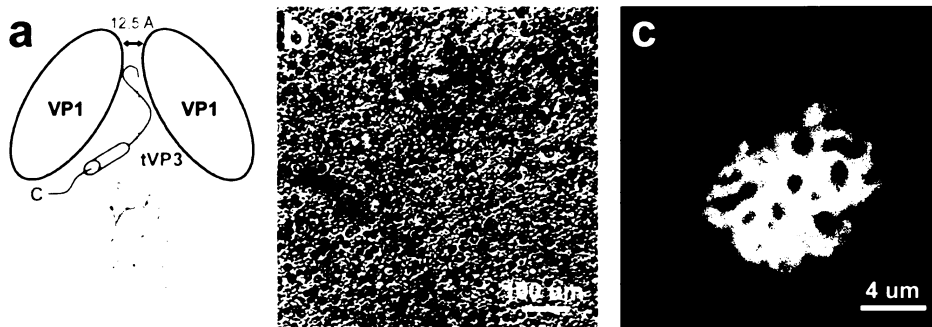


Fig. 1. Design, production and detection of EGFP-VLPs. Schematic view of constructed EGFP-VLP (a). Plaque of the recombinant baculovirus producing the EGFP-t-VP3 and VP1, selectable on the basis of its green fluorescence (b). The fusion protein EGFP localised in the nucleus of insect Sf9 cells (confocal section of a live cell) infected with recombinant baculovirus Ac-VP1-EGFP-t-VP3 60 h p.i. (c).

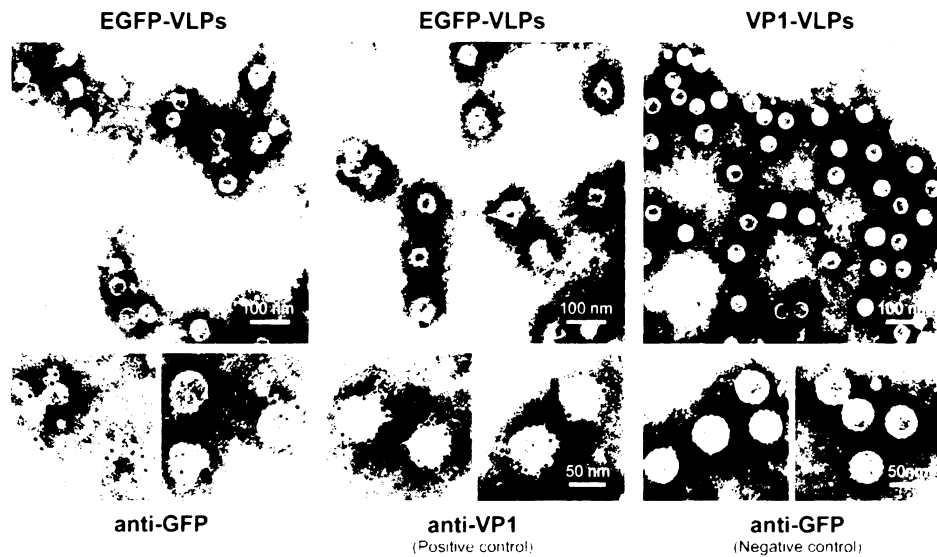


Fig. 2. Direct immunoelectron microscopy of EGFP-VLPs. Isolated “green” VLPs adsorbed on EM grids and immunostained by rabbit anti-GFP and rabbit anti-VP1 polyclonal serum, respectively, followed by goat anti-rabbit immunoglobulin antibody conjugated with 5 nm gold particles. VP1-VLPs were used as EGFP negative control. Lower panel represents detailed enlargements.

endosome antigen (EEA1) (Fig. 4B) and later (3 h p.a.), the signal of particles merged partially with BiP-marker of endoplasmic reticulum (ER) (Fig. 5). To enhance green EGFP signal of VLPs, VP1 protein of VLPs was immunostained using Alexa Fluor-488 (green) secondary antibody (with the exception of Fig. 7).

3.3. VLPs are degraded by both lysosomes and proteasomes

Before the signal of EGFP pseudocapsids began to cumulate in perinuclear space (90 min p.a.), co-localisation of VLPs and LAMP2 marker of lysosomes (Fig. 6(b) and (c)) was observed,

suggesting that a subpopulation of VLPs became degraded in lysosomal compartments. EM of ultrathin cell sections also confirmed fusion of vesicles carrying VLPs with lysosomes (Fig. 6(a)).

Later, 6 h p.a., the majority of the VP1 and EGFP-t-VP3 was cumulated in perinuclear space, partly still in the co-localising pattern (Fig. 7, upper panel). At the same time, fluorescent signals of VP1 (red) and EGFP-t-VP3 (green) began to translocate from perinuclear space into the cell periphery and were separated from each other suggesting previous disassembly of “green” VLPs (Fig. 7, lower panel). At that time, no in-



Fig. 3. EGFP-VLPs are efficiently internalised by NMuMG cells. After binding to the cell surface, EGFP-VLPs enter the cytoplasm in smooth membrane invaginations. Electron microscopy of ultrathin sections. Adsorption performed with multiplicity of 10^3 particles per cell; Cells were fixed 20 min p.a.

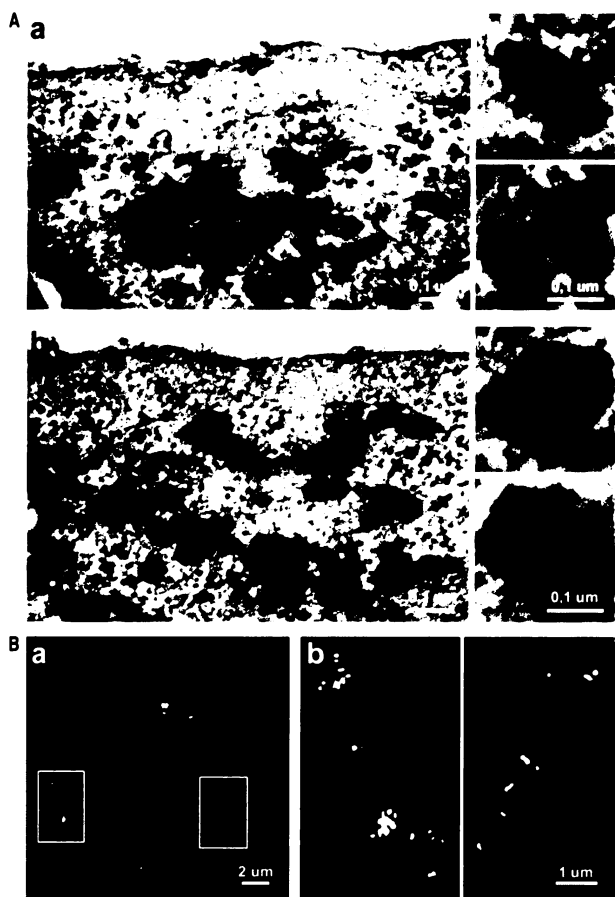


Fig. 4. Monopinocytic vesicles carrying EGFP-VLPs fuse with early endosomes. (A) Electron microscopy of 3T6 (a) and NMuMG (b) cells 30 min p.a. Adsorption performed with multiplicity of 10^3 particles per cell. Enlarged details of ultrathin sections (on the right). (B) Co-localisation of VLPs (green) with EEA1 marker of early endosomes (red). Merged image of a confocal section of the NMuMG cell fixed 30 min p.a. Adsorption performed with multiplicity of 10^2 particles per cell (a) with enlarged details (b).

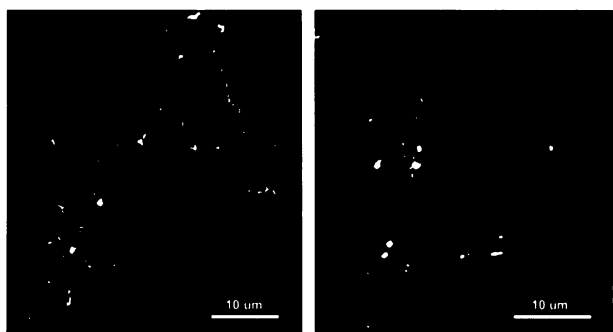


Fig. 5. Co-localisation of EGFP-VLPs with the Bip marker of ER. NMuMG cells fixed 3 h p.a. Adsorption performed with multiplicity of 10^2 particles per cell. (EGFP-t-VP3 + VP1 - green, Bip - red). Sections of different cells, merged images.

tact virus particles were detected by EM on ultrathin sections (not shown). Massive co-localisation of ubiquitin and EGFP-VLP signal was observed at 8 h p.a., when the majority of VLP signal appeared back in the cytoplasm (Fig. 8).

3.4. EGFP particles enter mouse and human dendritic cells

The important point in exploitation of artificial mouse VLPs carrying specific epitopes as vaccines is whether these particles are able to adsorb on, enter and activate professional antigen presenting cells (APCs). Therefore, we followed (in vitro) entry and trafficking of green VLPs into human and mouse dendritic cells and examined markers of their activation. Confocal and EM revealed that VLPs enter both mouse and human DC efficiently. The endocytic pathway of VLPs in DC resembled that observed in NMuMG cells. The VLP signal (EGFP signal enhanced by “green” immunostaining of VP1) moved via early endosomes into perinuclear space and later (from 6 h p.a.), the VLP signal moved back into the cytoplasm. Finally, 24 h p.a., it could be observed near to and on the surface of dendritic cells (Fig. 9). At that time, substantial co-localisation of VLP signal with ubiquitin was observed (not shown).

3.5. Mouse polyomavirus VLPs induce production of IL-12 by DC but do not activate other DC markers in vitro

Untreated human DC produced already relatively high levels of CD80 and especially CD11c, but low levels of CD83 and 86. When inoculated with pseudocapsids composed of VP1 major capsid protein (VP1-VLP) or VP1/EGFP-t-VP3 VLPs for 24 h, no substantial upregulation of CD80, CD83, CD86 and HLA-DR markers was observed (Fig. 10). Also, analysis of functional characteristics: (i) phagocytic capacity, (ii) migratory capacity of DC in response to MIP-3 β and (iii) T-cell allostimulatory capacity of DC did not demonstrate convincing activation of human DC by polyomavirus VLPs (Fig. 11a, b and c). On the other hand, secretion of interleukin 12 (p70 IL-12 heterodimer) was induced by incubation of human DC with EGFP-VLPs (Fig. 11d).

Similar to human DC, no substantial upregulation of CD80, CD86 or MHCII molecules was observed in mouse DC 24 h p.a. of VLPs composed of the VP1 only or VLPs carrying EGFP-t-VP3 fusion proteins (not shown). The induction of (p40) IL-12 secretion in mouse DC was achieved by high concentrations of VP1-VLPs or EGFP-VLPs (10^6 – 10^7 per cell; Fig. 11e). Nevertheless, the same protein concentrations of bovine serum albumin added to DC did not induce IL-12 production (not shown). There was a different correlation between production of human and mouse DC and a total dose of VLPs used for activation of cells. Production of IL-12 by human cells increased with higher VLPs concentration up to 10^4 VLPs/cell but, decreased when higher dose was used (10^5 VLPs/cell). On the other hand, IL-12 production by mouse DC increased with higher doses of VLPs up to 10^7 VLPs/cell. This observation can be a result of different sensitivity of human and mouse DC to the presence of PyV VLPs. However, in contrast to flow cytometry, in these experiments, no correction for numbers of dead cells was performed.

4. Discussion

Virus-like particles of many viruses were found to be potent inducers of immune responses against viral capsid proteins without the need for adjuvants [21–23]. Immunisation with papillomavirus L1 VLPs can induce high titres of neutralising antibodies that confer protection against experimental papillomavirus challenge in animal papillomavirus models [24–26].

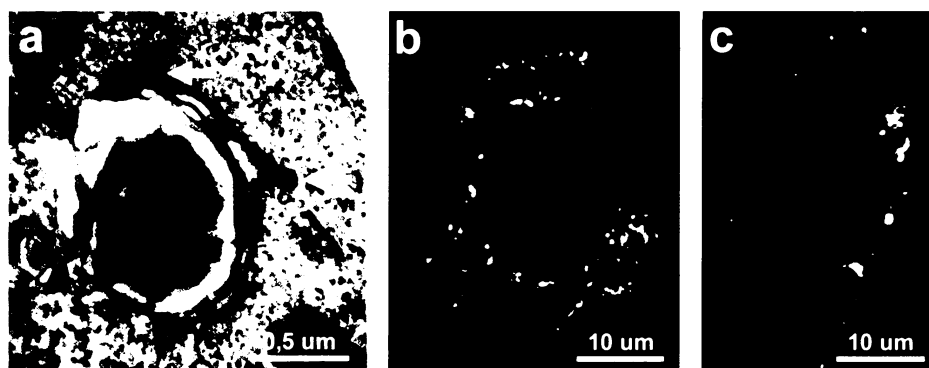


Fig. 6. Subpopulation of EGFP-VLPs is degraded in lysosomes. Electron microscopy of ultrathin section (a): white arrows show fusion of VLP-containing vesicles with the lysosome. Co-localisation of LAMP2 (red) and EGFP-t-VP3 + VP1 (green) on confocal sections of two different cells, merged images (b,c). NMuMG cells fixed 90 min p.a. Adsorption performed with multiplicity of 10^3 particles per cell.

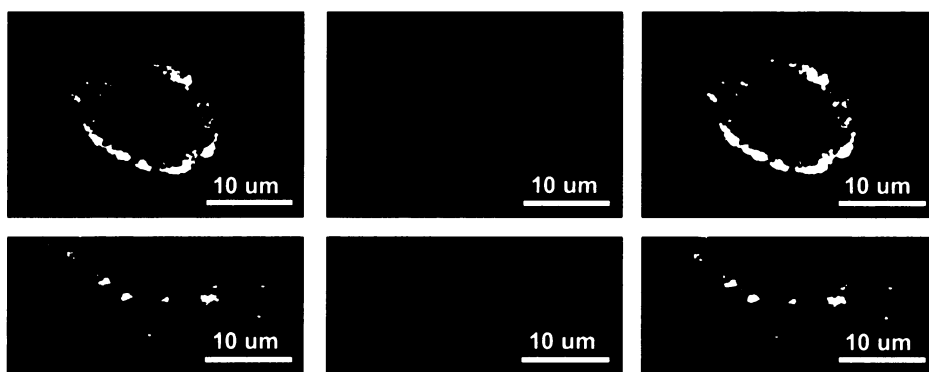


Fig. 7. Co-localisation of EGFP-t-VP3 (green) and VP1 (red) in NMuMG cell 6 h p.a. The majority of the VLPs in the perinuclear space and their EGFP-t-VP3 and VP1 signals in partial co-localisation (upper panel). Separation of VP1 and EGFP-t-VP3 signals in the cytoplasm of the same cell, shown in different confocal section (lower panel).

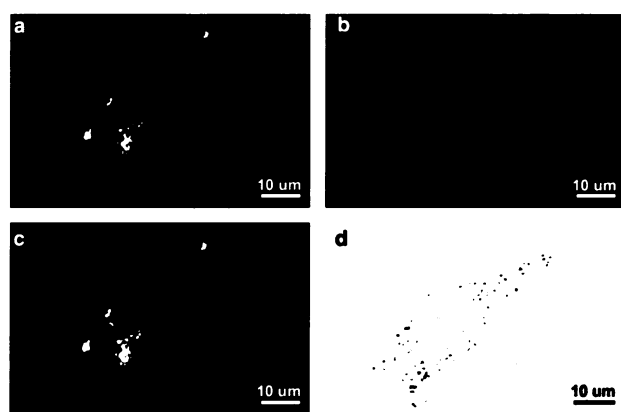


Fig. 8. Co-localisation of EGFP signal with ubiquitin. EGFP-t-VP3 + VP1 – green (a), ubiquitin – red (b), merged images of cell section (c) and Nomarski contrast (d). Cells were fixed 8 h p.a. (multiplicity 10^3 VLPs per cell).

Also in human, an efficacy trial has shown that systemic vaccination with L1 VLPs induced high serum antibody titres and can protect against persistent HPV 16 infection [27]. The VLPs can also be engineered to carry exogenous epitopes for induction of specific immune responses [28,29]. Chimeric VLPs based on murine polyomaviruses can be prepared by inserting

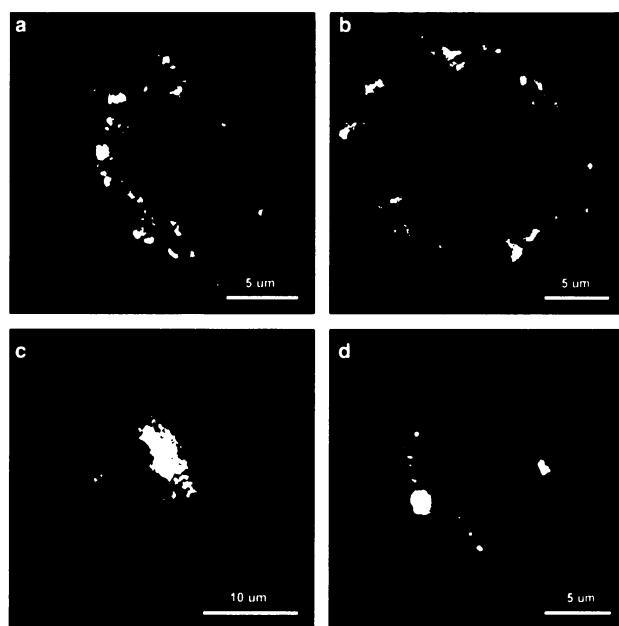


Fig. 9. EGFP-VLPs in human and mouse dendritic cells. Mouse (a,b) and human (c,d) dendritic cells 3 h (a,c) and 24 h (b,d) p.a. of EGFP-VLPs (multiplicity 10^3 VLPs/cell). Confocal sections of different cells, merged images; EGFP-t-VP3 + VP1 green, tubulin red and nucleus (DAPI) blue.

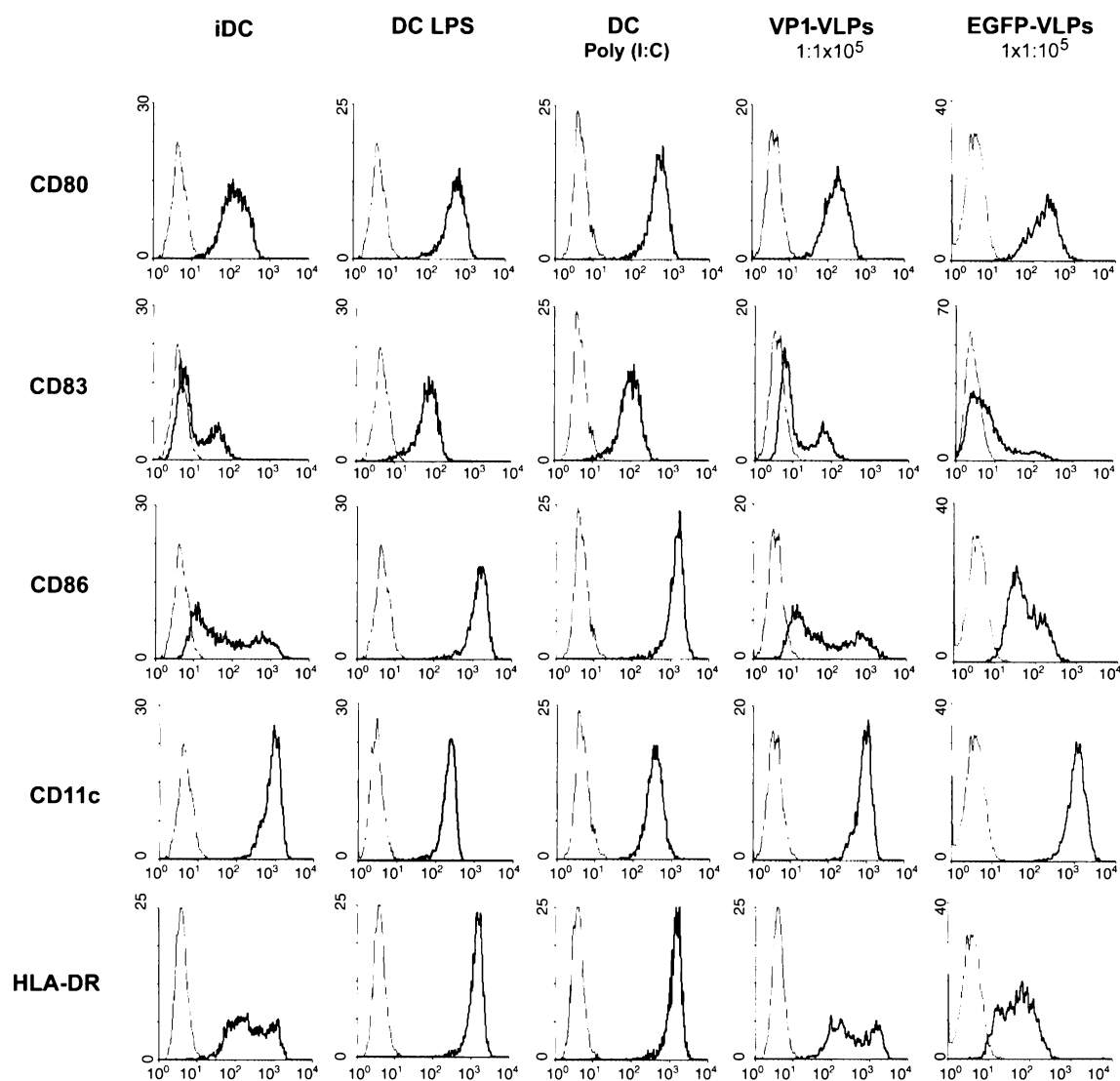


Fig. 10. Activation of human dendritic cells: Flow cytometry of immature DC (iDC) and of DC activated by the treatment with LPS, poly(I:C), VP1-VLPs and EGFP-VLPs. DC were gated according to their morphological properties and only viable cells (propidium iodide negative) were included in the final analysis. The thick lines represent the specific expression of investigated molecules, whereas the thin line represents the isotype control staining. The representative profiles of three independent experiments with DC generated from different donors are shown.

exogenous sequences into one of the surface loops of VP1 structural protein [30,31]. However, this approach has to overcome the restriction given by the requirement of VLP assembly. VLPs with insertion in the HI loop are unstable (our unpublished observation) and, moreover, they cannot be efficiently internalised by cells as they lose the ability to bind sialic acid moiety of a receptor molecule. Therefore, we exploited the C-terminal part of minor structural proteins, responsible for their interaction with VP1 pentamers, for the introduction of foreign peptides into VLPs. We examined the feasibility of introduction of an exogenous protein (EGFP) into capsid protein coding sequences as a fusion tag with a truncated peptide (99 amino acids) of the common C-terminus of VP2/VP3 minor structural proteins. The engineered construct was used to study the possibility of artificial capsid formation in the nuclei of insect cells infected by recombinant baculovirus carrying both VP1 and EGFP-truncated VP3 (each under a strong late baculovirus promoter).

Inserted protein should be exposed inside the particle, non-covalently connected with the central cavity of VP1 capsomers. Theoretically, 72 fusion proteins could be present in one virus-like particle. Recently, such particles were assembled *in vitro* from VP1 pentamers and fusion protein GFP-46 C-terminal amino acids of VP2, both isolated from *Escherichia coli* [32]. They achieved an average loading capacity of 64 GFP molecules per particle. We showed that such particles can be efficiently assembled in nuclei of insect cells. The yield of VLPs accumulating in the nuclei of baculovirus-infected insect cells was particularly high and they could be easily purified by gradient centrifugations.

To further exploit chimeric VLPs carrying the desired epitopes connected with t-VP3 instead of EGFP, we examined the potential of EGFP-VLPs to induce maturation of DC *in vitro*. Previously, VLPs derived from the mouse polyomavirus major structural protein, VP1, were analysed for the stability and immunogenicity following intranasal administration

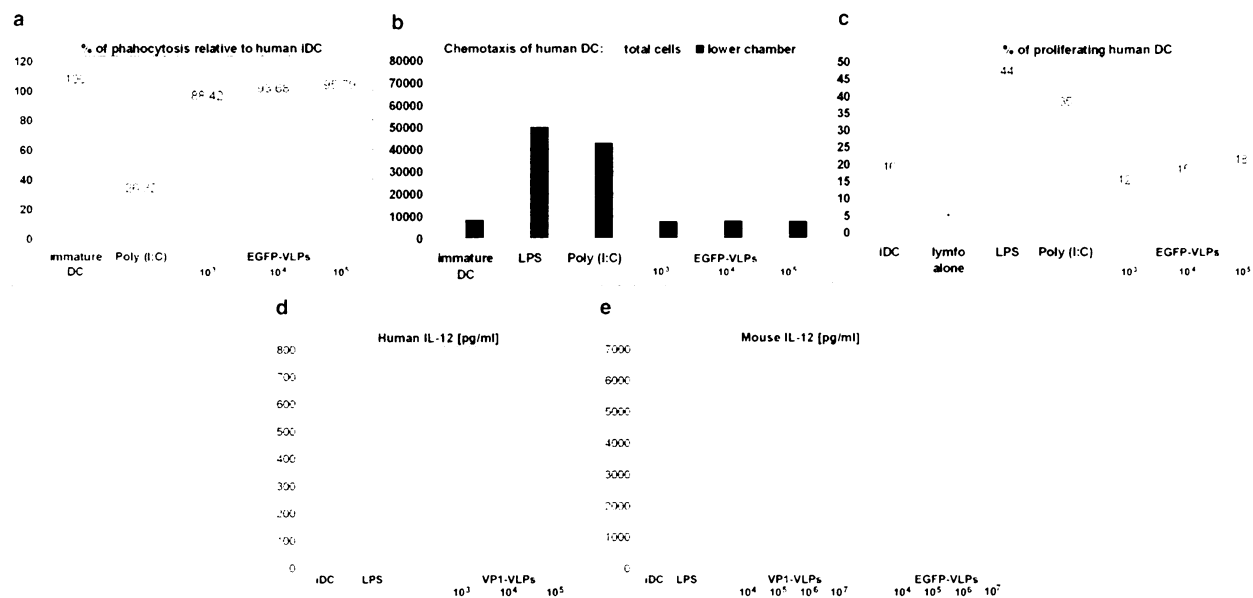


Fig. 11. Functional characteristics of DC after the interaction with EGFP-VLPs. FITC-dextran uptake (a) DC were pulsed with FITC-dextran (1 mg/ml) and analyzed by FACS. Values represent relative endocytic activity of DC compared to the immature DC. Representative result of three independent experiments with different DC preparations is shown. Migratory capacity of DC in response to MIP-3 β : (b) white bars represent the number of DC seeded in the upper wells. Black bars show the number of cells that migrated into the lower wells of the transwell chamber. T-cell allostimulatory capacity of DC: (c) DC that interacted with EGFP-VLPs were used as stimulators of CFSE-labelled CD4 T lymphocytes. Activation capacity is expressed as a percentage of proliferating T cells on day 5. Secretion of IL-12 by DC interacting with EGFP-VLPs: (d,e) the quantity of biologically active p70 IL-12 heterodimer was analyzed in supernatants from cultures of human DC 24 h p.a. of EGFP-VLPs (d) and p40 IL-12 production by mouse DC was analysed from culture supernatants 24 h p.a. of VP1-VLPs or EGFP-VLPs (e). Experiments were done three times for each experiment with DC cultured for 5 days before addition of particles. Results of one representative experiment are shown.

without adjuvans into mice [14,15]. Strong humoral and cellular Th1 responses were observed after the first dose of VLPs and were efficiently boosted after a second dose [15]. Mechanism of immune system induction by PyV-VLPs remains unclear. Dendritic cells are recognised as the most potent professional APCs, which interact with naive T cells and thus initiate primary immune responses. Exogenous antigens need to be internalised and processed in the endo-lysosomal compartments of APCs to be presented to T cells in complex with MHC II molecules. Recently, increasing evidence appeared that in DC, internalised exogenous antigens, including VLPs, can also access the MHC class I presentation pathway (cross-presentation). After being captured by endocytosis, some exogenous non-cytosolic antigens (immune complexes, heat shock proteins, apoptotic cells and also VLPs) can gain access to the MHC class I pathway of antigen presenting cells by cross-presentation through several alternative processing pathways [33,34]. Two main routes of cross-presentation have been proposed: one of them involves the escape of antigens from endosomes to the cytosol following further the cytosolic pathway used by endogenous antigens [23,35] and in the second one, antigens are fully processed inside the endosomes binding to recycling MHC class I molecules [36,37]. It was shown that VLPs of hepatitis C virus [38], SHIV VLPs [39] and also porcine parvovirus VLPs [23] entered DC efficiently and the uptake was followed by DC activation, which indicates that the uptake led to antigen processing. Also non-enveloped human or bovine papillomaviruses were reported to induce maturation of dendritic cells in vitro by

upregulating MHC class I and II molecules, CD80, CD86, CD40, CD54, and to induce production of IL-12 p70 [40]. In the same study, human polyomaviruses BK and JC failed to induce maturation of DC cells in vitro [40]. We showed that neither mouse polyomavirus chimeric EGFP-VLPs nor VLPs derived solely from the VP1 structural protein did upregulate CD80, CD83, CD86 of human or mouse DC. Also, in in vitro experiments, PyV-derived VLPs did not change (i) the migratory capacity of human DC in response to MIP-3 β , (ii) the competence to stimulate T-cell proliferation and (iii) the ability of phagocytosis. Notwithstanding, EGFP-VLPs had adsorbed on human and mouse DC and were internalised efficiently. We did not observe differences in VLP trafficking in fibroblasts and epithelial and dendritic cells. The endocytic pathway used by mouse polyomavirus and VLPs is not completely understood. In the cell types used, PyV-VLPs were internalised via a sialylated receptor into smooth monopinocytic vesicles, which fused particularly with early endosomes and later appeared further in recycling endosomes and in ER cisternae compartments. Substantial fraction of monopinocytic vesicles was also positive for caveolin-1 immunostaining [41]. Nevertheless, the question how VLPs or other antigens enter the cross-presentation pathway is currently not fully elucidated.

In contrast, as mentioned above, in vivo experiments proved the ability of mouse polyomavirus VLPs to induce strong humoral and cellular responses in experimental animals [13–15]. Differences in behaviour between in vitro and in vivo treated cells may exist. One possible explanation for induction of cellular immunity in vivo can be concealed in

a recently described novel alternative mechanism of cross-presentation by gap-junction-mediated immunological coupling [42]. Neijssen et al. [42] showed that peptides generated by proteosomal degradation in one cell could diffuse from the cytoplasm through gap junctions to the neighbour cells. The authors also showed that monocytes can use coupling through gap junctions to load its own MHC I molecules with viral peptides derived from adjacent infected cell. We observed that a subpopulation of mouse PyV-VLPs appeared in lysosomes after internalisation by DC and other cell types. Later, the majority of VLPs entered endoplasmic reticulum and were dispatched to the cytoplasm for degradation in proteasomes. However, the signal of VP1 protein moving in the direction to the cell periphery could be still seen 24 h p.i. (Fig. 9). Further experiments are required to test whether gap-junction-mediated immunological coupling plays a role in the induction of strong immune responses to PyV-VLPs in experimental animals. Interestingly, production of IL-12, one of the major DC derived factors regulating T and B cell activation was induced by mouse PyV VLPs in human and also in mouse DC. IL-12 is a heterodimeric pro-inflammatory cytokine that induces the production of interferon- γ , favours the differentiation of Th1 cells and forms a link between innate resistance and adaptive immunity. IL-12 might feed back to regulate APC in in vivo conditions. Both macrophages and DC express functional IL-12 receptors [43].

In conclusion, we constructed VLPs derived from mouse polyomavirus that contain foreign protein (EGFP) fused to C-terminal sequences of minor antigens, responsible for their interaction with the central cavity of VP1 capsomeres. These chimeric VLPs were assembled in the nuclei of insect cells infected by recombinant baculovirus and efficiently purified by gradient centrifugations. Pseudocapsids were irregular in size and often imperfectly assembled, apparently due to steric stress caused by the presence of fusion proteins. Despite their disturbed shape, they delivered foreign protein into host cells and were efficiently internalised and processed also by human and mouse dendritic cells. Neither VLPs composed of VP1 only, nor EGFP-VLPs upregulated co-stimulation molecules and other markers of DC maturation in vitro. On the other hand, they did induced production of the IL-12. Despite extensive research, more detailed studies, both in vitro and in vivo, will be necessary for reasonable designing of protective vaccines.

Acknowledgements: This work was generously supported by the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic (IGA, NC 6957-3), by the "Centre for New Antivirals and Antineoplastics" (1M6138896301) and MSM 0021620812, both programmes of the Ministry of Education, Youth and Sport of the Czech Republic, and in part, by the Grant Agency of the Czech Republic (Nos. 204/03/0593 and 204/03/H006) and by the project AVOZ 50520514. We are grateful to T. Kalina for assistance in confocal microscopy experiments and Š. Takáčová for assistance in preparation of the manuscript.

References

- [1] Stehle, T., Yan, Y., Benjamin, T.L. and Harrison, S.G. (1994) Structure of murine polyomavirus complexed with an oligosaccharide receptor fragment. *Nature* 369, 160–163.
- [2] Stehle, T. and Harrison, S.C. (1996) Crystal structures of murine polyomavirus in complex with straight-chain and branched-chain sialyloligosaccharide receptor fragments. *Structure* 4, 183–194.
- [3] Tsai, B., Gilbert, J.M., Stehle, T., Lencer, W., Benjamin, T.L. and Rapoport, T.A. (2003) Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40. *EMBO J.* 22, 4346–4355.
- [4] Moreland, R.B., Montross, L. and Garcea, R.L. (1991) Characterization of the DNA-binding properties of the polyomavirus capsid protein VP1. *J. Virol.* 65, 1168–1176.
- [5] Griffith, J.U.P., Griffith, D.L., Raymment, I., Murakami, W.T. and Caspar, D.L.D. (1992) Inside polyomavirus at 25-Å resolution. *Nature* 355, 652–654.
- [6] Sahli, R., Freund, R., Dubensky, T., Garcea, R., Bronson, R. and Benjamin, T. (1993) Defect in entry and altered pathogenicity of a polyoma virus mutant blocked in VP2 myristylation. *Virology* 192, 142–153.
- [7] Mannová, P., Liebl, D., Krauzewicz, N., Fejtová, A., Štokrová, J., Palková, Z., Griffin, B.E. and Forstová, J. (2002) Analysis of mouse polyomavirus mutants with lesions in the minor capsid proteins. *J. Gen. Virol.* 83, 2309–2319.
- [8] Forstová, J., Krauzewicz, N., Wallace, S., Street, A.J., Dilworth, S.M., Beard, S. and Griffin, B.E. (1993) Cooperation of structural proteins during late events in the life cycle of polyomavirus. *J. Virol.* 67, 1405–1413.
- [9] Forstová, J., Krauzewicz, N., Sandig, V., Elliott, J., Palková, Z., Strauss, M. and Griffin, B.E. (1995) Polyoma virus pseudocapsids as efficient carriers of heterologous DNA into mammalian cells. *Hum. Gene Ther.* 6, 297–306.
- [10] Soeda, E., Krauzewicz, N., Cox, C., Štokrová, J., Forstová, J. and Griffin, B.E. (1998) Enhancement by polylysine of transient, but not stable, expression of genes carried into cells by polyoma VP1 pseudocapsids. *Gene Ther.* 5, 1410–1419.
- [11] Krauzewicz, N., Štokrová, J., Jenkins, C., Elliot, M., Higgins, C.F. and Griffin, B.E. (2000) Virus-like gene transfer into cells mediated by polyoma virus pseudocapsids. *Gene Ther.* 7, 2122–2131.
- [12] Krauzewicz, N., Cox, C., Soeda, E., Clark, B., Rayner, S. and Griffin, B.E. (2000) Sustained ex vivo and in vivo transfer of a reporter gene using polyoma virus pseudocapsids. *Gene Ther.* 7, 1094–1102.
- [13] Clark, B., Caparrós-Wanderley, W., Musselwhite, G., Kotecha, M. and Griffin, B.E. (2001) Immunity against both polyomavirus VP1 and a transgene product induced following intranasal delivery of VP1 pseudocapsid-DNA complexes. *J. Gen. Virol.* 82, 2791–2797.
- [14] Heidari, S., Vlastos, A., Ramqvist, T., Clark, B., Griffin, B.E., Garcia, M.I., Perez, M., Amati, P. and Dalianis, T. (2002) Immunization of T-cell deficient mice against polyomavirus infection using viral pseudocapsids or temperature sensitive mutants. *Vaccine* 20, 1571–1578.
- [15] Caparrós-Wanderley, W. et al. (2004) Effect of dose and long-term storage on the immunogenicity of murine polyomavirus VP1 virus-like particles. *Vaccine* 22, 352–361.
- [16] Hink, W.F. (1970) Established insect cell line from the cabbage looper, *trichoplusia ni*. *Nature* 226, 466–467.
- [17] O'Reilly, D.R., Miller, L.K. and Luckow, V.A. (1992) *Baculovirus Expression Vectors. A Laboratory Manual*, W.H. Freeman and Company, New York.
- [18] Spisek, R., Brazova, J., Rozkova, D., Zapletalova, K., Sediva, A. and Bartunkova, J. (2004) Maturation of dendritic cells by bacterial immunomodulators. *Vaccine* 22, 2761–2768.
- [19] Zal, T., Volkmann, A. and Stockinger, B. (1994) Mechanisms of tolerance induction in major histocompatibility complex class II-restricted T cells specific for a blood-borne self-antigen. *J. Exp. Med.* 180, 2089–2099.
- [20] Langenkamp, A., Messi, M., Lanzavecchia, A. and Sallusto, F. (2000) Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat. Immunol.* 1, 311–316.
- [21] Greenstone, H.L., Nieland, J.D., de Visser, K.E., DeBruijn, M.L., Kirnbauer, R., Roden, R.B., Lowy, R.B., Kast, W.M. and Schiller, J.T. (1998) Chimeric papillomavirus virus-like particles elicit antitumor immunity against the E7 oncoprotein in an HPV16 tumor model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 1800–1805.
- [22] Zhang, L.F., Zhou, J., Chen, S., Cai, L.L., Bao, Q.Y., Zheng, F.Y., Padmanabha, J., Hengst, K., Malcol, K. and Frazer, I.H. (2000) HPV6b virus-like particles are potent immunogens without adjuvant in man. *Vaccine* 18, 1051–1058.

- [23] Morón, V.G., Rueda, P., Sedlik, Ch. and Leclerc, C. (2003) In vivo, dendritic cells can cross-present virus-like particles using an endosome to cytosolic pathways. *J. Immunol.* 171, 2242–2250.
- [24] Breitburd, F., Kirnbauer, R., Hubbert, N.L., Nonnenmacher, B., Trin-Dinh-Desmarquet, C., Orth, G., Schiller, J.T. and Lowy, D.R. (1995) Immunization with virus-like particles from cotton tail rabbit papillomavirus (CRPV) can protect against experimental CRPV infection. *J. Virol.* 69, 3959–3963.
- [25] Suzich, J.A., Ghim, S.J., Palmer-Hill, F.J., White, W.I., Tamura, J.K., Bell, J.A., Newsome, J.A., Jenson, A.B. and Schlegel, R. (1995) Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 11553–11557.
- [26] Kirnbauer, R., Chandrqachud, L., O'Neil, B., Wagner, E., Grindlay, G., Armstrong, A., McGarvie, G.M., Schiller, J.T., Lowy, D.R. and Campo, M.S. (1996) Virus-like particles of Bovine papillomavirus Type 4 in prophylactic and therapeutic immunization. *Virology* 219, 37–44.
- [27] Harro, C.D., Pang, Y.Y., Roden, R.B., Hildesheim, A., Wang, Z., Reynolds, M.J., Mast, T.C., Robinson, R., Murphy, B.R., Karron, R.A., Dillner, J., Schiller, J.T. and Lowy, D.R. (2001) Safety and immunogenicity trial in adult volunteers of a human papillomavirus type 16 L1 virus-like particle vaccine. *J. Natl. Cancer Inst.* 93, 284–292.
- [28] Nieland, J.D., Da Silva, D.M. and Velders, M.P., et al. (1999) Chimeric papillomavirus virus-like particles induce a murine self-antigen-specific protective and therapeutic antitumor immune response. *J. Cell Biochem.* 73, 145–152.
- [29] Kaufmann, A.M., Nieland, J., Schinz, M., Nonn, M., Gabelsberg, J., Meissner, H., Muller, R.T., Jochmus, I., Gissmann, L., Schneider, A. and Durst, M. (2001) HPV16 L1E7 chimeric virus-like particles induce specific HLA-restricted T cells in humans after in vitro vaccination. *Int. J. Cancer.* 92, 285–293.
- [30] Gleiter, S., Stubenrauch, K. and Lilie, H. (1999) Changing the surface of a virus shell by fusion of an enzyme to polyoma VP1. *Protein Sci.* 8, 2562–2569.
- [31] Gleiter, S. and Lilie, H. (2001) Coupling of antibodies via protein Z on modified polyoma virus-like particles. *Protein Science* 10, 434–444.
- [32] Abbing, A., Blaschke, U.K., Grein, S., Kretschmar, M., Stark, Ch.M.B., Thies, J.W., Walter, J., Weigand, M., Woith, D.C., Hess, J. and Reiser, Ch.O.A. (2004) Efficient intracellular delivery of a protein and a low molecular weight substance via recombinant polyomavirus-like particles. *J. Biol. Chem.* 279, 27410–27421.
- [33] Heath, W.R. and Carbone, F.R. (2001) Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 47–64.
- [34] Reimann, J. and Schimbeck, R. (1999) Alternative pathways for processing exogenous and endogenous antigens that can generate peptides for MHC class I restricted presentation. *Immunol. Rev.* 172, 131–152.
- [35] Heath, W.R. and Carbone, F.R. (2001) Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* 1, 126–134.
- [36] Gromme, M., Uytdehaag, F.G., Janssen, H., Calafat, J., van Binnendijk, R.S., Kenter, M.J., Tulp, A., Verwoerd, D. and Neefjes, J. (1999) Recycling MHC class I molecules and endosomal peptide loading. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 10326–10331.
- [37] Morón, G., Dadaglio, G. and Leclerc, C. (2004) New tools for antigen delivery to the MHC class I pathway. *Trends Immunol.* 25, 92–97.
- [38] Barth, H., Ulsenheimer, A., Pape, G.R., Diepolder, H.M., Hoffman, M., Neumann-Haefeling, C., Thimme, R., Hanneke, P., Klein, R., Paranhos-Baccala, G., Depla, E., Liang, T.J., Blum, H.E. and Baumert, T.F. (2005) Uptake and presentation of hepatitis-C virus-like particles by human dendritic cells. *Blood* 105, 3605–3614.
- [39] Zhang, R., Li, M., Chen, C. and Yao, Q. (2004) SHIV virus-like particles bind and activate human dendritic cells. *Vaccine* 23, 139–147.
- [40] Lenz, P., Day, P.M., Pang, Y.-Y.S., Frye, S.A., Jensen, P.N., Lowy, D.R. and Schiller, J.T. (2001) Papillomavirus-like particles induce acute activation of dendritic cells. *J. Immunol.* 166, 5346–5355.
- [41] Richterová, Z., Liebl, D., Horák, M., Palková, Z., Štokrová, J., Hozák, P., Korb, J. and Forstová, J. (2001) Caveolae are involved in the trafficking of mouse polyomavirus virions and artificial VP1 pseudocapsids towards cell nuclei. *J. Virol.* 72, 10880–10891.
- [42] Neijssen, J., Herberts, C., Drijfhout, J.W., Reits, E., Janssen, L. and Neefjes, J. (2005) Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions. *Nature* 434, 83–88.
- [43] Langrish, C.L., McKenzie, B.S., Wilson, N.J., deWaal Malefyt, R., Kastelein, R.A. and Cua, D.J. (2004) IL12 and IL23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunol. Rev.* 202, 96–105.