

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

**STUDIUM IMUNOMODULAČNÍCH VLASTNOSTÍ  
PROTEINŮ TEPELNÉHO ŠOKU**

**DIZERTAČNÍ PRÁCE**

Mgr. Kateřina Zachová

Školitel: Doc. MUDr. Mgr. Milan Raška, Ph.D.

Školící pracoviště: Ústav imunologie, LF UP Olomouc

Studijní obor: Lékařská imunologie

Olomouc 2015

## **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem dizertační práci vypracovala samostatně a veškerá použitá literatura je v ní řádně uvedena.

V průběhu studia byla práce podporovaná evropským grantem MuNanoVac LSHP-CT-2006-03720, grantem MSM 6198959223 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky, vnitřním grantem Lékařské fakulty LF\_2014\_20 a RVO: 61989592, Univerzity Palackého v Olomouci, grantem CZ.1.07/2.3.00/20.0164 Rozvoj mezinárodního týmu excelence pro výzkum a cílenou léčbu hematologických a imunologických chorob a grantem LO1204 Udržitelný rozvoj výzkumu v Centru regionu Haná Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (MŠMT)

.....

Mgr. Kateřina Zachová

V Olomouci dne

**Poděkování:**

Nejprve bych chtěla poděkovat svému školiteli doc. MUDr. Mgr. Milanovi Raškovi, PhD. za perfektní odborné vedení, efektivní přístup, odborný přehled a spoustu hodnotných rad během celého mého postgraduálního studia.

Velké díky patří i všem ostatním pracovníkům Ústavu imunologie v Olomouci za pomoc a spolupráci při menších či větších experimentech.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině za neustálou podporu, motivaci a trpělivost při celém mém postgraduálním studiu.

# Obsah

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI .....	1
LÉKAŘSKÁ FAKULTA .....	1
Obsah.....	4
1 Úvod .....	7
1.1 Proteiny tepelného šoku.....	7
1.1.1 Antigeny konjugované s hsp vyvolávají CD8 <sup>+</sup> T lymfocytární odpověď .....	7
1.1.2 Mechanismus zkřížené prezentace antigenů konjugovaných s hsp .....	8
1.1.3 Aktivace dendritických buněk pomocí hsp .....	8
1.1.4 Příklady experimentální imunizace onkologických pacientů nádorovými nebo virovými antigeny konjugovaných s hsp.....	9
1.2 HIV virus a p24 antigen.....	9
1.3 Antigen prezentující buňky .....	12
1.3.1 Stimulace CD4 <sup>+</sup> T lymfocytů přes MHCII molekuly .....	12
1.3.2 Stimulace CD8 <sup>+</sup> T lymfocytů přes MHCI molekuly.....	13
1.3.3 Jedinečnost dendritických buněk.....	14
1.3.4 Cesty zkřížené prezentace .....	15
1.3.5 Využití zkřížené prezentace při konstrukci vakcín .....	21
2 Cíle dizertační práce.....	24
3 Materiál a metody.....	25
3.1 Příprava DNA konstruktů .....	25
3.1.1 Izolace celkové RNA a prepis do DNA kódující hsp70.....	25
3.1.2 Ligace cDNA pro myši hsp70 do klonovacího vektoru pCR II Blunt TOPO....	25
3.1.3 Příprava expresních vektorů pET101 – hsp70 a pcDNA3.1. – hsp70.....	27
3.1.4 Příprava p24 a fúzních hsp70 – p24, p24 – hsp70 .....	28
3.2 Exprese proteinů v savčích buňkách 293T .....	33
3.2.1 Ověření exprese pomocí Western Blot analýzy .....	33
3.2.2 Ověření exprese pomocí fluorescenční analýzy.....	33
3.3 Exprese proteinů v bakteriích E. coli.....	34
3.4 Purifikace proteinu hsp70mm.....	34
3.4.1 Analýza kontaminace pomocí hmotnostního spektrometru .....	34
3.4.2 Exprese při různých teplotách .....	35

3.4.3	Suplementace expresního média .....	35
3.4.4	Stanovení stability rekombinantního hsp70mm.....	35
3.5	Exprese proteinů p24, p24 – hsp70 a hsp70 – p24 v <i>E. coli</i> .....	35
3.6	ATPázová aktivita .....	35
3.7	Odstranění LPS.....	36
3.8	DNA vakcinace.....	36
3.8.1	Stanovení buněčné odpovědi pomocí ELISPOT.....	37
3.8.2	Stanovení specifických protilátek metodou ELISA .....	37
3.9	Vakcinace rekombinantními proteiny .....	38
3.9.1	Stanovení buněčné odpovědi pomocí ELISPOT.....	38
3.9.2	Stanovení specifických protilátek metodou ELISA .....	38
3.10	Izolace dendritických buněk .....	39
3.11	Afinitní purifikace protilátek specifických k p24 ze séra imunizovaných myší....	40
3.12	Konfokální mikroskopie .....	40
3.13	Průtoková cytometrie .....	41
4	Výsledky.....	42
4.1	Příprava expresních vektorů kódujících rekombinantní proteiny.....	42
4.2	Ověření exprese rekombinantních proteinů v savčích buňkách <i>in vitro</i> .....	43
4.3	DNA vakcinace: .....	44
4.4	Prokaryotní exprese: .....	46
4.4.1	Purifikace proteinu hsp70.....	46
4.4.2	Optimalizace kultivačních podmínek vedoucích k potlačení exprese GFAT ....	48
4.4.3	Stanovení stability rekombinantního hsp70mm.....	51
4.4.4	Příprava fúzních proteinů a p24 .....	52
4.4.5	ATPázová aktivita heat shock proteinů.....	53
4.4.6	Odstranění lipopolysacharidů (LPS) .....	55
4.5	Vakcinace myší.....	55
4.5.1	Analýza humorální imunitní odpovědi.....	55
4.5.2	Analýza buněčné imunitní odpovědi.....	57
4.6	Stanovení aktivace BMDC pulzovaných fúzními hsp70 proteiny .....	58
4.7	Endocytóza p24 pulzovanými BMDC .....	60
5	Diskuze.....	62
6	Závěr.....	68
7	Souhrn .....	70

8	Summary .....	71
9	Seznam zkratek .....	72
10	Publikace autora .....	76
11	Seznam použité literatury .....	80
12	Přílohy .....	89

# 1 Úvod

## 1.1 Proteiny tepelného šoku

Proteiny tepelného šoku představují širokou, heterologní, ale evolučně značně konzervovanou skupinu proteinů, která může být rozdělena podle molekulových hmotností do 6 rodin. Do první rodiny řadíme malé hsp s molekulovou hmotností mezi 12–43 kDa, dále hsp40, hsp60, hsp70, hsp90, grp94 a do poslední rodiny řadíme velké hsp s molekulovou hmotností 100–110 kDa. Všechny hsp patří do superrodiny stresových proteinů, která současně zahrnuje také proteiny regulující glukosu tzv. grp, dále ubikvitin a lektinové šaperony kalnexin a kalretikulín. Stresové proteiny jsou charakteristicky nadprodukovány při buněčném stresu, např. vysoké teplotě, osmotickém stresu, UV záření nebo zánětu. Ovšem některé hsp převážně z rodiny hsp90 mohou být produkovány konstitutivně. Základní funkcí hsp proteinů je skládání nascentních proteinů. Jako šaperony působí převážně proteiny z rodin hsp60, hsp70 a hsp40. Dále hsp brání agregaci proteinů a také špatnému skládání. Působí jako šaperony intracelulárních signálních proteinů (hsp90, hsp40, hsp70), jelikož je udržují v aktivovaném stavu umožňujícími interakci se substrátem. Hsp jsou ale také součástí degradačních drah (ubiquitin, hsp104) a některé z nich se účastní prezentace antigenů na MHCI molekulách (kalretikulín, kalnexin, grp94, endoplasmin, gp96)[1-3].

### 1.1.1 Antigeny konjugované s hsp vyvolávají CD8<sup>+</sup> T lymfocytární odpověď

V 90. letech bylo zjištěno, že mnoho tumorových tkání exprimuje proteiny vázané na hsp. Tyto komplexy jsou schopny vyvolat antigen – specifickou imunitní odpověď proti konkrétnímu tumoru. Proto se další výzkum zaměřil na izolaci právě komplexů pocházejících z tumorů, které obsahují protein se svým šaperonem z hsp rodiny, a na jejich využití při vyvolávání protektivní antigen – specifické imunitní odpovědi [4]. Naopak hsp izolované ze zdravých tkání jsou imunologicky inaktivní [4]. Předpokládá se, že hsp mohou vést navázaný protein k vazbě na MHCI molekuly a tím umožnit tzv. zkříženou prezentaci (cross – presentation). V tomto případě vážou hsp tumorové antigeny, čímž jsou schopny vyvolat antigen specifickou CD8<sup>+</sup> T lymfocytární odpověď [5]. Výhodou tohoto přístupu je, že vakcinace komplexy hsp – antigen nevyžaduje identifikaci imunogenních epitopů. Tyto epitopy jsou totiž v případě lidských tumorů naprosto unikátní pro každého jedince, a proto je prakticky nemožné hledat vhodné antigeny pro každého pacienta [6-9]. V případě tumor specifických komplexů jsou hsp a antigen vázány nekovalentní vazbou [10]. Zatím bylo

testováno několik hsp schopných vázat nádorové antigeny jako např. gp96, hsp70, hsp90, calreticulin, hsp110 a grp170 [4, 11-16].

Uvedené vlastnosti hsp proteinů byly využity pro konstrukci antivirových nebo antitumorových vakcín vyvolávajících specifickou CD8<sup>+</sup> T lymfocytární imunitní odpověď pomocí imunizace antigeny kovalentně vázanými na hsp různého původu. Hsp se uplatňují jako efektivní signál nebezpečí umožňující aktivaci imunitního systému a současně jako nosič pro antigen umožňující jeho zkříženou prezentaci. Byly testovány buď autologní hsp (hsp70, hsp90, gp96) nebo exogenní hsp (mykobakteriální hsp70). Nejefektivnější přístup pro tvorbu hsp kovalentně vázaných na virové nebo nádorové antigeny je založen na technologii rekombinantních proteinů. Například imunizace myši rekombinantním mykobakteriálním hsp70 fúzovaným s fragmentem ovalbuminu navozovala protekci před aplikací letální dávky melanomových buněk exprimujících ovalbumin [17].

### 1.1.2 Mechanismus zkřížené prezentace antigenů konjugovaných s hsp

Skutečnost, že CD8<sup>+</sup> T lymfocytární odpověď může být vyvolána imunizací experimentálních zvířat antigeny vázanými na hsp, navozuje otázku o mechanismu, jakým je antigen prezentován na MHCI molekulách antigen-prezentujících buněk (APC), přestože je buňkám nabídnut jako exogenní antigen, neboli o mechanismu zkřížené prezentace antigenu zprostředkované hsp nosičem [18]. Aby byly komplexy hsp – antigen efektivně pohlceny APC, musí být hsp rozpoznány specifickými receptory na APC. Tento způsob rozpoznání a pohlcení je znám jako endocytóza zprostředkovaná receptorem (RME) [19]. RME je iniciována vazbou hsp na různé povrchové receptory [19] jako jsou scavengerové receptory LOX – 1 [20], CD91 [21], SREC-1 [22], signální receptor CD-40, nebo Toll-like receptory TLR – 4 [23], TLR – 2 [24], jejichž role je však stále diskutabilní. Exogenní proteiny vázané na hsp jsou takto cílovány přímo do endozomů. Komplexy hsp – antigen jsou poté štěpeny a mohou být prezentovány na MHCI molekulách antigen prezentujících buněk.

### 1.1.3 Aktivace dendritických buněk pomocí hsp

Kromě toho, že hsp zprostředkovávají aktivní internalizaci asociovaného antigenu antigen prezentujícími buňkami, jsou rovněž schopny tyto buňky aktivovat a to pomocí interakce s další skupinou receptorů (CD36, CD11b, SREC-1, SR-A, stabilin-1 a dectin-1) [22, 25-28]. Tím hsp umožní aktivní indukci antigenně specifické buněčné imunitní odpovědi i bez použití adjuvans. Vazba hsp (hsp60, hsp70, hsp90, gp96, popř. kalretikulinu) vede k sekreci zanětlivých cytokinů (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, and GM-CSF), tvorbě NO,



zvýšení exprese povrchových maturačních markerů (MHC-II, CD83, CD86 a CD40) a migraci DC do lymfatických uzlin [29-35].

Při aktivaci APC se zřejmě uplatňují i další tři receptory (CD14, TLR-2 a TLR-4) [24, 36], typičtí zástupci receptorů pro molekulární motivy asociované s patogeny (PAMP). Doposud není jednoznačně uzavřena otázka, zda se na aktivaci podílí přímo hsp nebo pouze kontaminanty, jako endotoxin (LPS) a flagelin, pocházející z hostitelských bakterií použitých po expresi rekombinantních proteinů. Například LPS je znám schopností vázat se na hydrofóbní oblasti hsp proteinů [37-38].

#### 1.1.4 Příklady experimentální imunizace onkologických pacientů nádorovými nebo virovými antigeny konjugovaných s hsp

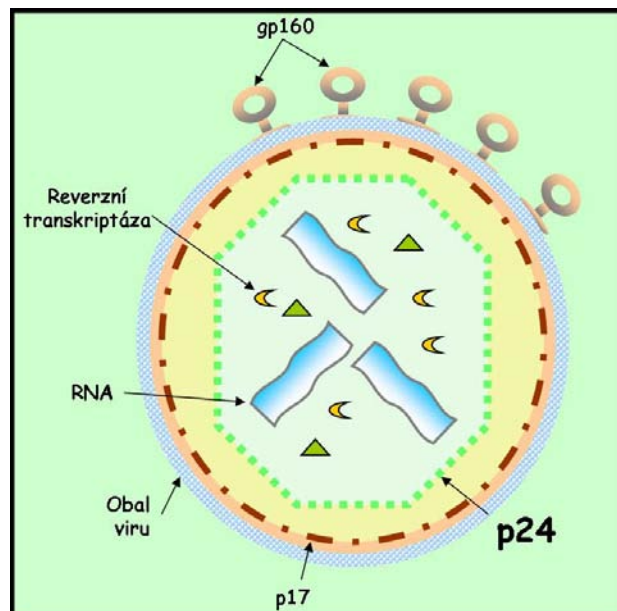
Vakcíny, které obsahují autologní hsp s přirozeně navázanými antigeny, izolované z nádorové tkáně byly testovány v klinických studiích u několika malignit. Pacienti s metastazujícím melanomem byli vakcinováni komplexy gp96 – peptid izolovanými z tumoru. Po vakcinaci bylo naměřeno značné množství nádorově specifických T-lymfocytů [39]. Podobné výsledky byly získány i při vakcinaci pacientů komplexy gp96 - peptid izolovanými z nádorové masy společně s granulocytárním - makrofágovým kolonie - stimulujícím faktorem (GM-CSF) a interferonem- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) [40]. Efekt imunizace komplexy hsp – peptid izolovanými z nádorové masy byl dále studován u karcinomu ledvin [41-42], rakoviny rektu [43], karcinomu plic [44] a glioblastomu [45]. Další imunizační studie jsou průběžně vyhledávány. Naopak, studie efektivity imunizace nádorovými a virovými antigeny arteficiálně fúzovanými s hsp jsou stále doménou laboratorních *in vivo* nebo *in vitro* experimentů. Melanomový antigen TRP2 fúzovaný s hsp70 vykazuje slibné výsledky na myším modelu melanomu [46]. Polyepitop odvozený od nádoru varlete (antigen NY-ESO-1) fúzovaný s hsc70 navozuje efektivní zkříženou prezentaci antigenu dendritickými buňkami [47]. Nádorový marker MAGE3, vyskytující se v mnoha tumorech, fúzovaný s hsp70 byl schopen u experimentálních myší indukovat jak buněčnou tak i humorální odpověď [48]. Aplikace téhož konstruktu ve formě DNA vakcíny navodila rovněž buněčnou a humorální odpověď u experimentálních myší a zpomalovala významně růst inokulovaného syngenního nádoru [49].

## **1.2 HIV virus a p24 antigen**

Vzhledem k vysoké variabilitě HIV neexistuje dlouhodobě efektivní způsob prevence a léčby. Od osmdesátých let, kdy byl HIV virus identifikován jako příčina nově popsaného

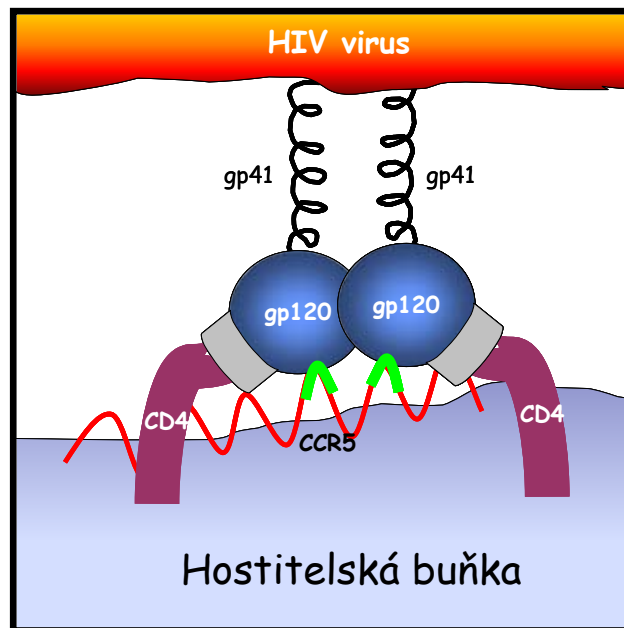
syndromu získané imunodeficiency (AIDS), bylo nakaženo 75 mil. osob a 39 mil. osob na důsledky HIV infekce zemřelo.

HIV je virus patřící do skupiny retrovirů. Genom je nesen ve dvou jednořetězcových molekulách RNA, které jsou vázány na nukleokapsidový protein p7. Virus dále obsahuje reverzní transkriptázu, která slouží k přepisu RNA do DNA, integrázu, která zajišťuje včlenění virové DNA do hostitelské DNA, proteázy a ribonukleázy. Kapsida je tvořena proteinem p24, matrix je složen z proteinu p17 a lipidový obal obsahuje obalový glykoprotein Env, tvořený z podjednotek gp120 a gp41. Env je zodpovědný za adhezi viru a jeho vstup do hostitelské buňky [50]. Kapsidový protein p24, nukleokapsidový protein p7 a matrixový p17 vznikají z prekurzorového polyproteinu *gag* během maturace viru [51].



**Obrázek 1:** Složení viru HIV.

Virové partikule napadají  $CD4^+$  T lymfocyty a monocyty a způsobují jejich postupnou depleci, čímž, společně s dalšími mechanismy, dochází postupně k rozvoji těžké imunodeficiency. K léčbě HIV infekce se využívají léky, které blokují reverzní transkriptázu a virové proteázy a jejich kombinace je základem tzv. vysoce aktivní antiretrovirové terapie (HAART). HAART je schopna významně zpomalit množení viru, není ale schopna vyléčit infikovaného jedince úplně. Další možný způsob léčby se zaměřuje na blokaci adheze viru na hostitelskou buňku a inhibici vniku virových partikulí do buňky. Zaměřuje se na interakci buněčného CD4 receptoru a CCR5 nebo CXCR4 koreceptorů s Env proteinem (**Obrázek 2**), Na obrázku 2 je Env protein znázorněn ve své dimerní formě, což je jedna z možných variant.



**Obrázek 2:** Adheze a vnik virové partikule do hostitelské buňky je závislý na několika proteinech a receptorech.

Mnoho výzkumných týmů usiluje o vývoj efektivní vakcíny proti HIV. Přístupů pro konstrukci vakcín je několik, ovšem vysoká variabilita a nedokonalá znalost potenciálních mechanismů protekce viru toto úsilí značně znesnadňuje.

Jeden z přístupů ke konstrukci vakcíny proti HIV-1 infekci se zaměřuje právě na protein p24 nebo jeho prekurzor Gag. p24 antigen je protein o velikosti 24 kDa, který tvoří kapsidu viru HIV. p24 je pro virus HIV esenciální a navíc je jeho struktura značně konzervovaná oproti například obalovému proteinu Env. Proto je p24 jeden z vhodných kandidátů pro konstrukci efektivní vakcíny [52]. Smyslem p24 vakcíny je indukce specifické buněčné imunitní odpovědi mediované  $CD4^+$  Th1 a  $CD8^+$  T lymfocyty, která se považuje za významnou pro kontrolu počtu virů v době ustanovení stabilní virémie [53]. Přestože je známo několik epitopů na p24 rozlišovaných T lymfocyty, je p24 považován za slabý imunogen [54-55] a proto je třeba při indukci imunitní odpovědi použít vhodné a dostatečně silné adjuvans [56-57].

Vzhledem ke schopnosti vybraných hsp podpořit zkříženou prezentaci asociovaného antigenu a aktivovat APC jsou hsp jedním z potenciálně vhodných kandidátů pro konstrukci vakcín indukujících specifickou T lymfocytární buněčnou odpověď [58].

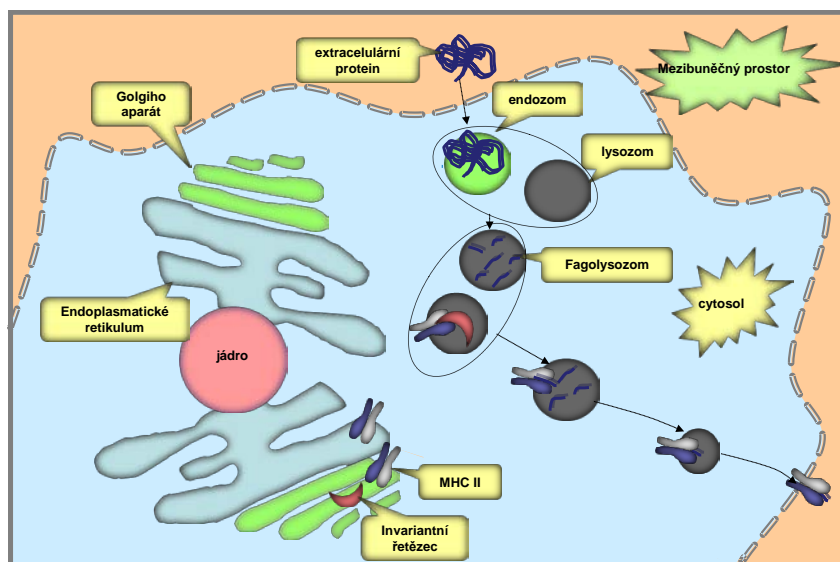
Jeden z doposud testovaných hsp partnerů pro p24 antigen je hsp70 *Mycobacterium tuberculosis*. V podobě fúzního rekombinantního p24 - hsp70 proteinu exprimovaného v *E. coli* [59] byl schopen vyvolat jak humorální, tak i buněčnou imunitní odpověď na p24 protein.

### **1.3 Antigen prezentující buňky**

Prezentace antigenu představuje jednu z nejdůležitějších funkcí APC. Jsou známy dva druhy APC. Profesionální APC, což jsou dendritické buňky (DC), monocyty/makrofágy a B lymfocyty. Profesionální APC mohou pohltnout exogenní antigen a vystavit jeho fragmenty na MHCII molekulách T buněčnému receptoru (TCR)  $CD4^+$  T lymfocytů a iniciovat specifickou imunitní odpověď. Nefesionální APC neexprimují na svém povrchu konstitutivně MHCII molekuly, ale za určitých podmínek může být indukce tvorby MHCII molekul navozena [60]. Jako nefesionální APC již byly identifikovány fibroblasty [61], jaterní sinusoidní endotheliální buňky [62], keratinocyty [60], epitelální buňky slinných žláz [63], epitelální buňky thymu [64], lidské epitelální buňky jícnu [65], lidské epitelální buňky plicních sklípků typu II [66] a jiné epitelální buňky [63, 67-70].

#### **1.3.1 Stimulace $CD4^+$ T lymfocytů přes MHCII molekuly**

Klasická MHCII prezentace antigenu je podrobně popsána již v mnoha publikacích [71]. Ve zkratce, exogenní antigen je fagocytován nebo pinocytován (záleží na velikosti antigenu) antigen prezentující buňkou ve formě malých váčků tzv. fagozomů (pokud se jedná o fagocytózu). Tyto endocytické váčky fúzí s časnými endozomy, což jsou dynamické tubuly a váčky v cytoplazmě s mírně kyselým pH (6,0 - 6,8). Antigen je poté transportován do pozdních endozomů, které již obsahují několik aktivních hydroláz. V pozdních endozomech začíná být tedy antigen hydrolyticky štěpen při pH kolem 5,5. Pozdní endozomy fúzí následně s lysozomy, jejichž vnitřní pH je silně kyselé (pod 5,0) a obsahují vysokou koncentraci hydrolytických enzymů. Pozdní endozomy a lysozomy jsou charakteristické přítomností značného množství proteáz. Nejznámější jsou aminopeptidázy katepsiny H, D, S, L nebo leguamin. Tyto enzymy štěpí antigen na krátké peptidy (dlouhé cca 15-35 aminokyselin). U APC fúzí již brzké endozomy s váčky obsahující MHCII molekuly. Tyto molekuly mají blokovaná svá vazná místa invariantním řetězcem, který zároveň směřuje váčky právě k brzkým endozomům [71]. Proteázy v pozdních endozomech nebo lysozomech odstěpí i část invariantního řetězce. Zůstává pouze část zvaná CLIP, což je peptid tvořený zbytkem invariantního řetězce, který blokuje vazné místo MHCII molekuly. CLIP je nahrazen peptidem vyštěpeným z antigenu až po vazbě na molekulární šaperon HLA-DM [71]. Peptidy asociované s MHCII molekulami jsou poté transportovány na povrch APC a prezentovány  $CD4^+$  T lymfocytům (**Obrázek 3**).



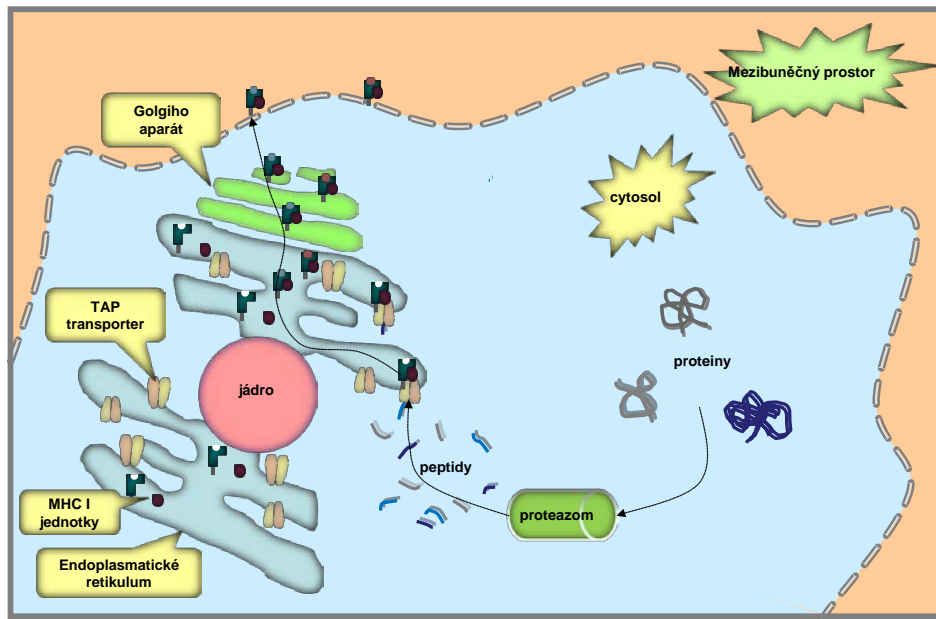
**Obrázek 3:** MHCII prezentace antigenu.

### 1.3.2 Stimulace $CD8^+$ T lymfocytů přes MHCI molekuly

Endogenní antigeny vytvořeny v buňkách jsou prezentovány přes MHCI molekuly  $CD8^+$  T lymfocytům. MHCI molekuly jsou exprimovány na takřka všech buňkách (chybí např. na erythrocytech nebo trofoblastu). Samotná prezentace antigenu začíná v cytoplazmě, kdy jsou intracelulární proteiny označeny ubiquitinem a směřovány do proteazomu. Proteazom je multikatalytická jednotka, kde jsou proteiny štěpeny na krátké peptidy, které jsou následně uvolněny zpět do cytoplazmy. Zde jsou N-terminálními aminopeptidázami zkracovány a následně přenášeny transportéry spojenými se zpracováním antigenu (TAP) do endoplazmatického retikula, kde dochází k finálnímu zkrácení peptidů na délku 8-10 aminokyselin. Poté jsou peptidy navázány na MHCI molekuly. Vazba peptidů na MHCI je několikastupňový proces, do nějž jsou zapojeny šaperony tapasin, kalretikulín a Erp57 [72]. Následně jsou komplexy MHCI-peptid transportovány přes Golgiho aparát na cytoplazmatickou membránu, kde jsou prezentovány  $CD8^+$  T lymfocytům (**Obrázek 4**).

Takto popsaný mechanismus funguje u cytotoxických T lymfocytů (CTL), které zabíjí virem infikované nebo nádorové buňky. Otázkou je, jak jsou tyto CTL indukovány a aktivovány. Vyjdeme-li z předpokladu, že MHCI prezentují pouze endogenní antigeny, znamenalo by to, že CTL mohou indukovat pouze virem infikované nebo nádorově pozměněné DC a makrofágy, což není reálné už vzhledem k faktu, že oba procesy inhibují indukční potenciál obou APC populací. Proto musel zákonitě vzniknout specifický mechanismus, umožňující MHCI prezentaci exogenních antigenů na APC. Tento mechanismus byl objeven v 1976 M. J. Bevanem. Ten nejdříve popsal mechanismus, při

kterém je exogenní antigen pohlcen dendritickými buňkami a štěpen na krátké peptidy. Tyto peptidy jsou posléze navázány na MHCI molekuly a vystaveny na buněčném povrchu, kde aktivují naivní  $CD8^+$  T lymfocyty. Tento děj nazval zkřížené prajmování (cross priming) [73]. Nejaktivnější zkříženě prezentující buňky jsou nezralé DC, které jsou schopny prezentovat na MHCI nespočet exogenních antigenů. Přičemž virové a tumorové antigeny jsou nejlépe popsány [74-75].



**Obrázek 4:** MHCI prezentace antigenu.

### 1.3.3 Jedinečnost dendritických buněk

Čím je zapříčiněna schopnost DC zkříženě prezentovat virové a nádorové antigeny na MHCI molekulách?

Proteiny, které jsou zkříženě prezentovány, jsou nejprve fagocytovány nebo pinocytovány DC a podobně jako antigeny prezentované na MHCII molekulách, jsou naštěpeny na peptidy. Na rozdíl od běžných fagocytů, tráví antigeny endocytované DC relativně dlouhý čas v endocytických organelách, což jim poskytuje větší šanci na alternativní zpracování spočívající buď v aktivním transportu antigenů do cytosolu k zpracování na proteasomech, nebo v částečném naštěpení a vazbě na MHCI molekuly neustále recirkulující mezi povrchem buňky a endozomem. Nezralé DC mohou dočasně brzdit změnu pH v endozomech a derivovaných organelách a tím blokovat lysozomální proteolytické enzymy [76-78]. To je klíčový krok chránící antigen před kompletní degradací dříve, než je určitá frakce antigenu zpracována pro MHC prezentaci. Oddálení degradace antigenu v DC je

možné demonstrovat pozorováními, kdy některé bakterie a apoptotické buňky mohou být obnoveny i několik hodin po pohlčení dendritickou buňkou [79-81]. V porovnání s DC, u makrofágů a neutrofilů dochází k velice rychlé degradaci antigenu na dipeptidy a aminokyseliny. U makrofágů a neutrofilů dochází již 30 min po pohlčení k aktivaci degradačních procesů spojené s iniciální rychlou alkalizací na pH 8,0 [82-85], následované výše zmíněnou rapidní acidifikací, která je způsobena přesunem protonů z cytosolu do lumen endozomů a lyzozomů. Tento přesun je způsoben buď pomocí vakuolární ATP – ázové pumpy, nebo pasivně vodivými či napět'ovými protonovými kanály [86-89].

Komplex, který zodpovídá nepřímo za alkalizaci v raných endozomech, se nazývá NADPH – oxidáza 2 (NOX2). Tato oxidáza zprostředkovává přenos elektronů přes endozomální membránu a tím přispívá k nepřetržité tvorbě reaktivních superoxidových radikálů ( $O_2^-$ ).  $O_2^-$  radikály se dále mění v peroxid vodíku, což je spojeno se spotřebou protonů a vzrůstem pH.  $H_2O_2$  je posléze měněn na další reaktivní kyslíkové sloučeniny (ROS), které se podílejí na zabíjení mikrobů, spotřebování volných protonů a již zmíněné alkalizaci endozomálního lumen [90]. V porovnání s krátkou periodou alkalizace a následnou rapidní acidifikací u neutrofilů, DC mohou udržet takřka neutrální pH po dobu několika hodin [91]. To je způsobeno regulovanou sníženou aktivitou NOX2 a omezeným příjmem podjednotek V-ATPázy z cytosolu do endozomů a lyzozomů [76, 92-93]. U myších zkříženě prezentujících DC, které exprimují ~~CD8~~, byla popsána malá GTP – áza Rac2, která kontroluje fagozomální alkalizaci a tím přispívá ke zkřížené prezentaci [76].

### 1.3.4 Cesty zkřížené prezentace

Od prvního popisu zkřížené prezentace [73], bylo identifikováno několik různých cest, přičemž každá z nich je něčím unikátní. V principu musí všechny cesty zajistit tři kroky zpracování antigenu. Je to štěpení antigenu na peptidy, vazba na MHCI molekuly a prezentace na buněčném povrchu  $CD8^+$  T lymfocytům. Antigen může být fragmentován buď v cytosolu proteazomem (cytosolární cesta), nebo v endozomech samotných pomocí katepsinu S (vezikulární cesta).

Cytosolární cesta je spojována s aktivním a selektivním transportem peptidů do ER [71], přesto bylo potvrzeno, že některé peptidy mohou být z cytosolu transportovány zpět do endozomů, kde se vážou na recyklované MHCI molekuly. Jsou tedy vystaveny na buněčném povrchu bez přispění ER [94]. Časné endozomy nejsou totiž primárně pouze endocytické vezikuly, nýbž jsou jedny z nejvýznamějších třídících a recyklačních organel v eukaryontních buňkách [95].

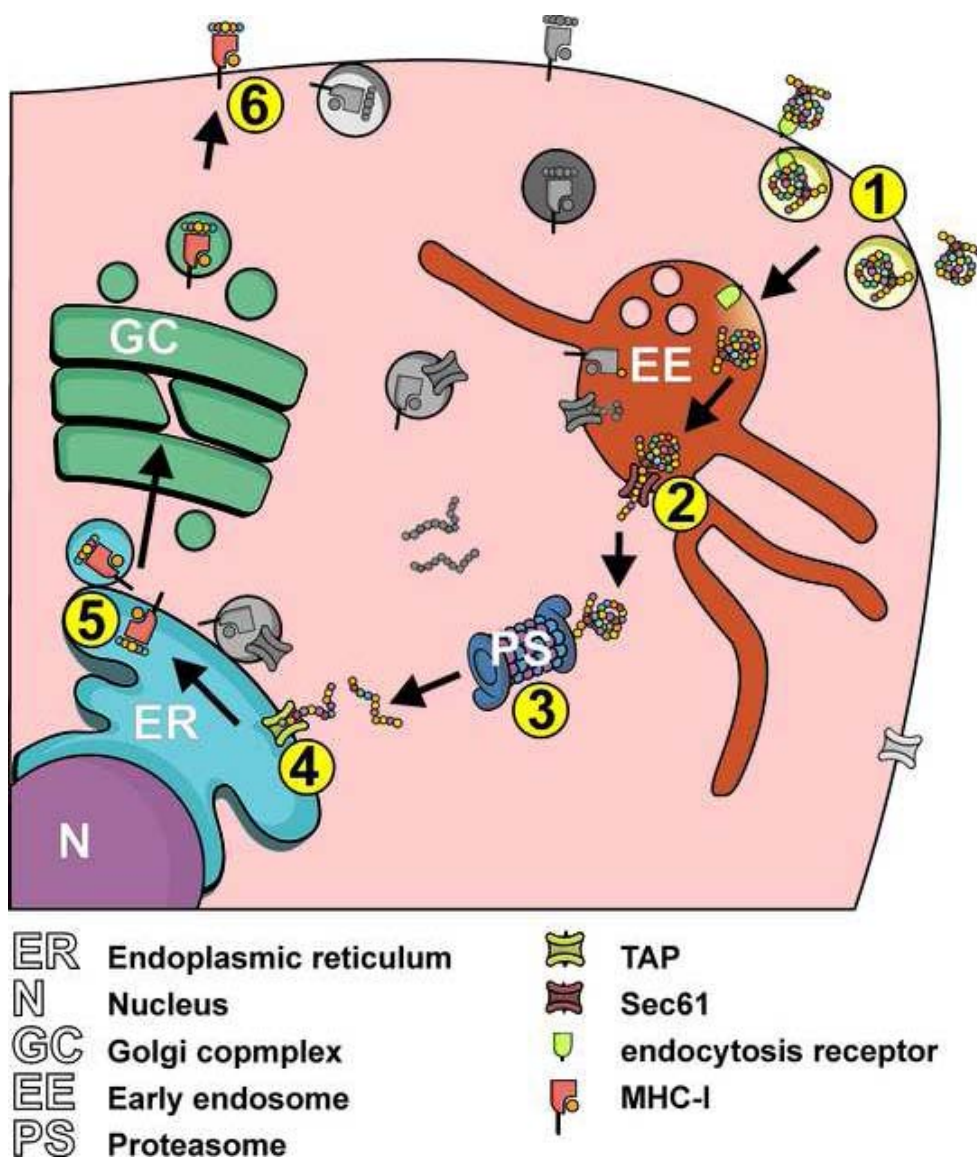
Mechanismus vakuolární zkřížené prezentace vyžaduje buď aktivní recyklaci MHCI molekul z povrchu buňky do brzkých endozomů, nebo transport specifických váčků obsahujících MHCI molekuly z Golgiho aparátu do brzkých endozomů. V každém případě musí dojít k výměně již navázaných peptidů za peptidy derivované ze sledovaného antigenu [96]. Následující kapitoly krátce popisují dosud popsané cesty zkřížené prezentace.

### **Dráha endozom - cytosol**

První popsaná a nejlépe prostudovaná cesta je charakteristická pro svůj aktivní transport antigenu z brzkých endozomů do cytosolu. Zjednodušeně bývá nazývána cytosolární cesta [97-98]. Antigen je nejprve transportován z povrchu buňky pomocí receptorem mediované endocytózy do brzkých endozomů (**Obrázek 5(1)**). Druhým krokem je antigen transportován přes endozomální membránu (**Obrázek 5(2)**). Tento retrográdní transport umožňuje Sec61 komplex [99]. Antigeny jsou poté v cytosolu označeny ubikvitinem a směřovány do proteazomu (**Obrázek 5(3)**) [100-101]. Po hydrolýze v proteazomu jsou peptidy dále směřovány do ER pomocí TAP přenašeče tak jako při klasické MHCI prezentaci endogenních peptidů (**Obrázek 5(4)**). [102]. K finálnímu zkrácování a štěpení antigenu dochází v ER dvěma aminopeptidázami ERAP – 1 a ERAP – 2 [103-104]. Finálně upravené peptidy se váží na MHC-I molekuly (**Obrázek 5(5)**) a jsou přes Golgiho komplex transportovány na povrch APC (**Obrázek 5(6)**).

Cesta endozom – cytosol byla poprvé popsána v makrofázích v roce 1995 [105] a je závislá na TAP a proteazomu. Byla potvrzena jak *in vivo*, tak *in vitro* [98, 106-108].





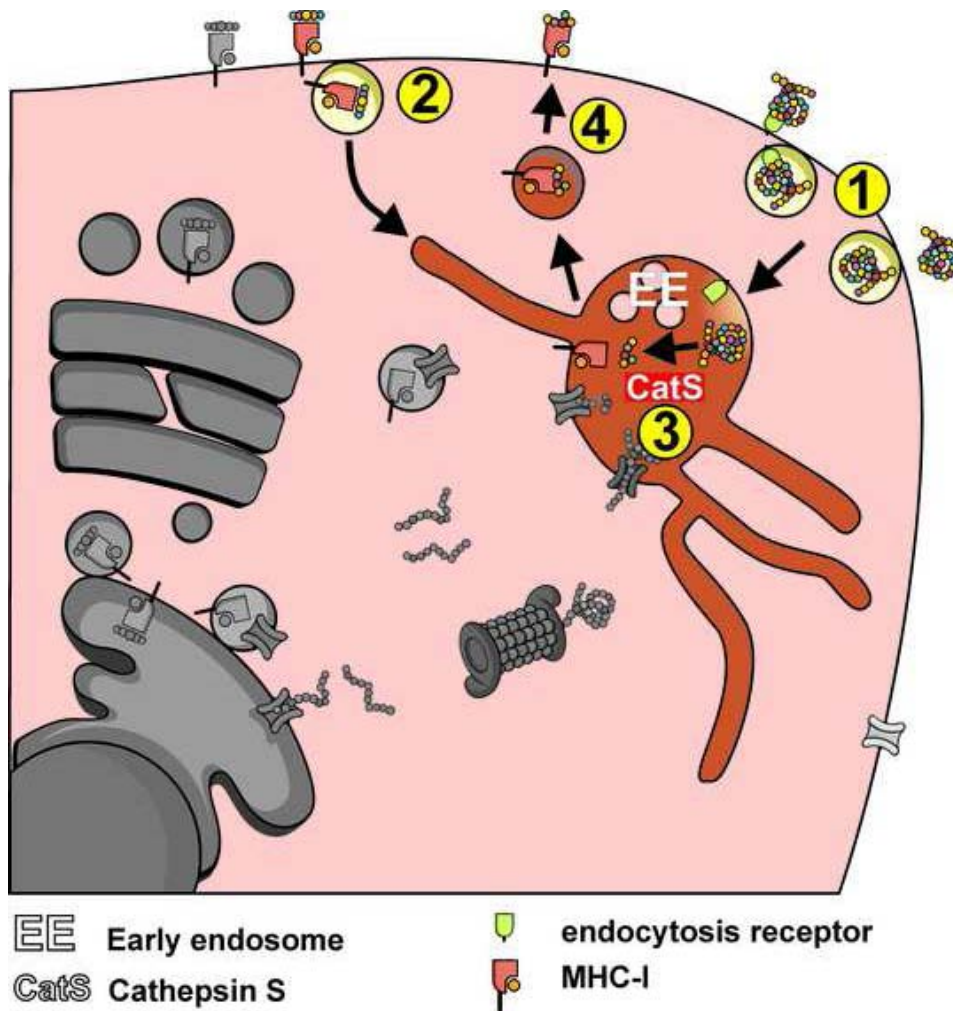
**Obrázek 5:** Cesta endozom – cytosol (Zachová et al., 2015, accepted).

### Vakuolární dráha

Další cesta objevená v myších DC byla nazvána vakuolární. Není totiž citlivá na inhibitory proteazomu, z čehož lze odvodit, že zpracování antigenu není vázané na aktivitu proteasomu a odehrává se přímo v endosomu a dalších asociovaných vakuolách. V porovnání s cytosolární cestou, není vakuolární cesta tak dobře zdokumentovaná. Zdá se, že tato cesta je hojně využívána antigeny vázanými na částicích nebo spojenými s buňkami jako např. antigen vázaný na PLGA partikule, proteiny asociované s *E. coli*, virové proteiny včetně chřipkového nukleoproteinu a polymerázy, partikule podobné virům (VLP), nebo samotný antigen, konkrétně dobře dokumentovaný OVA antigen [108-115]. Štěpení antigenů je prováděno pomocí endozomální cysteinové proteázy katepsin S (Cat S) (**Obrázek 6(3)**), minoritní funkce zastávají také jiné katepsiny B a L (Cat B), asparagin specifická endopeptidáza, nebo

aspartyl proteázy Cat D a E [109, 116]. Díky tomu může být tato cesta blokována inhibitorem cysteinových proteáz leupeptinem. CatS není příliš pH sensitivní, může tedy štěpit i při neutrálním pH, což je u zkřížené prezentace krucální [117]. Endocytovaný protein je štěpen pomocí CatS na peptidy dlouhé 8 – 10 aminokyselin. Tyto peptidy poté nahrazují peptidy na MHC I molekulách pocházejících buď z buněčného povrchu (**Obrázek 6(2)**), nebo z ER. Vakuolární cesta tedy nevyžaduje přítomnost žádné aminopeptidázy (ERAP-1,2) [118-119]. Komplexy MHC I molekul s navázanými peptidy jsou poté transportovány k buněčnému povrchu (**Obrázek 6(4)**).

Vakuolární cesta prezentace antigenu není závislá ani na proteozomu ani na TAP, byla studována *in vivo* na Cat S deficientních myších [109] a *in vitro* na DC [120].

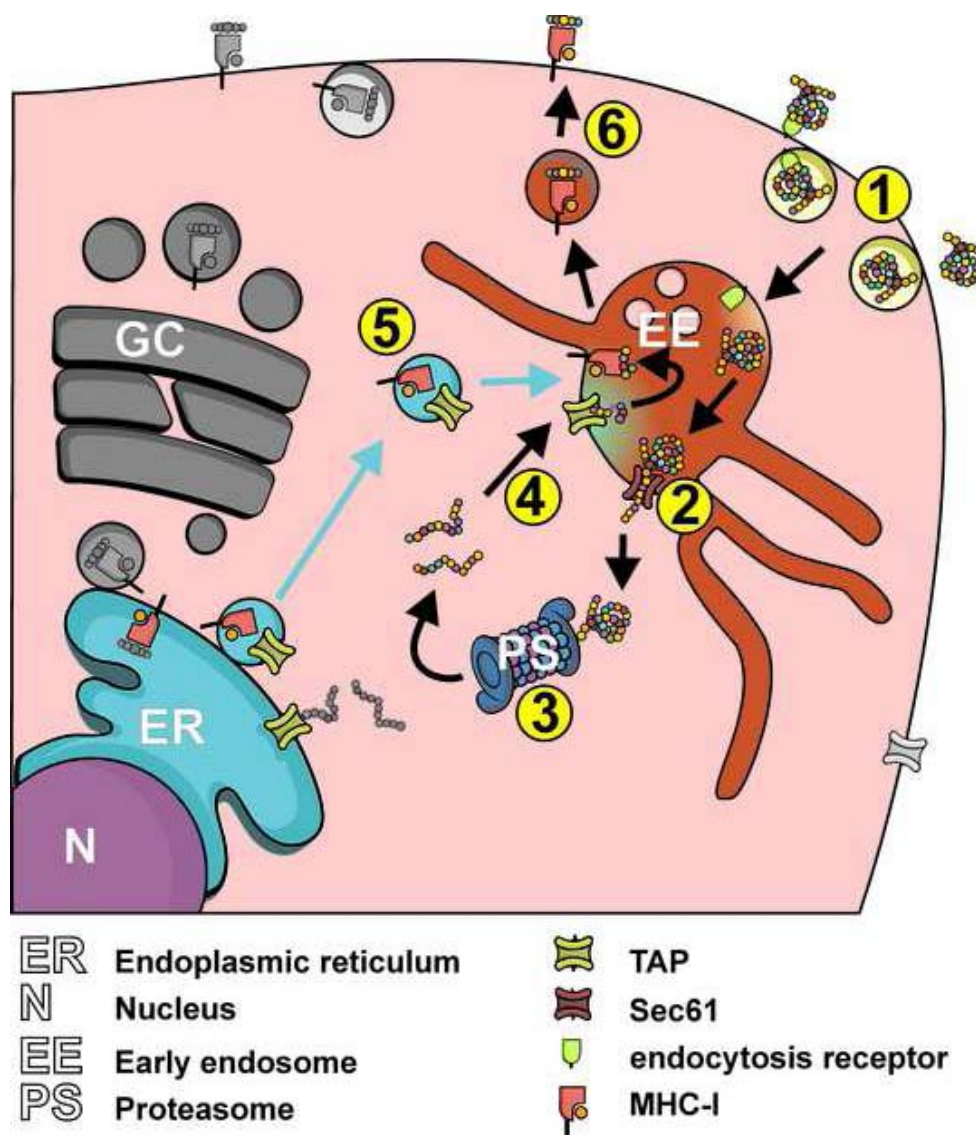


**Obrázek 6:** Vakuolární cesta (Zachová et al., 2015, accepted)

### Dráha endozom – cytosol – endozom

Tato cesta má počáteční úseky shodné s cestou endozom – cytosol. Antigen endocytovaný DC (**Obrázek 7(1)**) je nejprve transportován z endozomu do cytosolu (**Obrázek 7(2)**), kde je částečně štěpen proteazomem (**Obrázek 7(3)**). Poté jsou ale, na rozdíl od endozom - cytosolární cesty, naštěpené peptidy přeneseny zpět do endozomu nebo fagozomu (**Obrázek 7(4)**) [121-122]. Zde jsou všechny proteiny potřebné pro efektivní MHCI prezentaci (TAP, tapasin, lektinové šaperony calnexin a calretikulin, Erp57, MHCI) [121, 123]. Přítomnost proteinů pocházejících z ER v endozomech resp. fagozomech je umožněna fúzí brzkých endozomů s váčky odštěpenými od ER [122, 124]. MHC-I molekuly jsou z ER do endozomu popř. endolysozomu směrovány díky invariantnímu řetězci (CD74) (**Obrázek 7(5)**) [125-126]. Detaily tohoto mechanismu zůstávají zatím nejasné [126]. Finální stěpení peptidů je v endozomech zajištěno aminopeptidázou IRAP (insulinregulated aminopeptidase) [97].

Peptidové fragmenty antigenu jsou vázány na MHCI molekuly [127] a pomocí transportních váček jsou dopraveny na buněčný povrch (**Obrázek 7(6)**). Cesta endozom – cytosol – endozom byla potvrzena *in vitro* v BMDC nebo lidských monocitech [122-123, 126]. Závislost na TAP transportéru byla potvrzena u TAP deficientních myší a také pomocí TAP transportní eseje *in vitro* [122]. Cesta endozom – cytosol – endozom je závislá na proteazomu i TAP transportéru, přičemž TAP transportér je vázán na membránu endozomu.

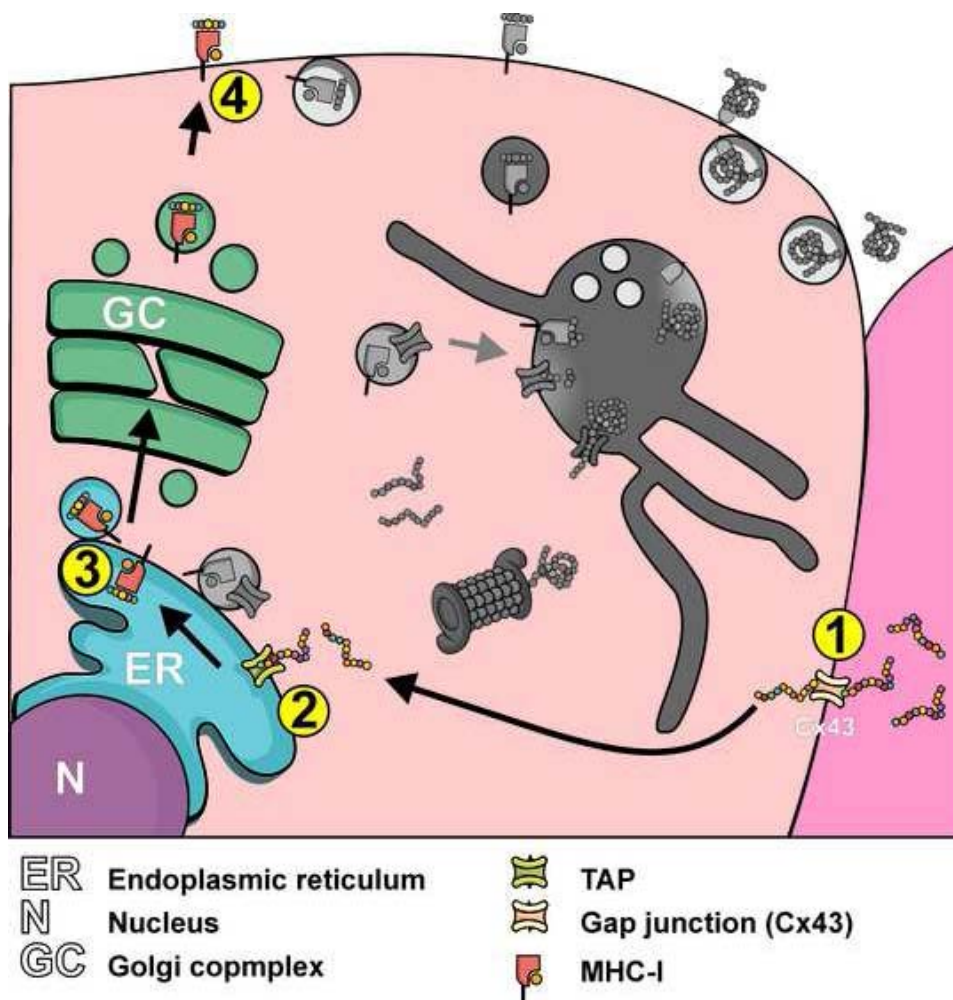


**Obrázek 7:** Cesta endozom – cytosol – endozom (Zachová et al., 2015, accepted).

### Dráha pomocí "Gap junction"

"Gap junction" neboli štěrbinová spojení jsou uzoučké tunely, které spojují cytosol sousedících buněk [128]. Tyto tunely slouží primárně k intercelulární komunikaci a výměně různých molekul. Jedná se o vysoce organizované struktury, které jsou tvořeny hexamery proteinu konexin, a jsou nazývány konexony [128-129]. Vzhledem k tomu že umožňují komunikaci cytosolů sousedících buněk, je možné očekávat, že antigeny či spíše až jejich fragmenty mohou být přes "gap junction" zprostředkovaný transport tzv. GMAT (**Obrázek 8(1)**) přeneseny ze sousedních buněk do DC ke zkřížené prezentaci [128-130]. Jakmile je antigen lokalizován v cytosolu DC, je štěpen na patřičné peptidy, a ty mohou být transportovány do ER (**Obrázek 8(2)**), vázány na MHC I molekuly (**Obrázek 8(3)**) a prezentovány na buněčném povrchu CD8<sup>+</sup> T lymfocytům (**Obrázek 8(4)**) [131].

Intercelulární komunikace "gap junction" byla poprvé pozorována *in vitro* na myších DC [132] a poté na linii derivované z lidského dlaždicobuněčného karcinomu, jež byla po transfekci genem pro connexin 43 schopna přenášet přes štěrbinová spojení nádorově specifické peptidy o velikosti pod 1,8 kDa do přilehlých aktivovaných monocytů. Tento přenos byl detekován antigenně specifickými cytotoxickými T lymfocyty [130] s využitím konfokální a elektronové mikroskopie. K potvrzení transportu pomocí "gap junction" je možné použít i speciální barvivo kalcein - AM [129, 132]. "Gap junction" dráha je závislá na TAP transportéru i proteozomu a má tedy mnohé atributy cytosolární dráhy.

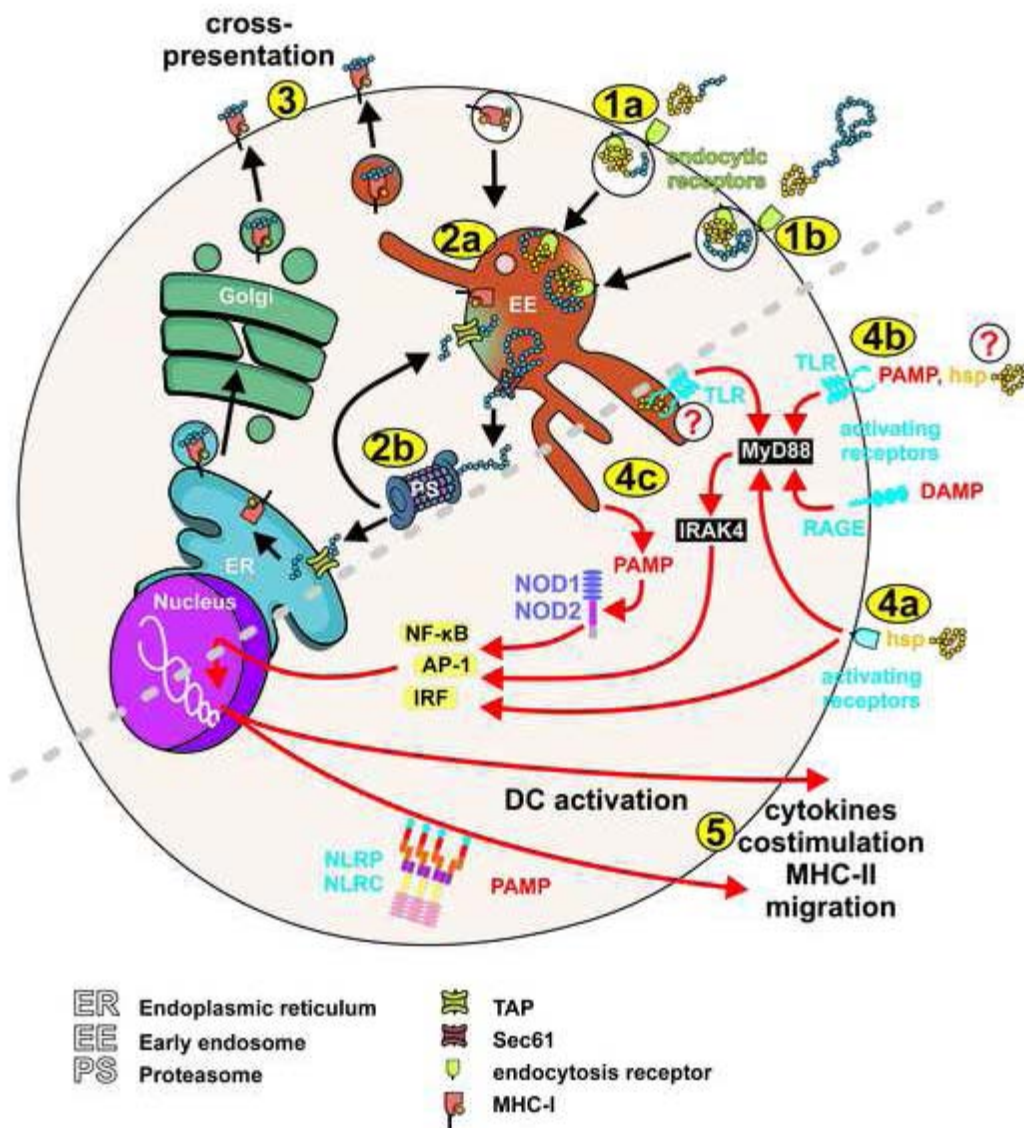


**Obrázek 8:** Cesta "Gap junction" (Zachová et al., 2015, accepted).

### 1.3.5 Využití zkřížené prezentace při konstrukci vakcín

Běžné vakcíny obsahují adjuvans, které navozuje primárně Th2 typ imunitní odpovědi spojené s produkcí převážně neutralizačních protilátek. [133]. Tento typ imunitní odpovědi je ovšem efektivní pouze proti několika typům patogenů a má pouze omezený účinek proti

nádorům nebo virům, neboť zde je vyžadována spíše aktivace buněčné imunitní odpovědi. Proto se poslední dobou stává středem vědeckého zájmu vývoj vakcíny, která by byla schopná navodit antigen-specifickou  $CD8^+$  T lymfocytární odpověď resp. aktivaci cytotoxických lymfocytů (CTL). Popis mechanismů zkřížené prezentace tak umožňuje mnohem efektivněji navrhovat budoucí vakcíny například na bázi hsp nosičů. Mechanismy zapojené při zkřížené prezentaci antigenů asociovaných s hsp jsou znázorněny na **Obrázku 9**.



**Obrázek 9:** Mechanismus vlivu hsp při kros – prezentaci antigenu (Zachová et al., 2015, accepted).

Schéma **Obrázku 9** je podrobně vysvětleno v následujícím odstavci. Peptid (**Obrázek 9(1a)**) nebo antigen (**Obrázek 9(1b)**) (znázorněn modrým řetězcem), který je připojen k hsp (znázorněn žlutým řetězcem), je endocytován po vazbě na receptory CD91, LOX-1, CD36,

nebo CD40. Antigen následně fúzuje s brzkým endozomem a pomocí specifického přenašeče Sec61 je transportován do cytoplasmy, kde je štěpen proteazomem a prezentován endosom - cytosolární drahou (**Obrázek 9(2b)**), nebo je prezentován vakuolární drahou (**Obrázek 9(2a)**). Peptidy lokalizované v cytosolu mohou být transportovány jednak do ER, jednak zpět do endozomu v závislosti na charakteru antigenu. Výsledkem všech drah zkřížené prezentace hsp asociovaných antigenů je vystavení peptidů na MHC-I molekulách na povrchu APC (**Obrázek 9(3)**). Současně hsp aktivují DC pomocí povrchových receptorů (CD36, CD11b, SREC-1, SR-A, stabilin-1, dectin-1) (**Obrázek 9(4a)**) nebo jiných povrchových PAMP či DAMP receptorů (TLR, RAGE, atd) (**Obrázek 9(4b)**). Nicméně zapojení TLR je stále nejasné. Paralelně může i hsp lokalizované v buňce aktivovat DC pomocí několika intracelulárních TLR, PAMP nebo DAMP receptorů (**4c**). Podobně se mohou uplatnit kontaminanty jako flagelin nebo LPS (**Obrázek 9(4b, c)**). Zapojení TLR do aktivace DC vedoucí k indukci efektivní antigeně specifické imunitní odpovědi na zkříženě prezentované antigeny je stále předmětem diskuzí, nicméně nynější poznatky dokazují, že molekuly MyD88 a IRAK4, které jsou klíčovými signálními molekulami TLR, jsou pro indukci této imunitní odpovědi nezbytné [134].

## 2 Cíle dizertační práce

Dizertační práce je zaměřena na studium vlivu fúze virového antigenu p24 a hsp70 na indukci p24 specifické imunitní odpovědi.

Cílem dizertační práce bylo:

1. Izolovat gen kódující myší hsp70 z myších splenocytů. Připravit DNA konstrukty pro expresi hsp70, p24, hsp70-p24 a p24-hsp70 v *E. coli* a v savčích buňkách.
2. Připravit DNA vakcíny kódující hsp70, p24, hsp70-p24 a p24-hsp70.
3. Exprimovat a purifikovat rekombinantní proteiny hsp70, p24, hsp70-p24 a p24-hsp70.
4. Ověřit a podrobněji analyzovat rekombinantní proteiny hsp70, p24, hsp70-p24 a p24-hsp70.
5. Analyzovat potencionální imunomodulační vlastnosti hsp70 pomocí DNA vakcinace.
6. Analyzovat potencionální imunomodulační vlastnosti hsp70 pomocí vakcinace rekombinantními proteiny.
7. Sledovat maturaci a stimulaci dendritických buněk pomocí hsp70, p24, hsp70-p24 a p24-hsp70 *in vitro*.
8. Charakterizovat internalizaci fúzních antigenů BMDC v závislosti na fúzi p24 s hsp70.



## 3 Materiál a metody

### 3.1 Příprava DNA konstruktů

#### 3.1.1 Izolace celkové RNA a přepis do DNA kódující hsp70

Z myších splenocytů byla izolována celková RNA podle protokolu RNeasy Plus Mini Handbook (Qiagen, Hilden, Germany). Koncentrace vyizolované RNA byla stanovena spektrofotometricky. Následný přepis RNA do cDNA byl proveden pomocí SuperScript III reverzní transkriptázy (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) podle přiloženého protokolu. Transkribovaná DNA byla použita v dalších krocích.

#### 3.1.2 Ligace cDNA pro myší hsp70 do klonovacího vektoru pCR II Blunt TOPO

cDNA myšího hsp70 byl amplifikován pomocí PCR. Jako templát byla použita cDNA získaná reverzní transkripcí celkové mRNA a jako primery hsp70md-1 a hsp70mu-1. PCR byla provedena pomocí Phusion polymerázy (Finzyme, Espoo, Finland) v termocykléru PTC 200 (MJ Research, Waltham, Massachusetts USA). Sekvence použitých primerů jsou uvedeny v souhrnné **Tabulce 3** na konci oddílu 3.1 Příprava DNA konstruktů. Složení PCR reakce je shrnuto v **Tabulce 1**.

Složka reakce	Množství	Finální konc.
5x Phusion HF pufr	10 $\mu$ l	1x
2,5 mM dNTPs mix	4 $\mu$ l	200 $\mu$ M
Primer	1 $\mu$ l	0,5 $\mu$ M
Primer	1 $\mu$ l	0,5 $\mu$ M
DNA (0,1 $\mu$ g)	1,7 $\mu$ l	-
Phusion polymeráza	0,5 $\mu$ l	0,02 U/ $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	31,3 $\mu$ l	-

**Tabulka 1:** Složení PCR reakce.

Podmínky PCR reakce jsou shrnuty v **Tabulce 2:**

Průběh PCR	Teplota (°C)	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	98	60s	1
Denaturace	98	5s	30
Nasednutí primerů	49	15s	
Extenze	72	2 min 30s	
Konečná extenze	72	10 min	1
Chlazení	4	10 hod	1

**Tabulka 2:** Podmínky PCR reakce.

Produkt PCR reakce byl rozdělen pomocí 1% agarózové elektroforézy, DNA byla obarvena ethidium bromidem (50ng/ml) a vizualizována UV transiluminátorem. Příslušný proužek odpovídající myši hsp70 byl skalpelem vyříznut a DNA byla z gelu izolována pomocí QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany) podle instrukcí výrobce.

Ligace do klonovacího vektoru pCR II Blunt TOPO (Invitrogen, Groningen, Netherlands) byla provedena podle protokolu výrobce. Směs byla inkubována 15 min při laboratorní teplotě. Poté byla provedena chemická transformace: 3 µl reakční směsi byly pipetovány do One Shot TOP 10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen). Transformační směs byla inkubována 30 min na ledě a následně byla vložena do 42°C termobloku na 30s. Po tepelném šoku bylo ke směsi na ledě přidáno 200 µl SOC média a vzorky byly inkubovány 1 hod na třepačce při 37°C. Kultura byla inokulována na Petriho misky s LB – agarem obsahující kanamycin o koncentraci 50 µg/ml a inkubována při 37°C přes noc.

Jednotlivé kolonie byly inokulovány do tekutého LB – média a inkubovány na třepačce při 37°C přes noc. Následně byla provedena izolace plazmidové DNA pomocí protokolu QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). Izolovaná DNA byla analyzována pomocí restrikční analýzy. Restrikční endonukleázy byly zvoleny tak, aby bylo možné potvrdit identitu ligovaného fragmentu (New England Biolab, Inc.; Beverly, MA USA). Restrikce byla provedena podle instrukcí výrobce. Rozdělení DNA bylo provedeno pomocí již popsané agarózové elektroforézy, barvení DNA pomocí ethidium bromidu a vizualizace DNA pomocí UV transiluminátoru. Po ověření správnosti ligace byla vybrána jedna kolonie k amplifikaci obsažené plazmidové DNA. DNA byla izolována pomocí Qiagen Plasmid Midi Kitu podle přiloženého protokolu a identita plasmidu byla ověřena restrikční analýzou. Poté byl vzorek komerčně sekvenován (Generi Biotech s. r.o., Hradec Králové, ČR). Sekvenací ověřený

vzorek byl použit k dalším klonováním. Vyhodocení restrikčních analýz i komerčních sekvenací bylo prováděno pomocí BioEdit programu.

Ověřený vzorek byl nazván pCRII – hsp70 a byl použit pro další ligace.

### 3.1.3 Příprava expresních vektorů pET101 – hsp70 a pcDNA3.1. – hsp70

Z klonovacího vektoru pCR II Blunt TOPO byla sekvence kódující myši hsp70 přenesena do prokaryontního expresního vektoru pET101 Directional (D) TOPO (Invitrogen) a eukaryontního expresního vektoru pcDNA 3.1 D/V5-His TOPO (Invitrogen, Groningen, Netherlands). Prokaryontní expresní vektor pET101 umožňuje expresi v bakteriích *E. coli*, zatímco eukaryontní vektor slouží k expresi rekombinantních proteinů v savčích buňkách, popř. může sloužit jako DNA vakcína.

Pro přenesení DNA hsp70 z klonovacího vektoru pCR II Blunt TOPO do expresních vektorů byly navrženy nové primery. Primer na 5' – konci obsahuje CACC sekvenci, která slouží v expresních vektorech jako Kozakova sekvence a navíc zajišťuje správnou orientaci vloženého genu. CACC sekvence musí být v bezprostřední blízkosti ATG iniciačního kodonu. Vektory pro TOPO klonování jsou navrženy tak, že před CACC sekvencí se nachází RBS (ribosome binding site), kde nasedá ribozom na DNA. Primery na 3' – konci byly navrženy buď bez stop kodonu pro expresi V5 a His epitopů kódovaných plasmidem na C'konci fúzního proteinu. Tyto primery slouží pro expresi v bakteriích *E. coli*, nebo pro expresi v savčích buňkách. V5 a His epitopy slouží k detekci exprimovaných rekombinantních proteinů. Primery obsahující STOP kodon slouží ke tvorbě plasmidů, které byly následně použity jako DNA vakcína.

#### a) příprava plasmidů pro expresi rekombinantního hsp70 v pET101 nebo pcDNA3.1 (bez STOP kodonu)

Gen kódující hsp70 byl amplifikován pomocí PCR. Jako templát byl použit vektor pCR II – hsp70. Jako primery byly použity Hsp70md-cacc-atg a Hsp70mu-exp. Sekvence použitých primerů jsou uvedeny v souhrnné **Tabulce 3**. Složení PCR reakce jsou shrnuty v **Tabulce 1**.

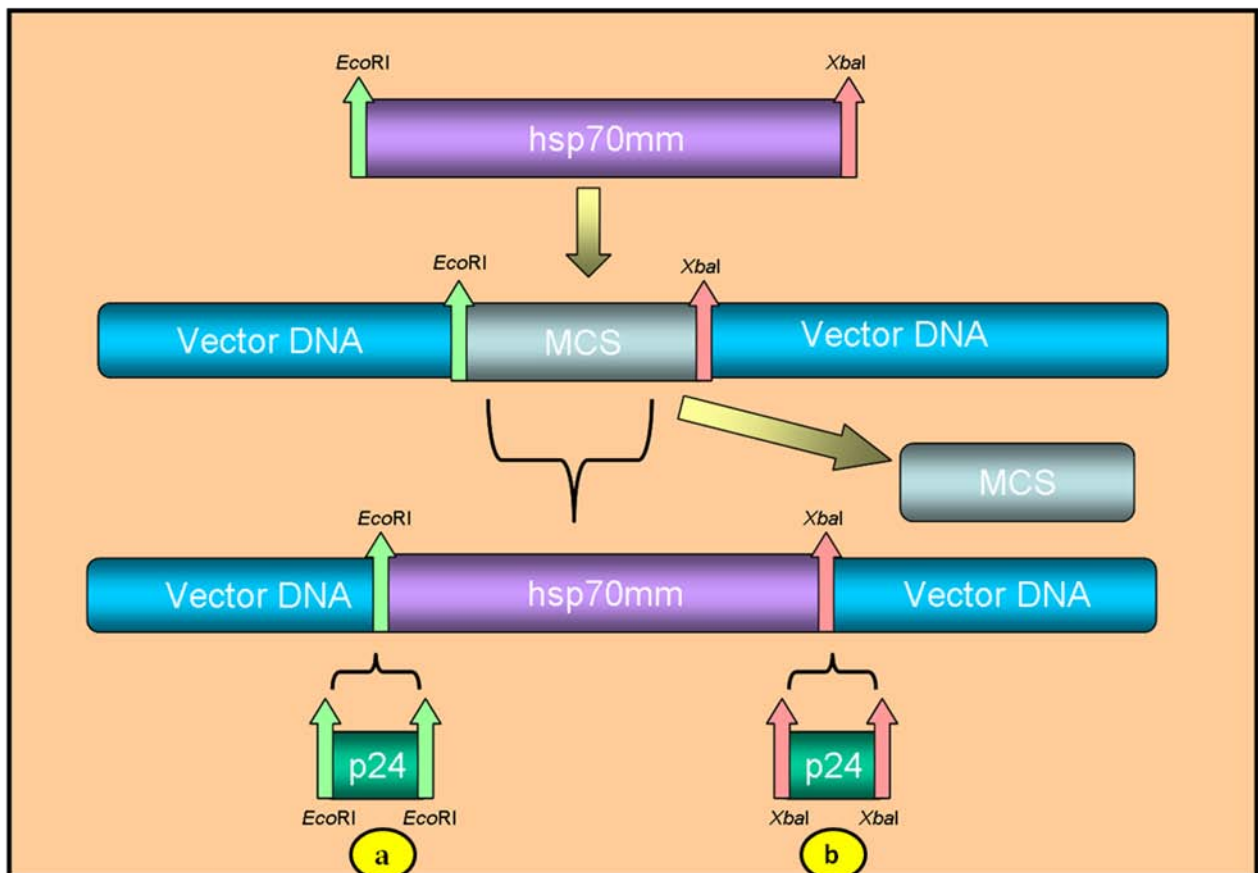
#### b) příprava plasmidu pcDNA3.1 – hsp70 pro účely DNA vakcinace

Gen kódující hsp70 byl amplifikován pomocí PCR. Jako templát byl použit vektor pCR II – hsp70. Jako primery byly použity Hsp70md-cacc-atg a hsp70mm\_STOP. Sekvence použitých primerů jsou uvedeny v souhrnné **Tabulce 3**. Složení o podmínky PCR reakce jsou shrnuty v **Tabulce 1** a v **Tabulce 2**, pouze teplota nasednutí primerů byla 60°C .

Vzniklé PCR produkty byly izolovány a přečištěny podle již zmíněného protokolu v kap. 3.1.2. Ligace cDNA pro myši hsp70 do klonovacího vektoru pCR II Blunt TOPO. Purifikované PCR produkty byly vloženy do plasmidů pET101 nebo pcDNA 3.1 již zmíněnou TOPO – klonovací reakcí podle postupu výrobce (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Ligační reakce byly použity k transformaci *E. coli* TOP10 a naneseny na LB-agarózové plotny s ampicilinem (100 µg/ml). Následná inokulace, izolace DNA, restrikce, agarózová elektroforéza a komerční sekvenace jsou podrobně popsány v kap. 3.1.2 Ligace cDNA pro myši hsp70 do klonovacího vektoru pCR II Blunt TOPO. Ověřené vzorky byly nazvány pET101 – hsp70 a pcDNA3.1 – hsp70 resp. pcDNA3.1 – hsp70(stop). Tyto vzorky byly následně použity k expresi hsp70 resp k DNA vakcinaci.

### 3.1.4 Příprava p24 a fúzních hsp70 – p24, p24 – hsp70

Tvorba DNA konstruktů kódujících fúzní proteiny hsp70 – p24 a p24 – hsp70 sestává z několika kroků, které jsou zde podrobněji popsány, nicméně strategie klonování je shrnuta na **Obrázku 10**:



**Obrázek 10:** Klonovací strategie při tvorbě fúzních proteinů. Výsledkem klonování jsou dva konstruktů – p24-hsp70 (a), nebo hsp70-p24 (b).

a) vložení genu kódující hsp70 do klonovacího vektoru pCR II Blunt TOPO (Invitrogen)

Gen kódující hsp70, kterému byly navrženy primery tak, aby obsahovaly na obou koncích nová restrikční místa, byl ligován do pCR II Blunt TOPO vektoru již dříve zmíněným postupem. Díky navrženým primerům obsahoval amplifikovaný fragment hsp70 na 5' – konci sekvenci pro *EcoRI* restriktázu (hsp70md-*EcoRI*) a na 3' – konci sekvenci pro *XbaI* restriktázou (hsp70mu-*XbaI*). Sekvence použitých primerů jsou uvedeny v souhrnné **Tabulce 3**. Jako templát byl použit vektor pCR II – hsp70mm. Množství komponent pipetovaných do PCR jsou uvedena v **Tabulce 1**. Podmínky PCR reakce jsou shrnuty v **Tabulce 2**, pouze teplota nasednutí primerů byla 67,6°C.

PCR produkt byl rozdělen 10% agarózovou elektroforézou, příslušný band odpovídající hsp70mm byl vyřezán a purifikován pomocí QIAEX II kolonek.. Gen byl následně klonován opět do pCR II Blunt TOPO vektoru, nyní již ale s restrikčními místy *EcoRI* a *XbaI* na 5' resp. na 3' – konci. Vzniklý vektor byl pojmenován pCR II – *EcoRI*-hsp70-*XbaI*. Rekombinantní DNA byla transformována do TOP 10 a správný klon byl vybrán pomocí vhodně zvolené restrikční analýzy a byl nazván pCR II – *EcoRI* – hsp70 – *XbaI*.

b) Ligace hsp70 do pGAPZαA (Invitrogen) vektoru

Gen kódující hsp70mm s restrikčními místy *EcoRI* a *XbaI* na 5' resp. na 3' – konci bylo nutné vložit do vektoru, který obsahuje tato restrikční místa pouze jednou. Proto byl zvolen vektor pGAPZαA, který v tomto případě sloužil také pouze jako klonovací vektor.

Ligace hsp70mm do vektoru pGAPZαA byla provedena pomocí T4 DNA ligázy (Invitrogen) dle protokolu výrobce. Nejprve byly ale vektory pGAPZαA stejně jako pCR II – *EcoRI*-hsp70-*XbaI* štěpeny nukleázami *EcoRI* a *XbaI* přes noc. Restrikční reakce obsahovala 10 µg DNA, další komponenty pak dle manuálu výrobce (New England Biolab).

Plasmid pCR II – *EcoRI*-hsp70-*XbaI* po restrikci byl rozdělen 10% agarózovou elektroforézou, band odpovídající genu pro hsp70mm byl z gelu vyříznut a DNA byla izolována pomocí QIAEX II kolonek. Koncentrace izolované DNA byla měřena spektrofotometricky.

Mezitím byla k naštěpenému plazmidu pGAPZαA přidána Calf Intestinal Phosphatase (CIP), která defosforyluje štěpenou DNA na volných 5' – koncích a tím zabraňuje samo – ligaci plazmidu. 5U CIP (New England Biolabs) bylo přidáno k restrikční reakci (podle výrobce 0,5U/µg DNA). Směs byla inkubována 2 hod při 37°C a poté byla CIP inaktivována 20 min při 60°C. Otevřený plazmid pGAPZαA byl následně přečištěn pomocí QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen).

Koncentrace a čistota DNA vektoru i genu pro hsp70mm byla měřena spektrofotometricky. Podle známé koncentrace DNA byla nastavena ligační reakce, jejíž složení odpovídalo protokolu výrobce (Invitrogen).

Paralelně s ligační reakcí byla nastavena i reakce, do níž nebyl pipetován inzert. Takto pipetovaná reakce slouží jako kontrola samo – ligace vektoru.

Oba vzorky byly transformovány do TOP 10 (Invitrogen) výše zmíněným postupem. Následná inokulace do LB – média s zeocinem (25 µg/ml) (pGAPZαA obsahuje kazetu s rezistencí na zeocin), stejně tak i izolace plazmidové DNA a restriční analýzy jsou již podrobně popsány v kapitole 3.1.2. Ligace cDNA pro myší hsp70 do klonovacího vektoru pCR II Blunt TOPO.

Podle restriční analýzy byl vybrán klon a plasmid, pro další ligování. Tento vzorek byl nazván pGAPZαA – *EcoRI* - hsp70 – *XbaI*.

c) vložení genu kódující p24 do klonovacího vektoru pCR II Blunt TOPO (Invitrogen)

DNA kódující p24 byla amplifikována z vektoru phCMV – gag, který byl získán od Dr. Bernarda Verriera (BioMérieux, Lyon, France). Pomocí PCR byly vytvořeny dvě různé verze p24 DNA. Jedna obsahovala na začátku i konci sekvence pro restriktázu *EcoRI*, druhá restriční místa *XbaI*. Množství komponent pipetovaných do PCR jsou uvedena v **Tabulce 1**. Sekvence použitých primerů jsou uvedeny v souhrnné **Tabulce 3**. Podmínky PCR reakce jsou shrnuty v **Tabulce 2**, pouze teplota nasednutí primerů byla 69,2°C (*EcoRI*) resp. 67,6°C (*XbaI*).

PCR produkty byly rozděleny 10% agarózovou elektroforézou, příslušné bandy odpovídající *EcoRI* – p24 – *EcoRI* a *XbaI* – p24 - *XbaI* byly vyřezány a purifikovány pomocí QIAEX II kolonek. Geny byly následně klonovány do pCR II Blunt TOPO vektoru. Vzniklé vektory byly pojmenovány pCR II – *EcoRI* – p24 – *EcoRI* a pCR II - *XbaI* – p24 - *XbaI*. Rekombinantní DNA byla transformována do TOP 10 a správný klon byl vybrán pomocí vhodně zvolené restriční analýzy.

d) Ligace p24 do pGAPZαA – *EcoRI* - hsp70 – *XbaI* vektoru

Byly provedeny dvě paralelní ligační reakce pro vytvoření dvou konstruktů a to pGAPZαA – p24 - hsp70 a pGAPZαA - hsp70 – p24. Vektor pGAPZαA – *EcoRI* - hsp70 – *XbaI* byl linearizován buď *EcoRI* nebo *XbaI* restriktázou pro vytvoření fúzního genu p24 – hsp70 nebo hsp70 – p24. p24 sekvence byly získány štěpením plazmidů pCR II – *EcoRI* – p24 – *EcoRI* a pCR II - *XbaI* – p24 – *XbaI* opět *EcoRI* resp. *XbaI* restriktázami. Do restričních reakcí bylo použito 10 µg DNA. Restrikce probíhala podle protokolu výrobce (New England Biolab) přes noc.

Bandy vzniklé po štěpení vektorů pCR II – *EcoRI* – p24 – *EcoRI* a pCR II - *XbaI* – p24 – *XbaI* byly separovány 10% agarózovou elektroforézou, velikosti odpovídající genům *EcoRI* – p24 – *EcoRI* resp. *XbaI* – p24 - *XbaI* byly z gelu vyříznuty a DNA byla izolována pomocí QIAEX II kolonek.. Koncentrace izolované DNA byly měřeny spektrofotometricky.

Mezitím byla k linearizovaným plazmidům pGAPZ $\alpha$ A – *EcoRI* - hsp70 – *XbaI* štěpeným buď *EcoRI* nebo *XbaI* přidána CIP. Otevřené plazmidy pGAPZ $\alpha$ A – *EcoRI* - hsp70 – *XbaI* byly následně přečištěny pomocí QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen).

Koncentrace a čistota DNA vektorů i inzertů byla měřena spektrofotometricky. Podle známé koncentrace DNA byla nastavena ligační reakce podle manuálu výrobce (Invitrogen).

Postup kontroly ligace již byl popsán v kap. 3.1.4 Příprava p24 a fúzních hsp70 – p24, p24 – hsp70. Následná transformace, izolace plazmidové DNA a restriční analýzy jsou již podrobně popsány v kapitole 3.1.2 Ligace genu pro hsp70mm do klonovacího vektoru pCR II Blunt TOPO.

Byly vybrány dva vzorky, které obsahovaly DNA hsp70 – p24 nebo p24 – hsp70 ve správné orientaci. Tyto vzorky byly nazvány pGAPZ $\alpha$ A – p24 – hsp70 a pGAPZ $\alpha$ A – hsp70 – p24. Identita fúzních genů byla ověřena i komerční sekvenací.

#### e) příprava expresních vektorů s fúzními DNA

Fúzní konstrukty byly tedy následně přeneseny do expresních vektorů pET101D/ TOPO nebo pcDNA 3.1 D/V5-His TOPO (Invitrogen). Pro přenesení genu p24 – hsp70 byly použity primery gag\_cacc a hsp70mu-exp a pro gen hsp70 – p24 primery hsp70md-cacc-atg a p24\_up pro přípravu vektorů k expresi v bakteriích *E. coli*, nebo v savčích buňkách *in vitro*.

Pro přípravu samotného p24 byly použity primery gag\_cacc a p24\_up. Gen kódující p24 byl paralelně klonován do vektoru pET200/D TOPO (Invitrogen), díky kterému je možno získat rekombinantní protein bez jakýchkoliv epitopů. Vektor totiž obsahuje sekvenci pro enterokinázu, která po navázání odstěpí epitopy potřebně k purifikaci. Takto připravený p24 protein byl následně použit k navázání na ELISA panely.

V neposlední řadě byly použity primery se STOP kodonem na konci pro přípravu DNA vakcín. Pro přenesení genu p24 – hsp70 se STOP byly použity primery gag\_cacc a hsp70mm\_stop a pro gen hsp70 – p24 primery hsp70md-cacc-atg a Gag\_stop a pro p24 samotný byly použity primery gag\_cacc a Gag\_stop.

Sekvence použitých primerů jsou uvedeny v souhrnné **Tabulce 3**. Byla provedena PCR, jejíž složení je shrnuto v **Tabulce 1**. Podmínky PCR reakce jsou shrnuty v **Tabulce 2**, pouze teplota nasednutí primerů byla 69,2°C resp. 67,6°C.

Vzniklé PCR produkty byly izolovány a přečištěny pomocí QIAEX II kolonek. Purifikované PCR produkty byly vloženy do plasmidů pET101 nebo pcDNA 3.1 TOPO – klonovací reakcí podle postupu uvedeného výrobcem (Invitrogen). Vzorke byly chemicky transformovány do TOP 10. Následná inokulace do LB – média s ampicilinem (100 µg/ml), stejně tak i izolace plazmidové DNA a restrikční analýzy byly podrobně popsány v kapitole 3.1.2 Ligace genu pro hsp70mm do klonovacího vektoru pCR II Blunt TOPO.

Restrikce byly analyzovány pomocí agarózové elektroforézy a následně byly plazmidy komerčně sekvenovány (Generi Biotech s. r.o., Hradec Králové, ČR).

Vybrané ověřené vzorky byly pojmenovány pcDNA3.1 – p24 - hsp70(stop), pcDNA3.1 – hsp70 – p24(stop) a pcDNA3.1 – p24(stop). Tyto vzorky byly použity pro DNA vakcinaci.

Názvy a sekvence použitých primerů jsou uvedeny v **Tabulce 3**:

Název primeru	Nukleotidová sekvence
hsp70md-1	AGCCTTCCAGAAGCAGAGC
hsp70mu-1	CTAATCCACCTCCTCGATGGT
hsp70md- <i>EcoRI</i>	GAA TTC GCC AAG AAC ACG GCG ATC G
hsp70mu- <i>XbaI</i>	TCT AGA ATC CAC CTC CTC GAT GGT GG
p24_d- <i>EcoRI</i>	GAA TTC ATG CCC ATC GTG CAG AAC CTG C
gag_rev- <i>EcoRI</i>	GAA TTC GGC CTC GGC CAG CAC
p24_d- <i>XbaI</i>	TCT AGA ATG CCC ATC GTG CAG AAC CTG C
gag_rev- <i>XbaI</i>	TCT AGA GGC CTC GGC CAG CAC
gag_cacc	CAC CAT GCC CAT CGT GCA GAA CCT GC
p24_up	GGC CTC GGC CAG CAC CCT
hsp70md-cacc-atg	C ACC ATG GCC AAG AAC AGC GC
hsp70mu-exp	ATC CAC CTC CTC GAT GGT G
hsp70mm_stop	TGA ATC CAC CTC CTC GAT GGT G
Gag_stop	TGA GGC CTC GGC CAG CAC

**Tabulka 3:** Názvy uvedených primerů.



## **3.2 Exprese proteinů v savčích buňkách 293T**

Plazmidy pcDNA 3.1 – hsp70, pcDNA 3.1 – p24, pcDNA 3.1 – p24 - hsp70 a pcDNA 3.1 – hsp70 – p24 byly transfekovány do savčích buňek 293T. Jedná se o adherentní lidské embryonální ledvinové buňky. Buňky byly inkubovány v kompletním RPMI 1640 médiu (RPMI 1640 + 10% fetální bovinní sérum + 1% antibiotikum Penicilin/Streptomycin) v inkubátoru při 37°C a 5% CO<sub>2</sub>. Transfekce byla provedena pomocí SuperFect Transfection Reagent Kitu (Qiagen) dle protokolu výrobce.

### **3.2.1 Ověření exprese pomocí Western Blot analýzy**

Pelety transfekovaných buněk byly lyzovány 5x SDS vzorkovým pufrém a jednotlivé proteiny byly separovány pomocí 10% SDS – PAGE elektroforézy, kdy jednotlivé bandy odpovídající proteinům byly vizualizovány Coomassie Blue R – 250 barvou. Paralelně byly proteiny přeblotovány na polyvinyliden difluoridovou (PVDF) membránu (Millipore, Bedford, MA USA) metodou semi - dry blot, která byla nastavena na 90 min při napětí 1mA/cm<sup>2</sup> PVDF membrány. Membrána s přeblotovanými proteiny byla blokována v SuperBlock blokačním pufru (Thermo Scientific, Rockford, IL USA) s 0,05% Tween 20 při 4°C přes noc. Detekce byla provedena pomocí protilátky anti – V5 – HRP (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo USA) v ředění 1:8 000. Membrána byla promyta 3 x 20 min v PBS s 0,05% Tween 20 a posléze 2 x 20 min v PBS. Chemiluminiscenční signál emitovaný po přidání substrátu Super Signal West Pico (Pierce, Rockford, IL USA) byl detekován pomocí X-ray filmu (Kodak, Rochester, NY USA).

### **3.2.2 Ověření exprese pomocí fluorescenční analýzy**

Transfekované buňky byly fixovány ledovým (-20°C) methanol/acetone 7 min při laboratorní teplotě a poté byly promyty 3x10 min 10% FBS v PBS. Poté byly inkubovány všechny se shodnou primární protilátkou myší anti – V5 (Invitrogen) (ředění 1:250). Primární protilátka byla ředěna v 10% FBS v PBS, inkubace trvala 1 hod při laboratorní teplotě. Vzorky byly promyty 2x 10min v PBS a byla přidána sekundární protilátka anti – myší Alexa Fluor 594 (Invitrogen) (ředění 1:1000) v 10% FBS v PBS. Inkubace probíhala 60 min při laboratorní teplotě ve tmě. Vzorky byly opět promyty 2x 10min v PBS a bylo přidáno montovací médium obsahující DAPI pro barvení buněčných jader. Vzorky byly posléze analyzovány pomocí fluorescenčního mikroskopu.

### **3.3 Exprese proteinů v bakteriích *E. coli***

První protein, který byl exprimován v bakteriích *E. coli*, byl myší hsp70. Vytvořený plazmid pET101D – hsp70 byl transformován do expresních bakterií *E. coli* BL21 (DE3) (Invitrogen). Již popsaným postupem byla provedena transformace a selekce klonů k expresi. Vybrané kolonie byly použity k expresi proteinu. Bakterie *E. coli* BL21 (DE3) produkují rekombinantní proteiny hsp70 po indukci izopropyl  $\beta$ -D thiogalaktopyranozidem (IPTG) s finální koncentrací 1 mM přidaného k buněčné suspenzi po dosažení absorbance O.D.<sub>600</sub> 0,6. Kultury byly inkubovány další 4 hod na třepačce při 37°C a poté byly bakterie separovány centrifugací 5 min při 7 000xg a 4°C.

### **3.4 Purifikace proteinu hsp70mm**

Buněčné pelety byly lyzovány lyzačním pufrem (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, 0,1% Triton X-100, 0,5 mg/ml lysozym, 100  $\mu$ M EDTA, pH8) doplněným o inhibitory proteáz (0,5 mM PMSF, 0,4  $\mu$ g/ml leupeptin, 0,5  $\mu$ g/ml aprotinin) přidaným k peletám v objemu 5 ml / g pelety. Po 1 hodinové inkubaci při 4°C na míchačce byl buněčný lyzáát sonifikován 10x10s v intervalech 1min a následně centrifugován 10 min při 10 000 rpm při 4°C. Supernatant obsahující proteiny byl přenesen do nové zkumavky a byla k němu přidána Ni – NTA agaróza (1 ml/g buněčné pelety). Směs byla opět 60 min míchána při 4°C. Supernatant se sorbentem byl nanesen na kolonu a byl promyt promývacím pufrem (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH8) (16ml/g pelety). Protein byl eluován z kolony elučním pufrem (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 500 mM imidazol, pH8) (2ml/ g buněčné pelety). Frakce byly zachytávány a dále analyzovány.

Purifikovaný myší protein hsp70 byl analyzován pomocí 10% SDS – PAGE elektroforézy, kdy jednotlivé roužky odpovídající proteinům byly vizualizovány Coomassie Blue R – 250 barvou. Paralelně byl hsp70 protein analyzován pomocí Western blot techniky popsané výše. Detekce proteinu byla provedena pomocí protilátky anti – V5 – HRP (Sigma) v ředění 1:8 000, jak bylo popsáno výše.

#### **3.4.1 Analýza kontaminace pomocí hmotnostního spektrometru**

Z analýzy hsp70 proteinu pomocí Coomassie barveného SDS – PAGE gelu bylo patrné, že hsp70 se kopurifikuje s kontaminantou neznámého původu, neboť na gelu byl patrný dvojitý proužek. Pro identifikace kontaminace byl vzorek purifikovaného rekombinantního hsp70 odeslán na MALDI – TOF hmotnostní spektrometrickou analýzu, která byla provedena pomocí peptidového hmotnostního fingerprintu použitím Microflex

MALDI-TOF LRF20 hmotnostního spektrometru (Bruker Daltonik, Bremen, Německo) na Katedře biochemie Přírodovědecké fakulty, UP v Olomouci. Získaná peptidová spektra byla analyzována pomocí online verze nástroje Mascot (Matrix Science, London, UK; <http://www.matrixscience.com>) a porovnána s NCBI-nr proteinovou databází programem ProFound.

### 3.4.2 Exprese při různých teplotách

Po identifikaci kontaminace hsp70, jednalo se o enzym glukosamin-fruktosa-6-fosfát aminotransferázu (GFAT), byla testována kultivace expresní bakteriální linie při teplotách 25, 30 a 37°C s cílem eliminovat expresi kontaminující GFAT.

### 3.4.3 Suplementace expresního média

Do expresního média byly přidány metabolické produkty GFAT – glukosamin (GlcN), N-acetylglukosamin-6-fosfát (GlcN6P) a N-acetyl-glukosamin (GlcNAc), nebo glutamin (Gln) jako negativní kontrola. Finální koncentrace jednotlivých aminů v médiu byla 45mM. Všechny ostatní podmínky kultivace byly zachovány.

### 3.4.4 Stanovení stability rekombinantního hsp70mm

Stabilita myšího hsp70 při 4°C byla sledována po 100 dnech pomocí SDS-PAGE elektroforézy.

## **3.5 Exprese proteinů p24, p24 – hsp70 a hsp70 – p24 v *E. coli***

Expresní kmeny *E. coli* BL21 (DE3) byly transformovány vektory pET101D – p24, pET101D – p24 – hsp70 a pET101D – hsp70 - p24. Postup transformace i exprese jsou podrobně popsány již dříve pro hsp70 protein. Z buněčných pelet byly purifikovány jednotlivé rekombinantní proteiny. Byla provedena SDS – PAGE a Western blot analýza exprimovaných proteinů p24, p24 – hsp70 a hsp70 – p24.

Protein p24 určený pro ELISA analýzy byl exprimovaný z vektoru pET200 – p24 a byl tesně před elucí z Ni-NTA kolony ošetřen enterokinázou, čímž se uvolnil čistý p24 protein bez jakýchkoliv epitopů.

## **3.6 ATPázová aktivita**

ATPázová aktivita hsp70 byla stanovována u tří rekombinantních proteinů hsp70, hsp70-p24 a p24-hsp70 spektrofotometrickou metodou využívající jako indikátor

malachitovou zeleň, kdy volný fosfát z ATP uvolňovaný ATP-ázovou aktivitou enzymu (v tomto případě hsp70) tvoří s malachitovou zelení stabilní zelený produkt, jehož adsorbance se stanovuje při OD 600nm [135-137]. 10 µg hsp70 a 1mM ATP (Sigma) bylo rozpuštěno ve 100 µl 50mM HEPES pH 7,2 obsahujícím 2mM Mg<sup>+2</sup>. Reakční směs byla inkubována 60 min při 37°C. Poté bylo přidáno 900µl malachitové zeleně a směs byla inkubována dalších 10 min. Změna absorbance byla sledována při 660nm proti kontrole, která neobsahovala hsp70. Kalibrační křivka v rozmezí 1-10 nmol fosfátu byla vytvořena pomocí ředění KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

### **3.7 Odstranění LPS**

Všechny proteiny používané v imunizačních experimentech byly zbavené endotoxinu pomocí několikanásobné extrakce do Tritonu – X114, která byla již dříve publikována [138]. Ke vzorkům proteinů byl přidán Triton - X114 ve finální koncentraci 1%. Směs byla inkubována 30 min na třepačce při 4°C, poté zahřáta na 37°C 10 min. Následná centrifugace 10 min při 12 000 rpm a 25°C oddělila horní vodní proteinovou fázi, která byla odebrána a dolní Tritonovou fázi, která obsahovala lipopolysacharid. Množství endotoxinu bylo měřeno gelifikační reakcí pomocí LAL testů (Limulus Amebocyte Lysate) (Associates of Cape Cod, USA) podle protokolu výrobce.

Nejprve byla vytvořena desítková ředící řada s komerčním LPS jako standardem, posléze dvojková ředící řada pro upřesnění výsledků. Extrakce tritonem X114 byla opakována, dokud neklesla hladina LPS pod 2.5 EU/ml.

### **3.8 DNA vakcinace**

K DNA vakcinaci byly použity vektory pcDNA3.1 – p24(stop), pcDNA3.1 – hsp70(stop), pcDNA3.1 – p24-hsp70(stop) a pcDNA3.1 – hsp70-p24(stop). Vybrané klony byly kultivovány ve 2l LB – média a byla provedena maxipreparace plazmidové DNA s odstraněním endotoxinu pomocí EndoFree Plasmid Maxi Kitu (Qiagen) podle instrukcí výrobce. Izolovaná DNA byla ředěna na koncentraci 1mg/ml a aplikována do šestitýdenních samic BALB/c myši (BioTest s.r.o., Konárovice, ČR). Imunizační experimenty byly schválené Etickou komisí Lékařské fakulty UP v Olomouci a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR (Odborná komise uživatelského zařízení k projektu pokusů podle § 11 vyhlášky č. 207/2004 Zb. o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat).

Byly vytvořeny 4 skupiny po 6 myších. Každý konstrukt byl aplikován intramuskulárně v dávce 50µg/myš. Myši byly opětovně vakcinovány po 3 týdnech. Tři

týdny po druhé imunizaci byla odebrána séra a izolovány sleziny pro analýzy imunitní odpovědi na dané DNA vakcíny.

### 3.8.1 Stanovení buněčné odpovědi pomocí ELISPOT

Buněčná imunitní odpověď byla analyzována pomocí Mouse IFN- $\gamma$  ELISPOT Set (BD, Franklin Lakes, NJ).

Nejprve byly izolovány splenocyty ze slezin jednotlivých vakcinovaných myší. Sleziny byly pasírovány přes sítko s velikostí pórů 100 $\mu$ m (BD). Poté byly splenocyty promyty sterilním RPMI médiem s 10 % FBS. Erytrocyty byly lyzovány pomocí Red blood cell lysis buffer (Sigma). Vyizolované splenocyty byly naředěny na koncentraci 10<sup>6</sup> buněk/ml v RPMI s 10 % FBS.

Jednotlivé jamky ELISPOT panelu byly předem potaženy protilátkou proti myššímu IFN- $\gamma$  a splenocyty byly stimulovány 10  $\mu$ g/ml depyrogenovaného p24 proteinu s His tag epitopem. Vždy 10<sup>5</sup> buněk bylo přeneseno do jednotlivých jamek ELISPOT panelu. Jako negativní kontrola byl použit rekombinantní OspC protein s His tag epitopem. Pozitivní kontrola byla provedena pomocí forbol myristátu s ionomycinem [139]. Vzorčky byly inkubovány v triplicátech 4 dny při 37 $^{\circ}$ C v 5% CO<sub>2</sub> inkubátoru. Vizualizace jednotlivých spotů byla provedena podle manuálu výrobce a spoty byly počítány s použitím binokulárního mikroskopu.

### 3.8.2 Stanovení specifických protilátek metodou ELISA

Všechna měření byla prováděna v duplikátech. Myší séra byla poolována pro každou skupinu a byly měřeny specifické anti – p24 protilátky. Na dno mikrotitrační ELISA destičky (Nalge Nunc International, Rochester, NY) byl navázán protein p24 o koncentraci 2  $\mu$ g/ml v PBS plus 0,1% NaN<sub>3</sub>. Směs byla inkubována přes noc při 18 $^{\circ}$ C ve tmě. Poté byly jamky 3x promyty PBS-NaN<sub>3</sub> + 0,05% Tween 20 PBS-T-NaN<sub>3</sub> a blokovány 5% odtučněným mlékem (NFM) v PBS-T-NaN<sub>3</sub> (2 hod při laboratorní teplotě). Jamky byly znovu promyty 3 x pomocí PBS-T-NaN<sub>3</sub>. Následně byla do jamek přidána naředěná myší séra. Séra byla ředěna v poměru 1:1000 roztokem 1% BSA v PBS-NaN<sub>3</sub>. ELISA panel se séry byl inkubován přes noc při 18 $^{\circ}$ C ve tmě a poté promyt 3 x pomocí PBS-T. K jednotlivým sérům byla přidána sekundární kozí HRP-značená protilátka proti myššímu IgG ředěná v 1% BSA v PBS-T a panel byl inkubován 3 hod při laboratorní teplotě. Jamky byly promyty 3 x pomocí PBS-T a bylo přidáno 50  $\mu$ l substrátu připraveného smícháním 40 ml OPD pufru + 40  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 2 OPD

tablet. Reakce byla zastavena přidáním 50  $\mu$ l 0,4 M  $H_2SO_4$ . Intenzita barevné reakce byla stanovena fotometricky, měřením absorbance při 492 nm na ELISA readeru.

### **3.9 Vakcinace rekombinantními proteiny**

Rekombinantní proteiny zbavené LPS byly aplikovány šestitýdenním samicím BALB/c myši (BioTest s.r.o., Konárovice, ČR). Imunizační experimenty byly schválené Etickou komisí Lékařské fakulty UP v Olomouci a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR (Odborná komise uživatelského zařízení k projektu pokusů podle § 11 vyhlášky č. 207/2004 Zb. o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat).

6 skupin po 6 myších bylo imunizováno intradermální aplikací ekvimolárního množství rekombinantních proteinů. Pro každou vakcinaci bylo použito 0,5 nM proteinu. Konkrétní množství je shrnuto v **Tabulce 4**:

<b>Číslo skupiny</b>	1	2	3	4	5	6
<b>Druh vakcíny</b>	p24	hsp70	p24 – hsp70	hsp70 – p24	p24 + hsp70	Pouze pufr
<b>Množství proteinu</b>	12 $\mu$ g	35 $\mu$ g	50 $\mu$ g	50 $\mu$ g	12 $\mu$ g + 35 $\mu$ g	-

**Tabulka 4:** Množství rekombinantních proteinů aplikovaných do myši.

Myši byly opětovně vakcinovány po 3 týdnech. Po druhé imunizaci byla z ocasní žíly odebrána séra a izolovány sleziny pro analýzy imunitní dopovědi na dané vakcíny.

#### **3.9.1 Stanovení buněčné odpovědi pomocí ELISPOT**

Buněčná imunitní odpověď byla analyzována pomocí Myši IFN- $\gamma$  ELISPOT Set. Podrobný postup je popsán viz. kap. 3.8.1. Stanovení buněčné odpovědi pomocí ELISPOT.

#### **3.9.2 Stanovení specifických protilátek metodou ELISA**

Stanovení specifických protilátek je podrobně popsáno v kapitole 3.8.2. Stanovení specifických protilátek metodou ELISA.

Při vakcinaci rekombinantními proteiny byly stanovovány hladiny nejen celkových IgG, ale i jejich izotypů pomocí následujících sekundárních protilátek v oddělených reakcích: kozí HRP-značená specifická k myšimu IgG+IgM+IgA (Ig total), kozí HRP-značená specifická k myšimu IgG1 (MP Biomedicals, Solon, OH), kozí HRP-značená specifická k myšimu IgG2a (Bethyl laboratories, Montgomery, TX), králičí HRP-značená specifická k

myšímú IgG2b (MP Biomedicals), nebo kozí HRP-značená specifická k myšímú IgG3 (Bethyl laboratories) ředěná v 1% BSA v PBS-T.

### **3.10 Izolace dendritických buněk**

Dendritické buňky byly získány z kostní dřeně stehenních a lýtkových kostí BALB/c myši [140]. Stehenní a lýtkové kosti odebrané z usmrcených myši byly zbaveny myocytů. Očistěné kosti byly sterilizovány předchlazeným 70% ethanolem 2 min a poté omyty sterilním PBS. Oba konce jednotlivých kostí byly odříznuty skalpelem a duté části byly promyty RPMI médiem pomocí G23 jehly a 10 ml stříkačky. Buňky byly centrifugovány 5 min, 1200 x g při laboratorní teplotě. Červené krvinky byly odstraněny pomocí Red Blood Lysis Buffer (Sigma-Aldrich) podle instrukcí výrobce. Buňky byly naředěny na finální koncentraci  $10^6$  buněk /ml kompletním RPMI médiem a bylo k nim přidáno 20 ng/ml GM-CSF a 20 ng/ml IL-4. Buňky byly kultivovány ve 25 cm<sup>2</sup> kultivačních lahvích při 37°C v inkubátoru s 5% CO<sub>2</sub>. Třetí a pátý den byly 2/3 média vyměněny za čerstvé kompletní RPMI médium. Šestý den byly buňky pulzovány rekombinantními proteiny v ekvimolární dávce (**Tabulka 5**). Jako pozitivní kontrola byl použit lipopolysacharid (LPS). Jako negativní kontrola sloužily nepulzované buňky.

Protein	Množství proteinu (ng/ml média)	Množství LPS (ng/ml média)
p24	1200	0,001
hsp70	3500	0,004
hsp70 - p24	5000	0,006
p24 – hsp70	5000	0,005
LPS	0	100

**Tabulka 5:** Množství rekombinantních proteinů a LPS použité k pulzaci BMDC.

Po 2 hodinách byly odebrány vzorky pro konfokální mikroskopii. Po 24 hodinách byly dendritické buňky použity pro analýzu pomocí průtokové cytometrie.

### **3.11 Afinitní purifikace protilátek specifických k p24 ze séra imunizovaných myší**

Vzhledem k suboptimálním výsledkům s komerční protilátkou proti p24 byla pro potřeby fluorescenční mikroskopie purifikována polyklonální anti-p24 protilátka ze sér imunizovaných myší.

Rekombinantní protein p24 byl rozdělen 15% SDS – PAGE elektroforézou a přenesen na PVDF membránu metodou semi – dry blotování. Membrána byla barvena pomocí barvy Ponceau S (Serva, Heidelberg, Německo) pro vizualizaci proužku odpovídajícího p24. Obdélník omezující p24 proužek byl z membrány vystřižen a následně blokován 1 hod při laboratorní teplotě v SuperBlock blokovacím pufru s 0,05% Tween 20. Strip byl promyt 3x 20min v PBS s 0,05% Tween 20 a 2 x 15 min v PBS a inkubován přes noc při 4°C se sérem myší imunizovaných p24 antigenem. Po inkubaci bylo provedeno další promytí 1x 20 min pomocí PBS s 0,05% Tween 20 a 3x 15min pomocí PBS. Protilátky navázané na p24 byly ze stripu eluovány pomocí 250 µl 100 mM glycinu pH 2,5 , 20 min. pH eluátu bylo následně upraveno 10 µl 100mM Tris pH8.

### **3.12 Konfokální mikroskopie**

Dendritické buňky pulzované jednotlivými rekombinantními proteiny byly přeneseny na mikroskopická sklička pomocí cytopsinu (5min, 4000g) a fixovány chlazeným 4% paraformaldehydem v PBS. Buňky byly permeabilizovány 5min 0,1% Triton X100 v PBS a promyty PBS. Vzorky byly inkubovány přes noc při 4°C s primární protilátkou v 1xPBS obsahujícím 4% FBS. Použité protilátky a jejich ředění jsou uvedeny v tabulce 23.

Příští den byly vzorky 4 x 10 min promyty PBS a inkubovány 2 hod při laboratorní teplotě ve tmě se sekundární protilátkou ředěnou v PBS s 4% FBS. Vzorky byly následně promyty 4 x 10 min PBS a montovány montovacím médiem s DAPI, pro barvení buněčných jader. Buňky byly analyzovány pomocí konfokálního mikroskopu Fluoview 1000 Olympus.

**Tabulka 6** znázorňuje schéma barvení jednotlivých vzorků a ředění příslušných protilátek.

<b>Protein</b>	<b>Primární protilátka</b>	<b>Ředění</b>	<b>Sekundární protilátka</b>	<b>Ředění</b>
p24	myší polyklonální anti – p24 ze séra	neředěno	anti-myší IgG – FITC	1:1000
	králičí anti-early endosome marker (anti-EEA1)	1:100	anti-králičí IgG – cy3	1:1000
hsp70 – p24	myší polyklonální anti – p24 ze séra	neředěno	anti-myší IgG – FITC	1:1000
	myší anti-hsc70	1:100	anti-myší IgG – FITC	1:1000



	králičí anti-early endosome marker (anti-EEA1)	1:100	anti-králičí IgG – cy3	1:1000
p24 – hsp70	myší polyklonální anti – p24 ze séra	neředěno	anti-myší IgG – FITC	1:1000
	myší anti-hsc70	1:100	anti-myší IgG – FITC	1:1000
	králičí anti-early endosome marker (anti-EEA1)	1:100	anti-králičí IgG – cy3	1:1000

**Tabulka 6:** Schéma barvení BMDC pro konfokální mikroskopii.

Každý vzorek byl barven markerem pro brzký endozom a k tomu myší polyklonální protilátkou specifickou k p24.

Kolokalizace p24 a EEA-1 byla charakterizována Pearsonovým koeficientem, který byl počítán vždy jako průměr jednotlivých Pearsonových koeficientů získaných z 5 různých barvených sklíček každého vzorku.

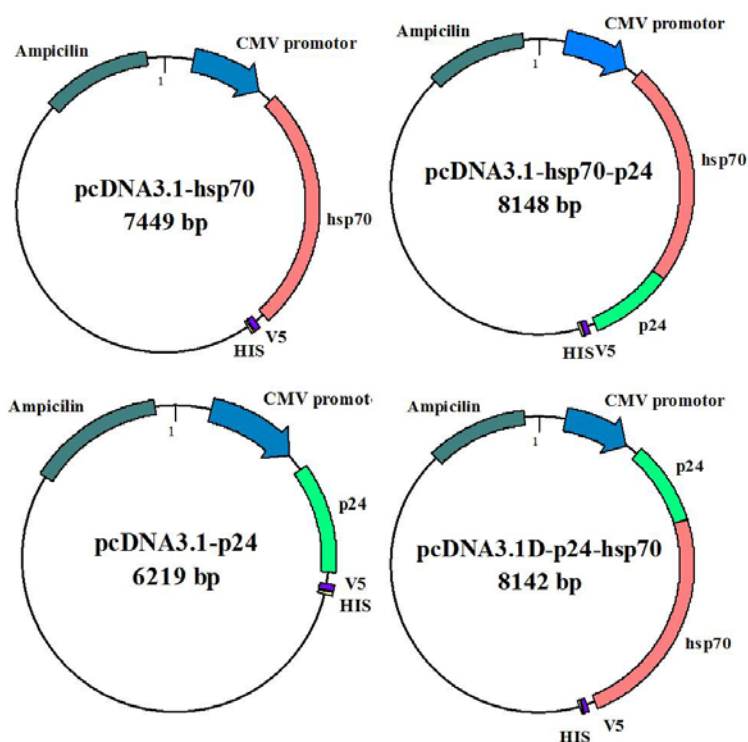
### **3.13 Průtoková cytometrie**

Maturace dendritických buněk byla analyzována pomocí průtokového cytometru BD FACSCanto II (BD Biosciences). Vždy  $10^6$  buněk pulzovaných rekombinantními proteiny bylo po 24 hodinách přeneseno do zkumavek. Ke každému vzorku byly přidány 2  $\mu$ l specifické myší protilátky konjugované s různými fluorochromy (anti- CD11c-APCcy7, CD11b-APC, CD40-PE, CD86-PEcy7 a MHCI-Alexa Fluor647). Po jednogodinové inkubaci při 37°C byly buňky 3x promyty PBS pufrem a analyzovány průtokovým cytometrem.

## 4 Výsledky

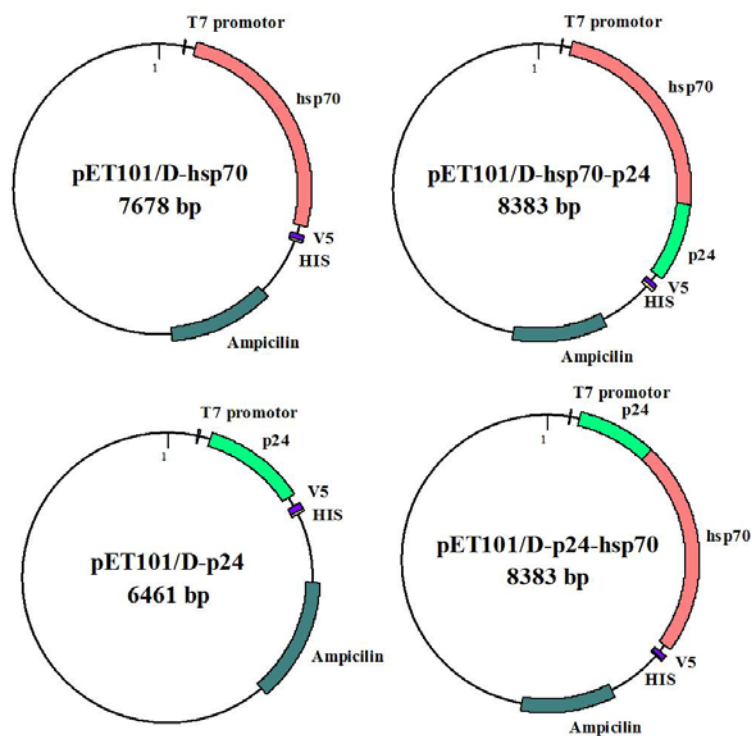
### 4.1 Příprava expresních vektorů kódujících rekombinantní proteiny

Pro ověření exprese rekombinantních proteinů v savčích buňkách *in vitro* byla vytvořena sada plasmidů pcDNA3.1D/V5,His, které obsahovaly, p24-hsp70, hsp70-p24, hsp70 nebo p24 (**Obrázek 11**). Stejně plasmidy pouze s terminačním kodonem TCA přidaným za rekombinantní proteiny byly použity i k DNA vakcinaci.



**Obrázek 11:** Schématické znázornění připravených pcDNA3.1 vektorů s jednotlivými rekombinantními proteiny.

Pro eukaryontní expresi v bakteriích *E. coli* byly připraveny pET101 vektory obsahující p24-hsp70, hsp70-p24, hsp70 nebo p24 (**Obrázek 12**).

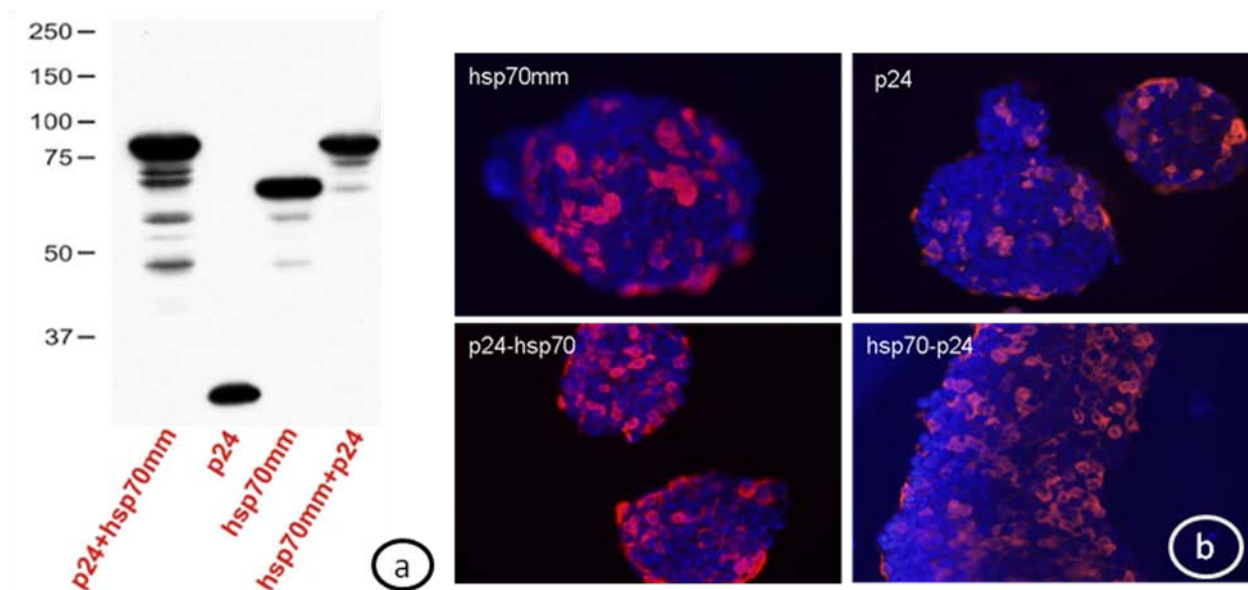


**Obrázek 12:** Schématické znázornění připravených pET101 vektorů s jednotlivými rekombinantními proteiny.

## 4.2 Ověření exprese rekombinantních proteinů v savčích buňkách *in vitro*

Před samotnou DNA vakcinací bylo provedeno ověření, zda jsou vytvořené konstrukty funkční. Plasmidy obsahující geny pro rekombinantní fúzní proteiny hsp70-p24, p24-hsp70 i kontroly hsp70 a p24 byly transfekovány do savčích 293T buněk. Kontrola exprese byla provedena pomocí Western-blot analýzy s použitím myší anti-V5 protilátky (**Obrázek 13a**).

Paralelně byla exprese proteinů ověřována i fluorescenčně. V transfekovaných 293T buňkách byly rekombinantní proteiny detekovány pomocí primární myší anti-V5 a sekundární protilátky anti-myší IgG značené Alexa Fluor 594. Jádra byla barvena 4',6-diamidin-2-fenylindolem (DAPI) (**Obrázek 13b**).



**Obrázek 13:** Western-blot analýza rekombinantních proteinů v savčích buňkách (a). Detekce exprese rekombinantních proteinů v 293T buňkách. Buněčná jádra byla barvena DAPI (modrá), rekombinantní proteiny pomocí primární protilátky myší anti-V5 a sekundární anti-myší IgG-AF594 (červená) (b).

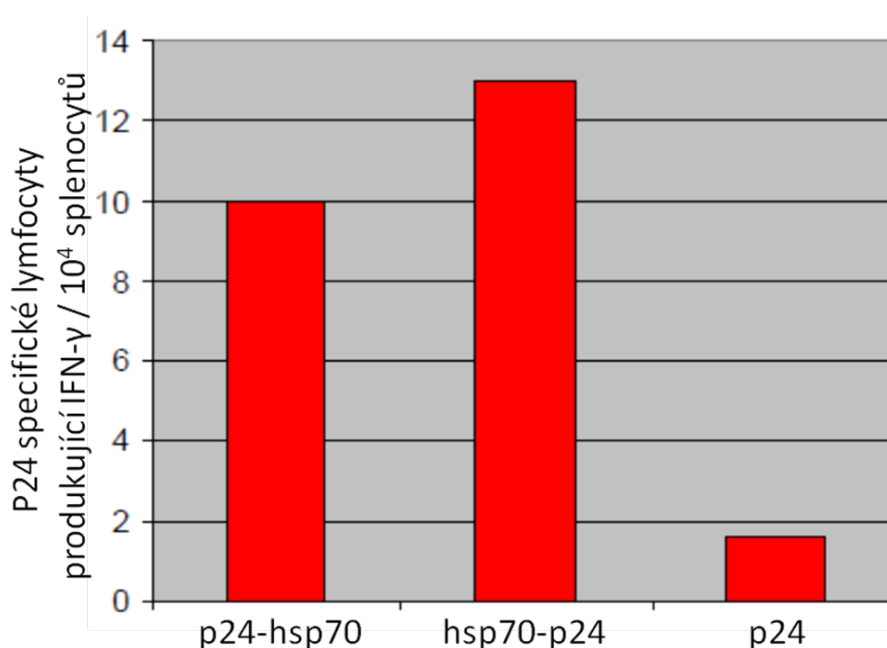
Potvrzení exprese proteinů v savčích buňkách je důležité jako kontrola před DNA imunizací. Všechny čtyři proteiny se exprimují v eukaryontních buňkách dobře a proporcionálně, jak je patrné nejen z western blot analýzy, ale i fluorescenční mikroskopie.

### 4.3 DNA vakcinace:

Pro DNA vakcinaci byly použity vektory pcDNA3.1 – p24(stop), pcDNA3.1 – hsp70(stop), pcDNA3.1 – p24-hsp70(stop) a pcDNA3.1 – hsp70-p24(stop). Následně byla sledována buněčná imunitní odpověď myší stanovením produkce IFN- $\gamma$  ze splenocytů *in vitro* stimulovaných p24 proteinem.

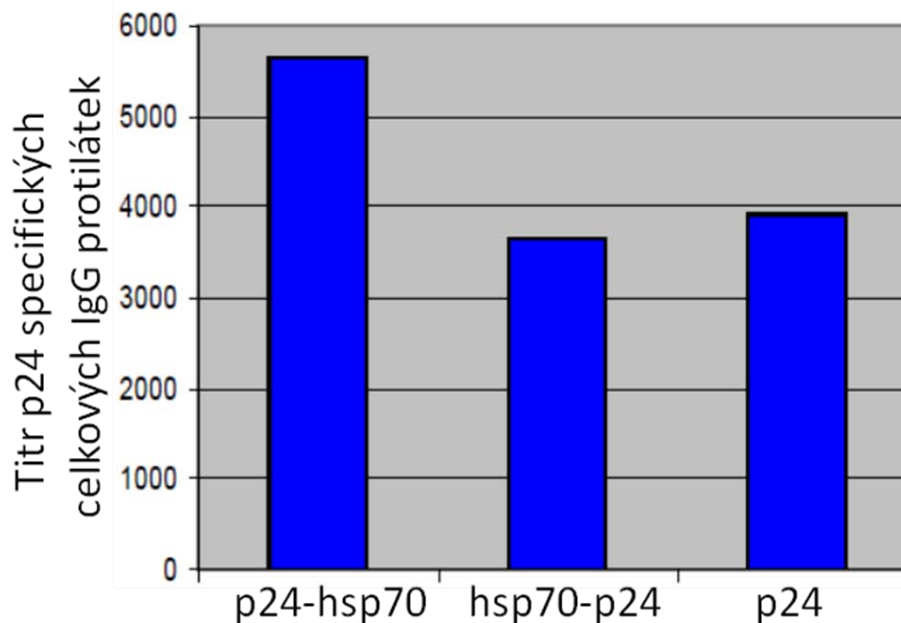
Tři týdny po druhé DNA imunizaci byla měřena produkce IFN- $\gamma$  metodou ELISPOT. Nejvíce IFN- $\gamma$  produkujících splenocytů indukovala DNA imunizace konstruktem hsp70 - p24 protein (0,13%), následovaná DNA imunizací konstruktem p24 - hsp70 (**Obrázek 14**). U dalších dvou měřených cytokinů (IL-4 a IL-10) nebyla detekovaná signifikantní odlišnost mezi jednotlivými skupinami experimentálních myší (data nezobrazena). Fúzní vakcíny modifikují T lymfocytární odpověď směrem k Th1 typu, přičemž vakcína kodující hsp70-p24

je v tomto směru nejefektivnější. Ač procentuálně nízké hodnoty fúze s hsp70 zvýšila počet IFN- $\gamma$  produkujících splenocytů více než 5 x.



**Obrázek 14:** p24 specifická produkce IFN- $\gamma$  ve splenocytech stimulovaných *in vitro* p24 proteinem po DNA vakcinaci.

Při sledování p24 specifické protilátkové odpovědi byl zaznamenán menší rozdíl mezi skupinami imunizovanými fúzními proteiny a samotným p24. Nejvyšší titer p24 specifických celkových Ig protilátek byl naměřen u skupiny myši imunizovaných DNA vakcínou kódující fúzní protein p24-hsp70 (**Obrázek15**).



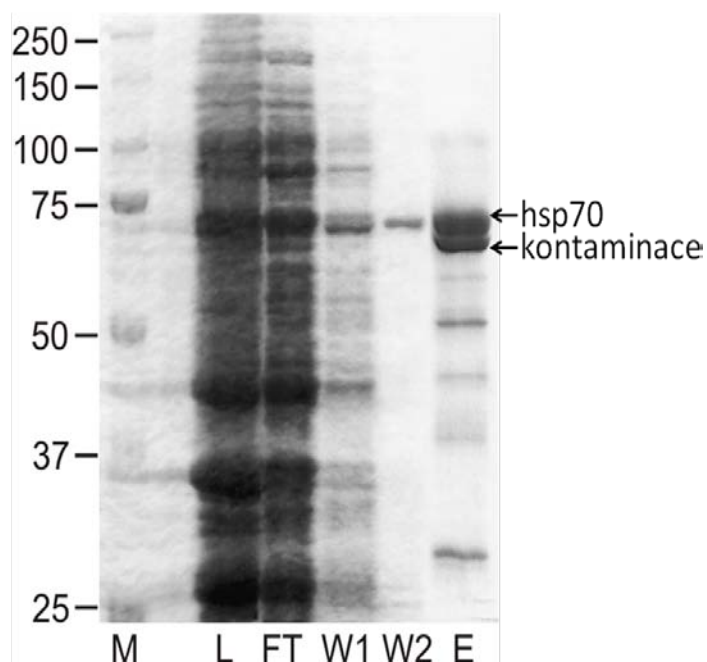
**Obrázek 15:** Produkce p24 specifických celkových IgG protilátek v séru.

DNA vakcína kódující p24-hsp70 vyvolává nejvyšší produkci p24 specifických celkových Ig protilátek. Ačkoliv produkce IFN- $\gamma$  byla silnější u splenocytů od myši imunizovaných hsp70-p24 DNA vakcínou, jak na humorální tak buněčné odpovědi je možné demonstrovat imunomodulační efekt fúze p24 s hsp70 proteinem.

#### **4.4 Prokaryotní exprese:**

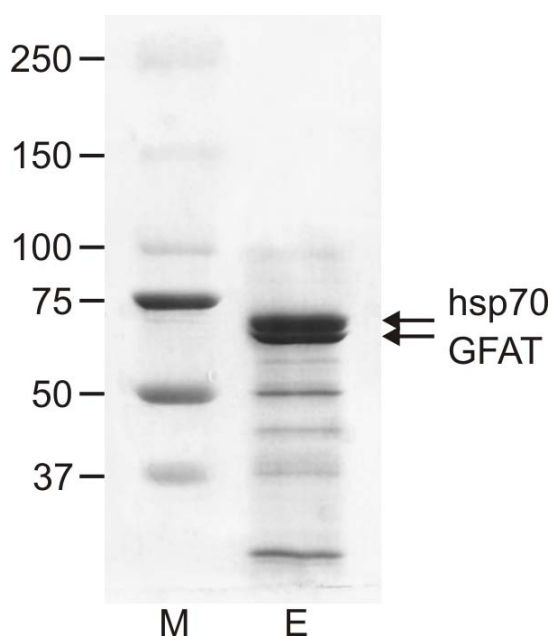
##### **4.4.1 Purifikace proteinu hsp70**

Rekombinantní hsp70 byl po expresi v *E. coli* purifikován pomocí Ni-NTA afinitní chromatografie. Jednotlivé frakce byly sbírány. Efektivita purifikace byla kontrolována sledováním density hsp70 proteinu a kontaminant po SDS-PAGE separaci a barvením proteinů pomocí Coomassie Blue R250. Densitometrické srovnání zastoupení hsp70 a ostatních proteinů v eluční frakci vede k závěru, že čistota hsp70 je 55%. Dominantní kontaminace je proužek bezprostředně pod hsp70.

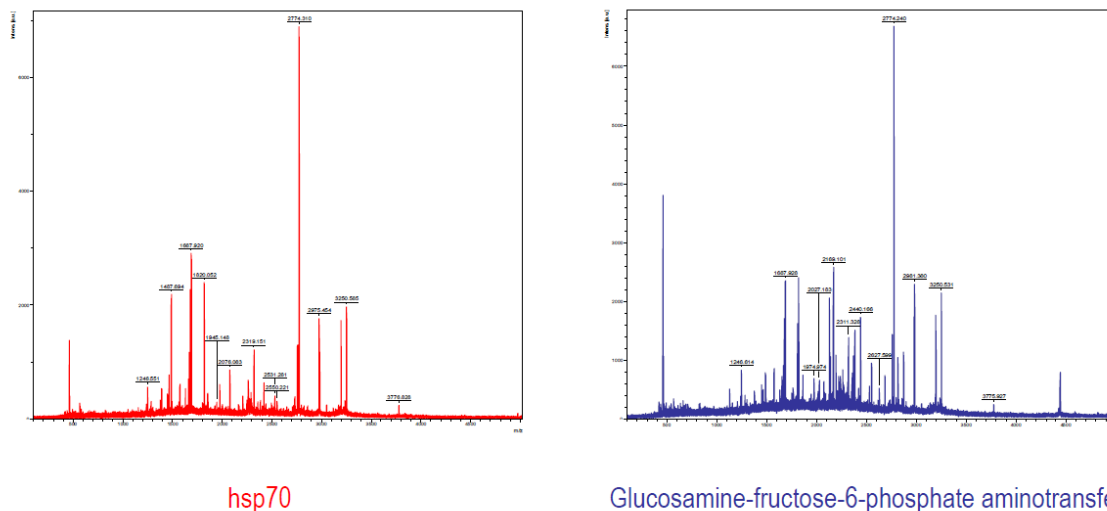


**Obrázek 16:** Purifikace hsp70mm. L - bakteriální buňky v lyzačním pufru, FT – frakce lyzátu nenavázaná na Ni-NTA agarosu, W1-2 – promývací frakce a E – eluční frakce.

Podrobnější analýza pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF proužků zobrazených na **Obrázku 17** potvrdila identitu kontaminujícího proteinu. Jedná se o glukosamin-fruktosa-6-fosfát aminotransferázu (GFAT). MS spektra jsou pro demonstraci zobrazena na **Obrázku 18**.



**Obrázek 17:** Dvojproužek vznikající po afinitní purifikaci hsp70 pomocí Ni-NTA kolony.



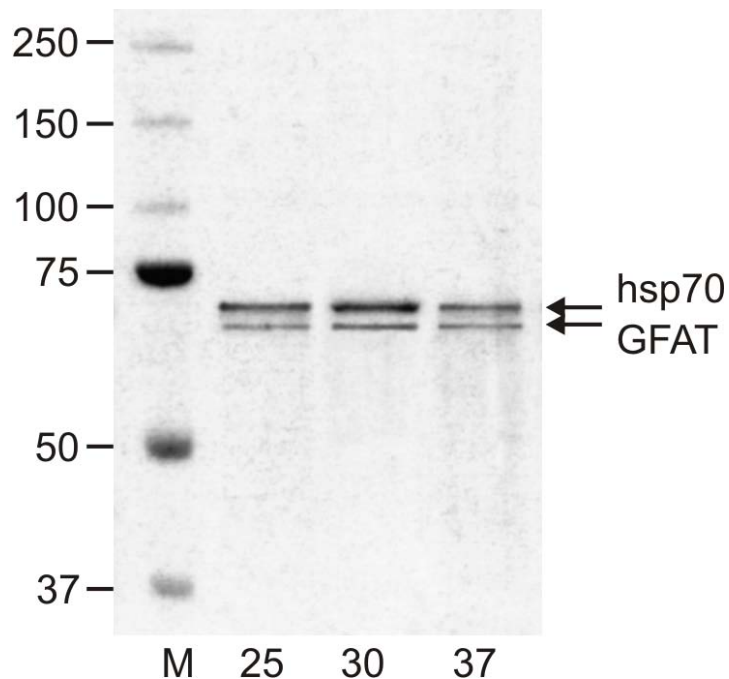
**Obrázek 18:** Výsledky MALDI – TOF hmotnostní analýzy proteinových proužků zobrazených na **Obrázku 17**.

Porovnáním vlastností obou proteinů bylo zjištěno, že mají podobnou molekulovou hmotnost 70,075 kDa resp. 66,904 kDa i hodnotu pI 5,4 - hsp70, 5,5 – GFAT. Složení nepolárních aminokyselin je také velice podobné. Všechny tyto vlastnosti vylučují jejich potenciálně efektivní separaci pomocí standardních chromatografických metod jako je gelová permeační chromatografie, iontoměničová chromatografie, hydrofobní chromatografie.

#### 4.4.2 Optimalizace kultivačních podmínek vedoucích k potlačení exprese GFAT

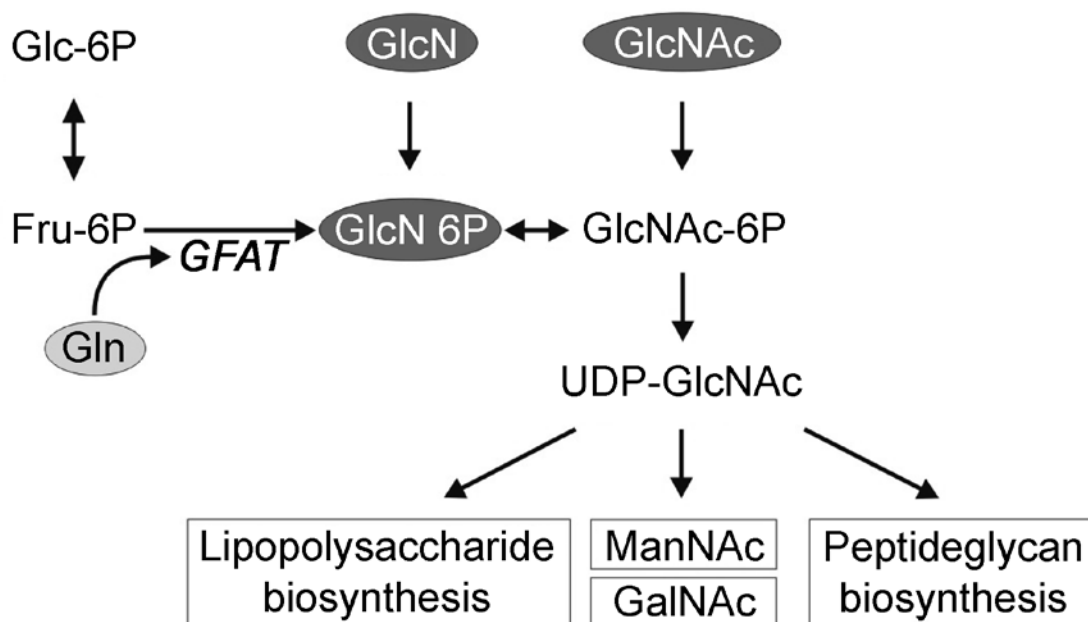
Pro snížení intenzity exprese GFAT byla testována kultivace produkčního kmene *E. coli* při různých teplotách (25, 30 a 37°C).





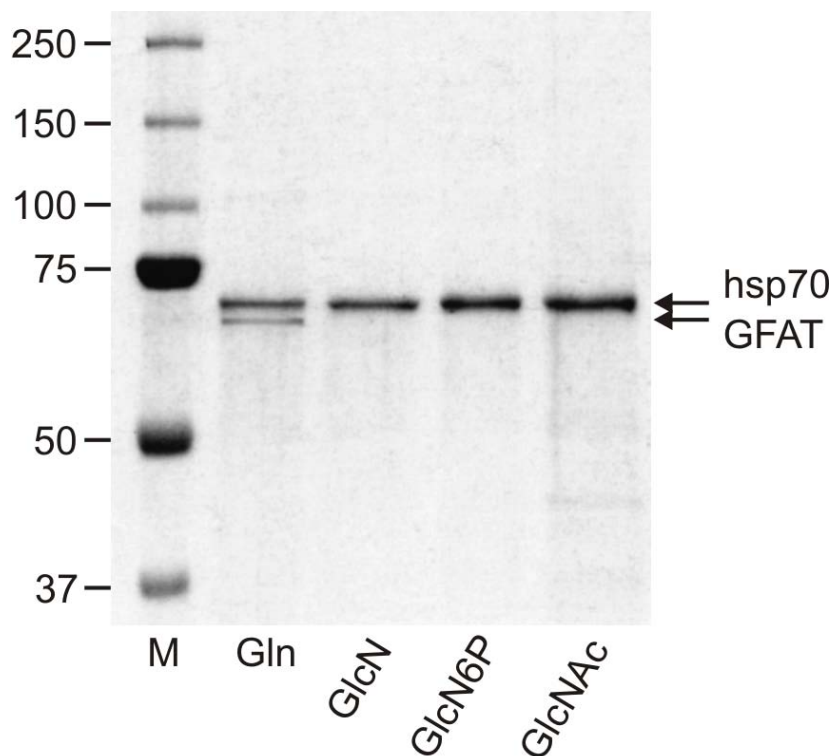
**Obrázek 19:** Kultivace při 25, 30 a 37°C.

Žádná z vyzkoušených kultivačních teplot neměla na expresi GFAT vliv. V dalším kroku byl sledován vliv suplementace média na míru exprese GFAT. Vzhledem k metabolické dráze syntézy aminoglykanů, do níž je GFAT zapojena (**Obrázek 20**), byl testován efekt následujících metabolitů: glukosamin (GlcN), N-acetylglukosamin-6-fosfát (GlcN6P) a N-acetyl-glukosamin (GlcNAc). Jako negativní kontrola byl zvolen glutamin (Gln).



**Obrázek 20:** Schéma hexosaminové dráhy.

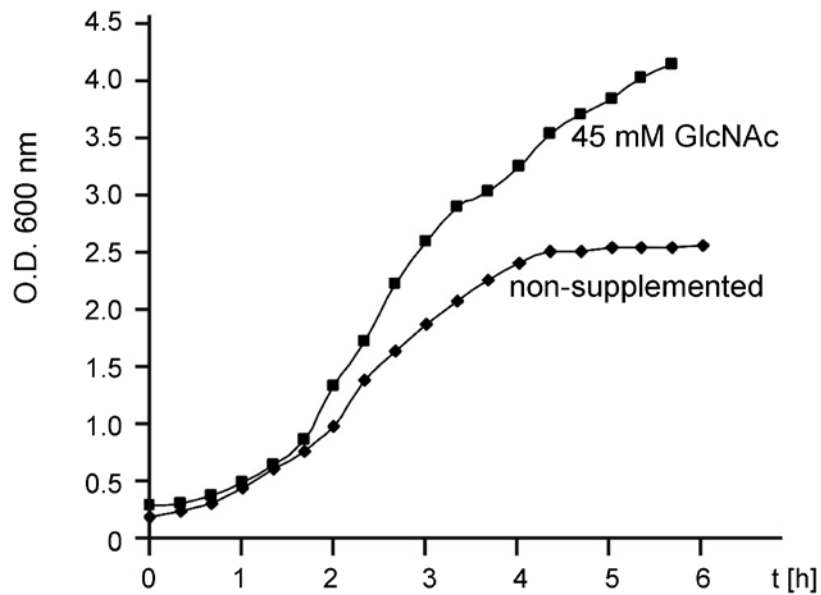
Všechny tři deriváty glukózy významně omezily expresi GFAT (**Obrázek 21**). Naopak kontrolní glutamin neměl na expresi GFAT výrazný vliv.



**Obrázek 21:** Supplementace média metabolity dráhy.

Podle výsledků SDS-PAGE elektroforézy a finanční dostupnosti jednotlivých suplementů byl zvolen N-acetyl-glukosamin jako optimální supplement potlačující produkci GFAT a tento byl použit i ve všech dalších expresních experimentech (hsp70, p24-hsp70 a hsp70-p24).

Navíc bylo potvrzeno, že přidáním N-acetyl-glukosaminu do média se zvyšuje denzita bakterií a tím i výtěžek rekombinantního proteinu při jinak stejných kultivačních podmínkách.

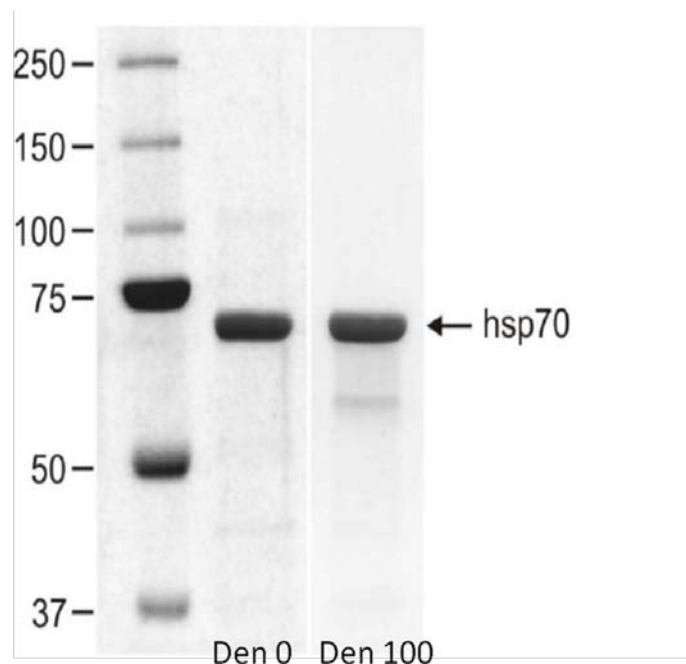


**Obrázek 22:** Sledování density suspenze *E. coli* měřením adsorbance v čase.

Přidáním N-acetyl-glukosaminu bylo možné dosáhnout nárůst O.D.<sub>600</sub> na 1,6 násobek, což odpovídá stejnému nárůstu koncentrace bakterií.

#### 4.4.3 Stanovení stability rekombinantního hsp70mm

Rekombinantní hsp70 byl po purifikaci převeden do 100 mM Tris-Cl, pH 7.4 a následně byla testována stabilita při +4°C (**Obrázek 23**). Densitometrické srovnání proužku hsp70 s ostatními minoritními proužky detekovanými v den izolace a po 100 dnech skladování potvrdilo, že 98% proteinu zůstává po 100 dnech intaktních.



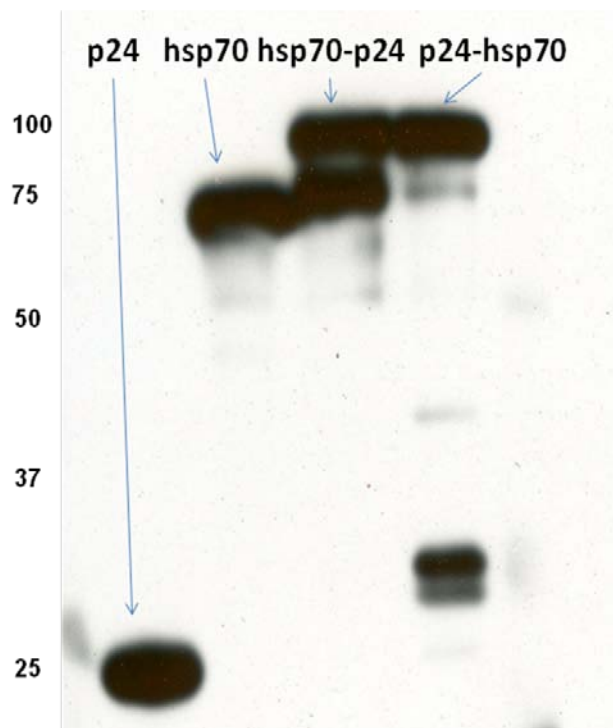
**Obrázek 23:** Stanovení stability pomocí vyhodnocení fragmentace proteinu pomocí SDS-PAGE .

#### 4.4.4 Příprava fúzních proteinů a p24

Fúzní proteiny hsp70-p24 a p24-hsp70, stejně jako hsp70 a p24 byly exprimovány v *E. coli* v LB médiu obsahujícím 45mM N-acetyl-glukosamin. Identita rekombinantních proteinů byla potvrzena pomocí Western blot analýzy s použitím myší anti – V5 - HRP protilátky. Parametry jednotlivých rekombinantních proteinů jsou shrnuty v **Tabulce 7**. Výpočet molekulové hmotnosti i teoretického bodu pI byly stanoveny pomocí programu ProtParam tool (<http://www.expasy.ch>).

	Počet aminokyselin	Molekulová hmotnost	Teoretický pI
p24-hsp70	923	101 152 Da	5,89
hsp70-p24	923	101 152 Da	5,89
p24	282	31 077 Da	6,46
hsp70	692	75 577 Da	5,82

**Tabulka 7:** Základní charakteristika jednotlivých rekombinantních proteinů.

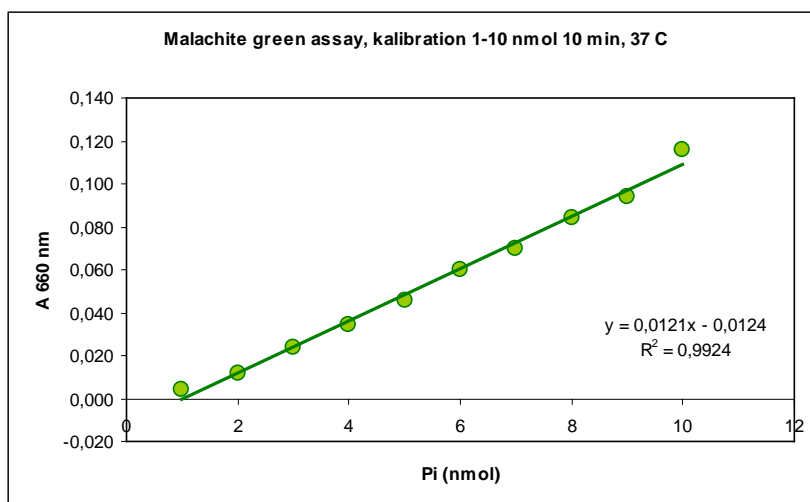


**Obrázek 24:** Western blot analýza rekombinantních proteinů s použitím protilátky reagující s V5 epitopem.

Navýšení molekulových hmotností jednotlivých proteinů je způsobeno přidáním epitopy V5 a HIS, které slouží k detekci a purifikaci těchto proteinů.

#### 4.4.5 ATPázová aktivita heat shock proteinů

Pro potvrzení nativní konformace rekombinantních proteinů byla měřena ATP-ázová aktivita hsp70, při které se z přidaného ATP uvolňuje anorganický fosfát Pi, jež tvoří následně s malachitovou zelení barevný produkt měřitelný spektrofotometricky při OD 660nm. Nejprve byla změřena kalibrační křivka uvolněného fosfátu pomocí standardu  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (**Obrázek 25**). Dosazením do rovnice lineární regrese kalibrační křivky byly získány hodnoty uvolněného Pi pro jednotlivé rekombinantní proteiny, z nichž byly stanoveny ATPázové aktivity. (**Tabulka 8**). Jako pozitivní kontrola byl použit rekombinantní protein hsp90 z *Candida albicans*.



**Obrázek 25:** Kalibrační křivka pro spektrofotometrické stanovení volného fosfátu pomocí malachitové zeleně.

	60 min			kcat (min <sup>-1</sup> )
	A 660 nm	Pi (nmol)	Pi prům.	
<b>hsp70</b>	0,099	9,2		<b>1,06</b>
10 µg	0,098	9,1		
	0,091	8,5		
	0,093	8,7	8,9	
<b>hsp70-p24</b>	0,116	10,6		<b>1,45</b>
10 µg	0,141	12,7		
	0,147	13,2	12,2	
<b>p24-hsp70</b>	0,062	6,1		<b>1,14</b>
10 µg	0,075	7,2		
	0,073	7,1	6,8	
<b>hsp90</b> ( <i>Candida albicans</i> )	0,042	4,5		<b>10,51</b>
	0,028	3,3		
	0,104	9,6		
1 µg	0,116	10,6	7,0	

**Tabulka 8:** ATPázová aktivita jednotlivých rekombinantních proteinů.

V ATPasové eseji bylo použito 10 µg jednotlivých rekombinantních proteinů s výjimkou hsp90 *C. albicans* jehož množství bylo 1 µg vzhledem k příliš vysokým hodnotám aktivity. Naměřené ATPázové aktivity odpovídají publikovaným hodnotám [141-143] .

#### 4.4.6 Odstranění lipopolysacharidů (LPS)

Před pulsací dendritických buněk a před imunizačními experimenty byly jednotlivé rekombinantní antigeny depyrogenovány extrakcí LPS do Tritonu X-114. Extrakce byla opakována, dokud koncentrace LPS neklesla pod hodnotu 2.5 EU/10 nmol proteinu. Před extrakcí se hodnota LPS pohybovala v hodnotách 17 000 EU/mg proteinu. Po čtyřech extrakcích klesla koncentrace LPS pod 1,79 EU/mg proteinu u všech proteinů, a další extrakce již hodnotu zásadně nesnížila, neboť pokles koncentrace LPS byl úměrný poklesu koncentrace rekombinantního proteinu.

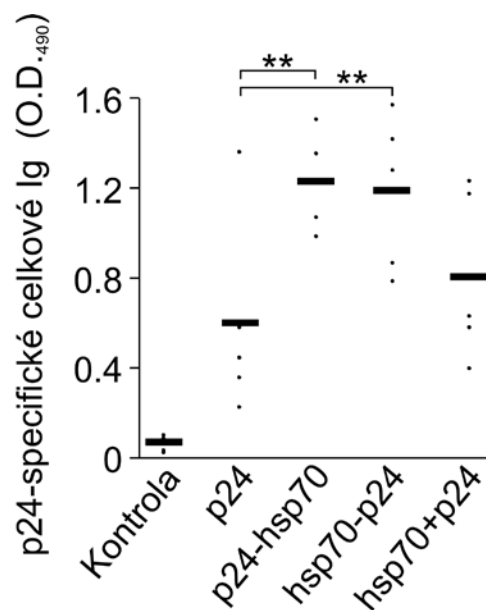
### **4.5 Vakcinace myší**

V dalším kroku byly testovány rekombinantní fúzní proteiny vzhledem k jejich schopnosti stimulovat p24 specifickou buněčnou a humorální odpověď u experimentálních myší po opakované intradermální injekci.

#### 4.5.1 Analýza humorální imunitní odpovědi

Imunizace fúzními proteiny p24-hsp70 a hsp70-p24 vyvolává silnější humorální p24-specifickou imunitní odpověď než samotný protein p24 nebo směs nekovalentně spojených proteinů p24 a hsp70 (**Obrázek 26**). Dále byla sledována imunitní odpověď v jednotlivých izotypech IgG, které umožňují zhodnotit poměr mezi Th1 typem (IgG2a, IgG2b) a Th2 (IgG1) typem imunoglobulinů.

Imunizace proteiny hsp70-p24 a p24-hsp70 vyvolává vyšší specifickou humorální odpověď u všech izotypů IgG imunoglobulinů (IgG1, IgG2a, IgG2b). Hladiny p24-specifických IgG po imunizaci fúzními proteiny hsp70-p24 and p24-hsp70 byly signifikantně vyšší než u kontrolních skupin myší vakcinovaných směsí p24 a hsp70 nebo samotným p24 (**Obrázek 26**), ačkoliv u obou kontrolních skupin byly koncentrace p24 specifických protilátek dobře detekovatelné.

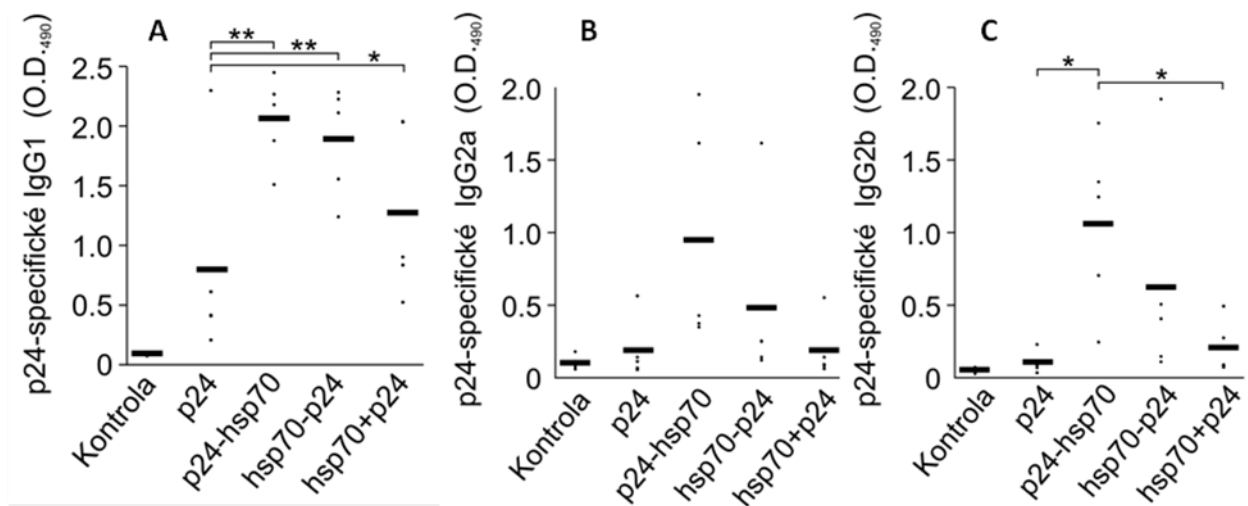


**Obrázek 26:** Stanovení celkových p24-specifických IgG protilátek po vakcinaci rekombinantními proteiny.

Analýzou p24-specifických IgG1 protilátek, reprezentujících Th2 typ imunitní odpovědi, bylo potvrzeno, že imunizace fúzními hsp70-p24 a p24-hsp70 proteiny indukují významně vyšší koncentrace p24 specifických protilátek oproti imunizaci samotným p24 nebo směsí volného p24 a hsp70. Statisticky významné rozdíly mezi skupinami vakcinovanými p24 a p24-hsp70 a mezi skupinami vakcinovanými p24 a hsp70-p24 jsou uvedeny na **Obrázku 27A**.

Analýza p24-specifických IgG2a a IgG2b izotypů, charakteristických u myši pro Th1 imunitní odpověď, vykazovala signifikantní vzestup koncentrací specifických protilátek po imunizaci fúzními proteiny hsp70-p24 nebo p24-hsp70, a naopak imunizace samotným p24 nebo směsí p24 a hsp70 vyvolala pouze mírný nárůst koncentrace p24-specifických IgG2a a IgG2b protilátek (**Obrázek 27 B, C**). Signifikantní rozdíly byly potvrzeny pro hladiny p24-specifických IgG2b protilátky po imunizaci p24-hsp70 a p24 nebo po imunizaci p24-hsp70 a směsí p24 a hsp70.



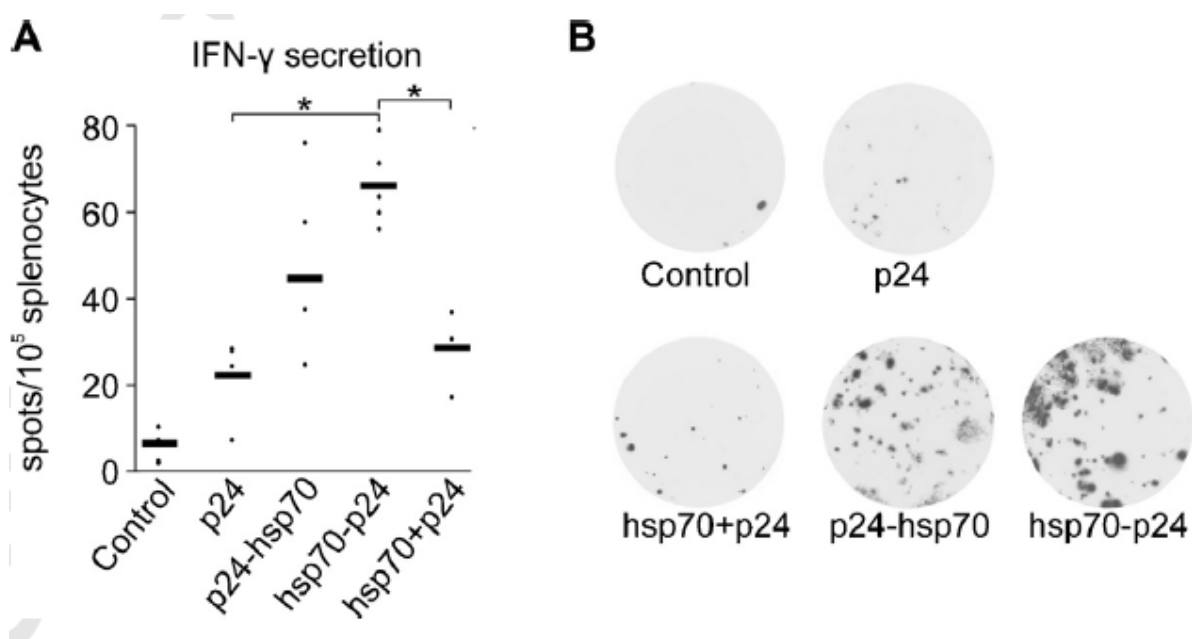


**Obrázek 27:** Koncentrace p24-specifických IgG1 (A), IgG2a (B) a IgG2b (C) protilátek po imunizaci myši různými fúzními proteiny.

#### 4.5.2 Analýza buněčné imunitní odpovědi

Paralelně ke stanovení humorální imunitní odpovědi myši byla sledována i buněčná odpověď splenocytů imunizovaných myši na *in vitro* stimulaci apyrogenním p24 metodou ELISPOT. Signifikantní rozdíly byly zaznamenány pro IFN- $\gamma$ . Nejvyšší počet IFN- $\gamma$  produkujících splenocytů byl detekován u skupiny myši imunizovaných fúzním proteinem hsp70-p24 (**Obrázek 28A**). Počet spotů byl výrazně vyšší než počet spotů detekovaný u myši imunizovaných proteinem p24 samotným nebo směsí p24 a hsp70. Počet spotů u myši vakcinovaných druhým fúzním proteinem p24-hsp70 byl vyšší než u myši vakcinovaných p24, avšak rozdíl mezi počtem spotů myši vakcinovaných fúzním proteinem p24-hsp70 a směsí p24 a hsp70 nebyl statisticky signifikantní.

Oba fúzní proteiny jsou tedy efektivnější v indukci p24 specifických splenocytů produkujících IFN- $\gamma$  oproti samotnému p24. Při srovnání počtu spotů obou fúzních proteinů se směsí p24 a hsp70 vykazoval signifikantní zvýšení počtu IFN- $\gamma$  produkujících splenocytů pouze protein hsp70-p24.



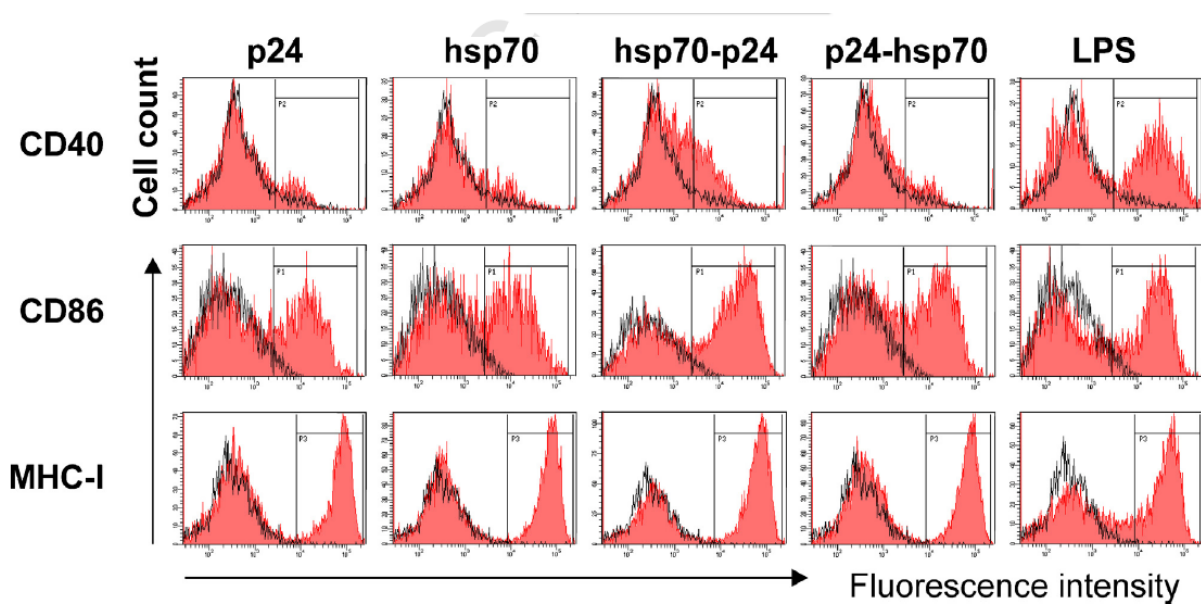
**Obrázek 28:** **A)** Stanovení počtu splenocytů produkujících IFN- $\gamma$  po *in vitro* restimulaci p24 antigenem u imunizovaných myší. **B)** Reprezentativní náhled ELISPOT jamek pro jednotlivé skupiny myší.

#### 4.6 Stanovení aktivace BMDC pulzovaných fúzními hsp70 proteiny

BMDC připravené *in vitro* diferenciací prekurzorů z kostní dřeně v přítomnosti GM-CSF a IL-4 byly *in vitro* pulzovány jednotlivými proteiny. Jako pozitivní kontrola byl použit LPS. Povrchová exprese aktivačních markerů (CD40, CD86 a MHC-I) byla srovnána s expresí u nepulzovaných BMDC (**Obrázek 29** - černá čára). Nejvyšší nárůst CD40<sup>hi</sup> BMDC byl naměřen po pulzaci hsp70-p24 proteinem (18%) (**Tabulka 9**). Naopak BMDC pulzované proteiny p24-hsp70, p24 nebo hsp70 nevykazovaly výrazný nárůst CD40<sup>hi</sup> populace. BMDC pulzované LPS, sloužící jako pozitivní kontrola, vykazovaly nejvyšší nárůst v počtu CD40<sup>hi</sup> buněk (40,3%).

Stanovení exprese CD86 znaku potvrdilo, že každý použitý rekombinantní protein stimuluje BMDC ke zvýšení povrchové exprese CD86 včetně p24 a hsp70, nicméně proteiny hsp70-p24 a p24-hsp70 jsou schopny stimulovat nárůst CD86<sup>hi</sup> BMDC nejefektivněji (54,9% resp. 40,6%). Stimulační aktivita hsp70-p24 je dokonce vyšší než aktivita LPS.

Částečné zvýšení exprese MHC-I molekul na povrchu BMDC bylo indukováno pulzací každým rekombinantním proteinem. Nejvyšší nárůst MHC-I<sup>hi</sup> BMDC (50,3%) byl zaznamenán opět u proteinu hsp70-p24. Rozdílný aktivační potenciál p24-hsp70 a hsp70-p24 nanačuje význam vzájemné orientace obou fúzních partnerů (hsp70 a p24). Podobné rozdíly byly pozorovány i při měření parametrů imunitní odpovědi u imunizovaných myší.



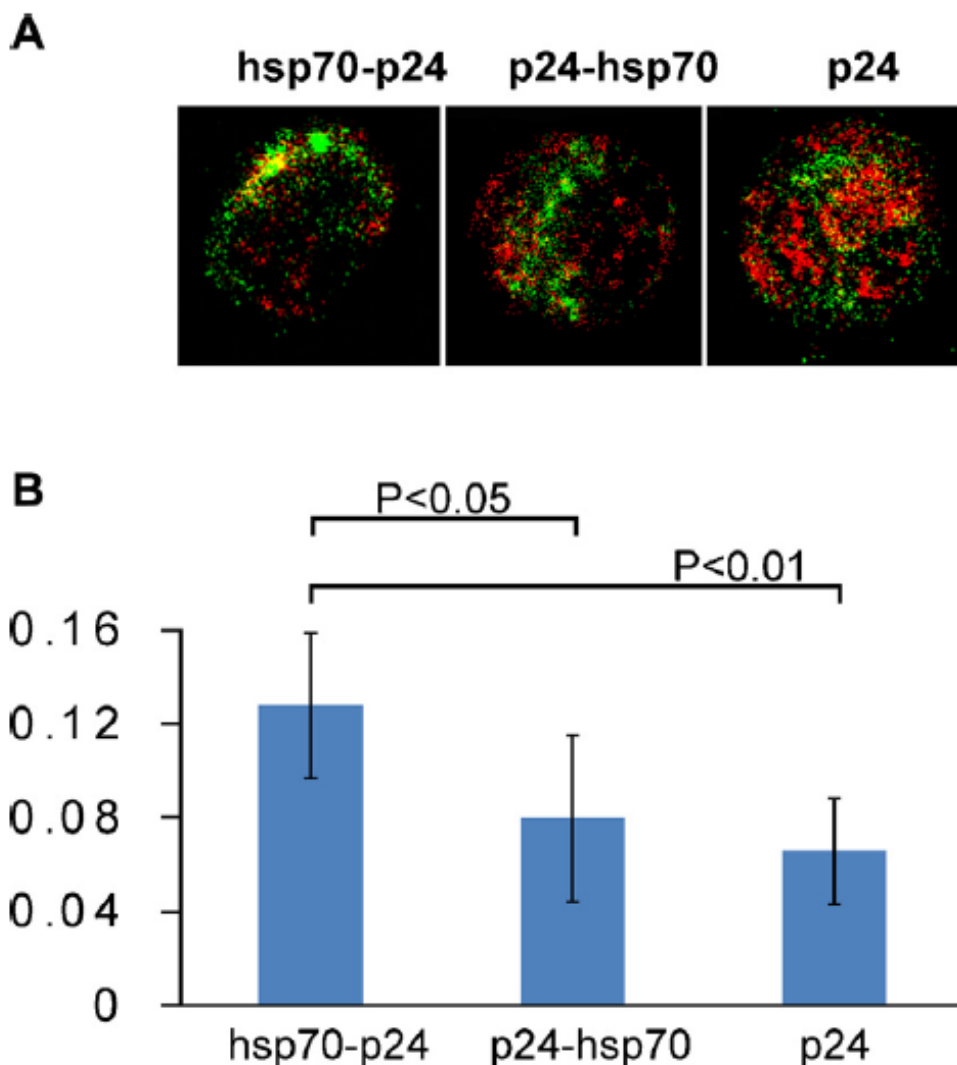
**Obrázek 29:** Expres CD40, CD86 a MHC-I molekul při pulzaci BMDC pomocí jednotlivých rekombinantních proteinů.

	Medium [%]	p24 [%]	hsp70 [%]	hsp70-p24 [%]	p24-hsp70 [%]	LPS [%]
	<b>průměr +/-SD</b>					
<b>CD40<sup>hi</sup></b>	<b>8.5</b> +/-0.5	<b>11.7</b> +/-1.3	<b>14.4</b> +/-1.2	<b>18.3</b> +/-0.9	<b>10.8</b> +/-0.6	<b>41.1</b> +/-0.7
<b>CD86<sup>hi</sup></b>	<b>20.4</b> +/-2.6	<b>33.0</b> +/-3.6	<b>39.3</b> +/-1.7	<b>54.9</b> +/-2.1	<b>40.6</b> +/-1.8	<b>42.3</b> +/-1.3
<b>MHC-I<sup>hi</sup></b>	<b>0.2</b> +/-0.1	<b>36.0</b> +/-2.2	<b>41.1</b> +/-1.6	<b>50.4</b> +/-2.0	<b>40.5</b> +/-2.0	<b>34.2</b> +/-1.6

**Tabulka 9:** Procentuální zvýšení exprese aktivačních povrchových molekul po pulzaci BMDC jednotlivými fúzními rekombinantními proteiny.

#### 4.7 Endocytóza p24 pulsovanými BMDC

Vzhledem k výše popsané schopnosti hsp70 stimulovat zkříženou prezentaci asociovaného antigenu jsme sledovali u BMDC efekt fúze p24 s hsp70 na endocytózu p24 *in vitro*. BMDC pulsované proteinem hsp70-p24 vykazují signifikantně vyšší procento p24 v časných endosomech oproti BMDC pulsovaným samotným p24 a nebo opačně orientovaným fúzním proteinem p24-hsp70 (**Obrázek 30**). Tento fakt naznačuje, že orientace fúze p24 a hsp70 je významným faktorem ovlivňujícím intenzitu endocytózy hsp70 asociovaného p24. Tyto výsledky jsou v souladu s aktivací BMDC *in vitro* i s *in vivo* stanovením produkce IFN- $\gamma$  splenocyty imunizovaných myší.



**Obrázek 30:** Kolokalizace p24 po pulsaci BMDC fúzními proteiny hsp70-p24, p24-hsp70 a p24 s markerem časného endozomu (EEA-1). p24 byl značen myší IgG anti-p24 a anti-myší

IgG konjugovanou FITZ, brzký endozom byl značen králičí IgG anti-EEA1 a králičí anti-IgG konjugovanou cy3 (A). Charakterizace kolokalizace v grafu pomocí Pearsonového koeficientu (B, osa y). Sloupce grafu znazorňují +/- SD, zároveň bylo provedeno statistické vyhodnocení pomocí Studentova T-testu.

## 5 Diskuze

To, co bylo před 20 lety nepředstavitelné a před 10 lety v rukou několika odborníků, je poslední dobou rutina prováděná v téměř každé průměrné laboratoři. Éra molekulární biologie a genetického inženýrství nám otevřela nezměrné možnosti nejen pro zkoumání živých organismů, jejich složení, metabolismu a funkcí, ale i tvorbu naprosto unikátních konstruktů, které by mohly sloužit v medicíně k léčbě mnoha dosud neléčitelných nemocí.

A právě široké spektrum funkčnosti proteinů tepelného šoku je posouvá do popředí zájmu mnoha vědeckých týmů. Tato práce je zaměřená na schopnost hsp imunomodulovat imunitní odpověď organismu na antigen, který je k hsp buď kovalentně, nebo nekovalentně připojen. Šance, že se právě pomocí proteinů tepelného šoku podaří vytvořit vakcíny proti některým virům nebo tumorům, které budou vyvolávat nejen humorální ale i cytotoxickou imunitní odpověď organismu imunizovaného jedince, je vysoká, ale cesta ke klinickému využití je ještě zdlouhavá a náročná.

Při tvorbě rekombinantních hsp70, p24 a jejich fúzních partnerů bylo provedeno několik desítek metod z oborů molekulární biologie, genetiky, biochemie, analytické chemie, nebo mikroskopie. U některých z nich nastaly i různé komplikace, které jsou v této kapitole společně s výsledky diskutovány.

Kontrola exprese proteinů v savčích buňkách je důležitá kvůli jejich následnému použití jako DNA vakcíny. Pokud dojde při klonování například ke změně čtecího rámce, dojde k expresi nesmyslného proteinu. Obecně se dá očekávat, že takový protein bude kratší vzhledem k vzniku náhodného terminačního kodonu. Současné manipulace s cDNA, jako je optimalizace kodonů, však toto zkracování potlačují, neboť vedou k tomu, že cDNA je čitelná v mnoha případech ve všech třech nebo alespoň ve dvou čtecích rámcích, což je příklad použitého p24 proteinu [144]. Proto kontrola exprese cílového proteinu může být provedena v uspořádání Western blot buď protilátkou proti cílovému proteinu nebo protilátkou proti C' terminální značce jako například V5 tag, jak tomu bylo v této práci. Takto je možné po kontrole molekulové hmotnosti potvrdit zachování primární struktury proteinů. Nicméně SDS – PAGE elektroforéza je metoda denaturační, a proto nelze zjistit, jak moc se změnila struktura sekundární popř. terciální u obou proteinů (hsp70 a p24) při jejich vzájemné fúzi. Pokud by se konformace proteinů nějak radikálně změnila, mohl by být epitop, na který se váže protilátka, stéricky nedostupný. Protože byla i tato detekce úspěšná, lze říci, že oba fúzní konstrukty p24-hsp70 a hsp70-p24 mají dostupné p24 epitopy rozlišované specifickou

protilátkou. To bylo částečně potvrzeno pozitivní reakcí s myší anti-hsc70 protilátkou (data nezobrazena). Pro potvrzení funkční konformace hsp70 podílu byla naměřená ATPázová aktivita hsp70. I když publikované hodnoty  $k_{cat}$  hsp70 proteinů nejrůznějšího původu se pohybují v širokém rozmezí od  $0,2 \text{ min}^{-1}$  [141] do  $108 \text{ min}^{-1}$ , hodnoty savčích hsp70 se pohybují kolem  $1 \text{ min}^{-1}$  [145]. Výsledky naměřené pro hsp70 ( $1,06 \text{ min}^{-1}$ ), hsp70-p24 ( $1,45 \text{ min}^{-1}$ ) i p24-hsp70 ( $1,14 \text{ min}^{-1}$ ) jsou víceméně podobné, a proto můžeme předpokládat, že u hsp70 resp. jeho části zodpovědné za ATPázovou aktivitu k žádné velké změně díky fúzi nedošlo. Jako kontrola byl použit hsp90 (*C. albicans*), jehož hodnoty ATPázové aktivity jsou několikanásobně vyšší v souladu s literaturou [141, 145].

Při kontaminaci rekombinantního proteinu jiným proteinem, jak bylo v této práci demonstrováno pro hsp70 a GFAT, je změna kultivačních podmínek prvním krokem pro jeho eventuelní eliminaci. Je to mnohem efektivnější nástroj, než testování různých purifikačních procesů, které jednak nemusí vést k požadovanému cíli, jednak často vedou ke ztrátám i vlastního rekombinantního proteinu. V této práci ale většina purifikačních metod nebyla vhodná vzhledem k velmi podobným vlastnostem obou proteinů. Již několikrát bylo publikováno, že při nižších teplotách dochází v bakteriích *E. coli* ke změně poměru proteinů nebo ke zlepšení stability exprimovaného rekombinantního proteinu [146-147]. I když se většinou při nižších teplotách exprimuje nižší množství rekombinantních proteinů, je jejich čistota daleko vyšší. Proto při průkazu významné příměsi bakteriálních proteinů v purifikovaném rekombinantním proteinu je první logický a nejjednodušší krok změna kultivačních teplot. Jelikož tato cesta nevedla k požadovanému cíli, byla použita metoda suplementace média produktem kontaminujícího enzymu. Při nadbytku produktu se totiž tvorba enzymu může minimalizovat, tzv. inhibice produktem. Tato metoda se ukázala velice efektivní, a proto v dalších experimentech byla kontaminace rekombinantních hsp70 proteinů enzymem GFAT efektivně eliminována suplementací média GlcNAc.

Imunostimulační vlastnosti hsp70 jsou však stále diskutovány vzhledem k možné kontaminaci nukleosidy při purifikaci ATP afinitní chromatografií, nebo endotoxinem [37, 148]. Jelikož byla v této práci použita metoda purifikace proteinů afinitní chromatografií pomocí navázané Ni-NTA, není kontaminace nukleosidy v tomto případě aktuální. Naopak lipopolysacharid (endotoxin) pocházející z buněčných stěn gramnegativních bakterií musel být odstraněn. Způsobuje totiž při aplikaci do savčího organismu hyperaktivaci imunitního systému spojenou s vysokými teplotami, proto je také nazýván pyrogen. LPS je velmi potentní aktivátor imunitního systému a to nejen B lymfocytů ale i APC. Publikovaných způsobů, jak odstranit endotoxiny, je hned několik. V naší laboratoři jsme zkoušeli LPS

nejprve odstranit přes komerční chromatografické kolony EndoTrap (Lonza, Walkersville, MD, USA) fungující na principu vazby endotoxinu na protein izolovaný z bakteriofága, tzv. EndoTrap protein. Tento protein se váže vysoce specificky a se silnou afinitou na konzervovanou část vnitřní struktury LPS. Obě dvě dodávané varianty Red a Blue udávají vysokou účinnost odstranění LPS bez větší ztráty proteinu. V případě hsp70 ale bylo zjištěno, že při každém cyklu depyrogenace dochází ke ztrátě 18% proteinu na EndoTrap Red koloně, nebo 8% proteinu na EndoTrap Blue koloně. Přičemž po 5 cyklech depyrogenace byla hladina endotoxinu stále mezi 170 a 1700 EU/mg proteinu. Hsp70 se zřejmě váže společně s endotoxinem na matrix kolony, čímž dělá chromatografické metody odstranění LPS neefektivními.

Jiný způsob odstranění endotoxinu spočívá v jeho vymytí již na Ni-NTA koloně [149]. Kolona s navázaným proteinem byla intenzivně promyta pufrém obsahujícím Triton X-114, čímž byl endotoxin odstraněn. Je ale velice komplikované a finančně daleko náročnější udržovat všechny následující kroky endotoxin-free. Eluční pufr s imidazolem, dialyzační pufr, laboratorní sklo i pipety musí být zbaveny LPS. Navíc hodnota endotoxinu se nakonec nelišila od hodnot získaných postupem použitým v této práci, extrakce endotoxinu z finálně purifikovaného rekombinantního proteinu do Tritonu X-114. Srovnáním efektivity, časové a finanční náročnosti jednotlivých postupů se extrakce endotoxinu do Tritonu X-114 jeví jako nejefektivnější pro imunizační účely.

V dalších krocích byla sledována imunitní odpověď experimentálních myší na DNA i proteinovou vakcínu p24 a její hsp70 modifikace. Oba fúzní konstrukty evidentně zvyšují imunogenicitu antigenu p24 a to jak při sledování humorálních, tak zejména buněčných parametrů. Z experimentů u myší nelze stanovit jeden konstrukt, který by byl pro vyvolání imunitní reakce univerzálně výhodnější jak pro DNA vakcinaci tak pro imunizaci rekombinantním proteinem. Při indukci tvorby p24-specifických protilátek je efektivnější p24–hsp70, zatímco vyšší p24-specifickou produkci IFN- $\gamma$  vykazuje fúzní hsp70-p24 protein. Navíc podle průtokové cytometrie jsou BMDC lépe stimulovány proteinem hsp70-p24. Můžeme tedy říci, že rekombinantní fúzní protein hsp70-p24 lépe stimuluje buněčnou imunitní reakci Th1 typu dle dominance produkce IFN- $\gamma$ . Naopak fúzní protein p24-hsp70 zvyšuje tvorbu p24 specifických protilátek a to v izotypu Th1 (IgG2a, IgG2b) tak i v izotypu Th2 (IgG1), což je zřejmě spojeno s efektivnější stimulací CD4<sup>+</sup> T lymfocytární odpovědi. Souhrně lze říci, že fúzní konstrukty s hsp70 významnou měrou přispívají ke zvýšení imunitní odpovědi na p24 antigen a navíc posouvají imunitní odpověď k Th1, čímž přispívají ke zlepšení buněčné imunitní odpovědi, která je důležitá při protekci vůči HIV infekci



mediované p24 specifickou imunitní odpovědí [53]. Z tohoto experimentu není možné předpovědět, do jaké míry je orientace hsp70 vzhledem k jiným fúzním partnerům než p24 významná pro dominanci buněčné imunitní odpovědi, zejména pro to, že odpovědi na obě varianty hsp70-p24 a p24-hsp70 byly relativně podobné. To je věc experimentálního ověření. Nicméně zdánlivě malé ale statisticky významné rozdíly v imunitní odpovědi na obě varianty orientace hsp70 a p24 jak na rekombinantní proteiny tak na DNA vakcínu naznačují, že experimentální porovnání obou variant je důležité k identifikaci optimálně fungujícího imunogenu. Klíčové pozorování z imunizačních experimentů ale je, že apyrogenní vakcinační konstrukt využívající hsp70 jako nosič nevyžaduje podání žádného dalšího adjuvans k vyvolání buněčné imunitní odpovědi, a to zejména proto, že většina klinicky schválených adjuvans stimuluje zejména Th2 imunitní odpověď. V dnešní době jsou k dispozici i adjuvantní látky schopné stimulovat buněčnou imunitní odpověď jako jsou AS-01, AS-02, nebo jejich komponenty MPLA, QS-21, nebo například v naší laboratoři testované nepyrogenní deriváty MDP [150-151], které mají potenciál potvrdit v dalších experimentech synergii při indukci buněčné imunitní odpovědi na hsp70-p24 konstrukty.

Při izolaci a diferenciaci dendritických buněk bylo také zkoušeno několik málo úprav, které byly publikovány v některých pracech. Zajímavé je, že skoro polovina publikací věnující se diferenciaci BMDC uvádí, že jediný cytokin potřebný pro správnou diferenciaci monocytu v DC je GM-CSF [140, 152-153]. Přičemž podle dostupných znalostí se z monocytů v prostředí GM-CSF stávají makrofágy [154-155], teprve ve dvojkombinaci GM-CSF s IL-4 dochází k diferenciaci na dendritické buňky. Mnoho dalších publikací uvádí, že do kultivačního média pro BMDC je dobré přidat merkaptoetanol [156-157]. Podle našich pozorování přítomnost či absence merkaptoethanolu nijak neovlivňuje proliferaci ani diferenciaci BMDC.

Jako pozitivní kontrola při stimulaci BMDC byl použit lipopolysacharid (100 ng/ml). Podle některých publikací je možné použít i koncentrace vyšší. Byla zkoušena stimulace pomocí 1 µg/ml LPS [158], ovšem po 24 hod byly všechny buňky mrtvé. Taková koncentrace se zdá být pro BMDC toxická. Stejně tak při 500 ng/ml LPS [159-160] byla viabilita buněk po 24 hod 40% a po 48 hod 0%. Byla zkoušena i relativně nízká koncentrace 10 ng/ml LPS [161], buňky ale nevykazovaly tak vysoký stupeň maturace jako při použité koncentraci 100 ng/ml LPS. Přesto se ve výsledcích objevuje fakt, že hsp jsou lepšími stimulatory maturace než LPS, což je relativně překvapující. Použitých 100 ng/ml LPS tedy zřejmě není limitních ve stimulaci BMDC a bylo by třeba vyzkoušet další varianty pohybující se mezi 100 a 500 ng/ml LPS. Nicméně tato práce se zabývá studiem imunomodulačních vlastností proteinů

tepelného šoku a ne lipopolysacharidu. Ten sloužil ve všech měřeních pouze jako pozitivní kontrola stimulace, proto pro účely této práce není zcela zásadní stanovení nejvyšší možné hladiny stimulace LPS.

Již příprava vzorků pro fluorescenční a konfokální mikroskopii narazila na několik komplikací. Jelikož se pracovalo s více druhy savčích buněk (297T, BMDC), muselo být vyzkoušeno několik postupů fixace buněk. Zatímco buňky 293T se jeví jako snadno fixovatelné klasickou metodou metanol/aceton, BMDC musely být fixovány paraformaldehydem a posléze permeabilizovány. Navíc buňky 293T jsou adherentní, takže se fixovaly přímo na sklíčku, zatímco BMDC musely být centrifugovány pomocí cytopsinu.

Další problémy nastaly ve zvolení vhodné myši anti-p24 protilátky. Ačkoliv je struktura p24 proteinu značně konzervovaná, je na trhu velké množství různých anti-p24 protilátek. Námi zkoušené komerční protilátky byly buď nedostatečně specifické, nebo se na náš p24 nevázaly vůbec. Proto bylo přistoupeno k izolaci polyklonálních protilátek ze séra imunizovaných myší. Takto získaná polyklonální protilátka vykazovala nakonec nejvyšší specifitu s nejnižším pozadím, a proto byla zvolena pro následné mikroskopické experimenty.

Konfokální mikroskopii byla sledována kolokalizace jednotlivých rekombinantních proteinů s markerem brzkých endozomů EEA1. Fúzní proteiny hsp70-p24 a p24-hsp70 vykazují významnější kolokalizaci signálu protilátky proti p24 s markerem EEA1, čímž potvrzují naši hypotézu, že hsp70 jako fúzní partner antigenu p24 přispívá k endocytóze následované lokalizací p24 v brzkých endozomech, což je klíčový krok pro zkříženou prezentaci p24. Přestože DC mohou po značnou dobu potlačovat degradaci endocytovaného antigenu [76-79], což je nezbytné pro zpracování antigenu k prezentaci na MHCI molekulách, po 4 hodinách od pulzace BMDC, byly již všechny p24 antigeny detekovatelné specifickou protilátkou mimo brzké endozomy a naprostá většina proteinů již nebyla detekovatelná, což odpovídá postupující fragmentaci p24.

Problematikou fúze proteinů tepelného šoku s antigenem se zabývá mnoho pracovišť již déle než 10 let. Dokonce i fúze hsp70 s antigenem HIV-1 p24 byla dokumentována s použitím hsp70 *M. tuberculosis* [59]. V roce 1996 byla publikována práce, která vyzdvihuje adjuvantní schopnosti fúze hsp70 s p24. Z podmínek publikovaného experimentu není zcela zřejmé, zda za zvýšení humorální i buněčné imunitní odpovědi může LPS, jehož kontaminace není uvedena, nebo samotný hsp protein.

Další práce zabývající se hsp70 a její fúzí s antigenem popisuje efektivní purifikaci hsp70 a následnou depleci endotoxinu pomocí činidla Kurimover I [162]. Finální koncentrace LPS po srážení Kurimover I činidlem je méně než 1ng/ml, což je akceptovatelná hodnota pro

imunizační experimenty [163-164]. Takto vyčištěný protein však byl následně nanesen na kolonu, několikrát promyt, eluován, dialyzován bez jakékoliv zmínky o přítomnosti LPS v použitých pufrách, kolonách a laboratorních pomůckách. Není proto jednoznačně možné vyhodnotit dosah závěru, že takto purifikovaný hsp70 aplikovaný do myši vyvolává silnou CTL imunitní odpověď.

Jako vyvrácení všech dosud publikovaných výsledků o imunomodulačních vlastnostech proteinů tepelného šoku bylo v roce 2008 publikováno sdělení, které popírá jakékoliv imunostimulační schopnosti hsp proteinů [149]. Za jakékoliv zvýšení imunitních odpovědí je podle autorů zodpovědný právě LPS. Po jeho naprostém odstranění nebyl hsp schopen jakkoliv zvyšovat imunitní odpověď. Publikované závěry jsou v kontrastu se závěry našimi i závěry jiných skupin. V této práci uvedená data, získaná s hsp proteiny vykazující akceptovatelně nízkou hladinu LPS, potvrzují, že se fúzí hsp s antigenem nejen zvyšuje imunitní odpověď, ale navíc je tato směřována k Th1. Tím se naše výsledky řadí ke skupině autorů potvrzujících imunomodulační vlastnosti hsp70. Pokud by tyto změny byly způsobeny LPS, byly by naměřeny u všech vzorků stejně, tedy i u p24 nebo hsp70 jako negativních kontrol, v nichž koncentrace LPS byla shodná. Z našich měření je zřejmé, že LPS ač bezesporu potentní stimulátor imunitní odpovědi hostitele obecně, není hlavní stimulátor imunitní odpovědi v případě antigenů fúzovaných s hsp70 tak, jak bylo vyhodnoceno v předložené práci.

## 6 Závěr

Podle vytyčených cílů práce byla z myších splenocytů vyizolována cDNA kódující myší hsp70, která byla nejprve vložena do klonovacího vektoru podobně jako sekvence kódující antigen p24 .

Po navržení vhodné klonovací strategie byly pomocí několika ligačních a PCR klonovacích reakcí připraveny plasmidy kódující fúzní konstrukty hsp70-p24 a p24-hsp70, hsp70 a p24 vhodné k savčí i bakteriální expresi příslušných rekombinantních antigenů.

Všechny konstrukty vzniklé během přípravy byly analyzovány a jejich sekvence byla potvrzena restričními analýzami a komerčním sekvenováním.

Pro potvrzení expresivity a částečně i dostupnosti p24 epitopů rekombinantních p24, hsp70-p24 a p24-hsp70 antigenů exprimovaných v savčím systému, jako hlavní podmínky fungování testovaných DNA vakcín, byly transfekovány odpovídající vektory do 293T buněk. Expres byla ověřena pomocí Western Blot analýzy a fluorescenční mikroskopie. DNA vakcíny byly poté aplikovány intramuskulárně do BALB/c myši a imunitní odpověď byla vyhodnocena pomocí stanovení parametrů p24 specifické buněčné a humorální odpovědi. Nejvyšší p24 specifická buněčná odpověď měřená u imunizovaných myši na izolovaných splenocytech *in vitro* restimulovaných p24 antigenem byla naměřená pro DNA kódující hsp70-p24 protein. Naopak nejvyšší titer p24 specifických protilátek vykazuje DNA vakcína kódující p24-hsp70.

Následně byla pro účely vakcinace rekombinantními proteiny provedena exprese rekombinantních proteinů v *E. coli*. Základní překážkou přípravy vysoce čistého rekombinantního proteinu byla kontaminace enzymem glukosamin-fruktosa-6-fosfát aminotransferáza, která byla efektivně odstraněna pomocí suplementace média produktem této aminotransferázy GlcNAc. Přidání GlcNAc významně zvýšilo denzitu buněčné kultury a tím i výtěžek rekombinantních proteinů. Druhá a imunologicky významnější kontaminace LPS byla minimalizována na imunologicky akceptovatelné hodnoty extrakcí do Tritonu X-114, kdy po čtyřech extrakcích se hladina LPS snížila na méně než 1,79 EU/mg proteinu.

Identita proteinů byla potvrzena pomocí SDS-PAGE, Western Blot analýzy a hmotnostní spektrometrie. Dále byla u proteinů obsahujících hsp70 stanovována ATP-ázová aktivita. Naměřená aktivita se pohybovala v rozmezí 1,06-1,45 min<sup>-1</sup>, což je v souladu s již publikovanými hodnotami.

Rekombinantní proteiny byly poté použity pro intradermální imunizaci experimentálních BALB/c myši. Humorální a buněčné imunitní odpovědi byly hodnoceny metodami ELISPOT a ELISA. Samotná vakcinace myši potvrdila, že fúze p24 antigenu s proteinem tepelného šoku hsp70 přispívá k vyvolání p24-specifické imunitní odpovědi s dominancí Th1. Rozdíly v intenzitách imunitní odpovědi potvrdily, že orientace fúzních partnerů p24 a hsp70 ovlivňuje kvalitu a intenzitu humorální i buněčné p24 specifické imunitní odpovědi. Vyšší p24 specifickou produkci IFN $\gamma$  indukuje fúzní hsp70-p24, ve tvorbě p24-specifických protilátek je efektivnější p24–hsp70.

Rekombinantní proteiny byly také použity ke stimulaci *in vitro* diferencovaných DC detekované stanovením povrchové exprese aktivačních markerů MHC-I, CD40 a CD86 pomocí průtokové cytometrie. Nejlepším stimulatorem BMDC je protein hsp70-p24 a to u všech měřených znaků následován proteinem p24-hsp70.

Pro potvrzení příspěvku hsp70 ke zkřížené prezentaci p24 antigenu byla pomocí konfokální mikroskopie sledována endocytóza p24 a jeho lokalizace v časném endosomu. Pulzace fúzními proteiny p24-hsp70 a hsp70-p24 vedla ke statisticky signifikantně vyšší kolokalizaci p24 s časným endosomem ve srovnání s pulsací samotným p24.

## 7 Souhrn

Tato práce se zabývá studiem imunomodulačních vlastností proteinů tepelného šoku (hsp). Modelovým proteinem tepelného šoku byl zvolen hsp70, ke kterému byl na úrovni DNA pomocí ligace připojen protein p24 pocházející z kapsidy viru HIV. Gen kódující p24 byl připojen dvěma způsoby a to na 5' - nebo 3' - konec genu kódující hsp70 protein.

Fúzní proteiny byly ligovány do prokaryontního expresního vektoru Champion™ pET101 Directional (D) TOPO umožňující expresi v bakteriích *E. coli* a zároveň do eukaryontního vektoru pcDNA 3.1 D/V5-His TOPO umožňující expresi v eukaryontních buňkách a DNA vakcinaci.

Plasmidy kódující fúzní proteiny byly aplikovány intramuskulárně do BALB/c myši. Buněčná odpověď byla analyzována pomocí průtokové cytometrie, zatímco specifické anti – p24 protilátky byly stanovovány metodou ELISA.

Proteiny p24, hsp70, p24-hsp70 a hsp70-p24 byly exprimovány v expresních liniích bakterií *E. coli* BL21 (DE3) a purifikovány pomocí metaloafinitní chromatografie. Jejich identita byla ověřena pomocí SDS – PAGE elektroforézy, Western Blot analýzy a MALDI – TOF hmotnostní spektrometrie.

Jelikož byly purifikované proteiny určeny k vakcinaci, bylo nutné odstranit lipopolysacharidy (LPS) pocházející z buněčných stěn bakterií. LPS byly odstraněny několikanásobnou extrakcí do Tritonu X-114.

Rekombinantní proteiny v ekvimolárním množství byly aplikovány intradermálně do BALB/c myši. Buněčná odpověď byla analyzována pomocí metody ELISPOT, zatímco specifické anti – p24 protilátky byly stanovovány metodou ELISA.

Paralelně byly izolovány a diferencovány nezralé myši dendritické buňky (BMDC), které byly pulzovány rekombinantními proteiny. Diferenciace a maturace dendritických buněk byla analyzována pomocí protilátek metodou průtokové cytometrie, zatímco internalizace antigenů do BMDC byla sledována pomocí konfokální mikroskopie.

## 8 Summary

This work focuses on the studying of immunomodulation properties of heat shock proteins (hsp). As the model protein the heat shock protein hsp70 was chosen. hsp70 was fused on the DNA basis with the p24 protein coming from viral capsid of HIV. The gene coding for p24 was ligated even to 5'- or to 3'- end of the hsp70 gene.

Such fused proteins were ligated into the prokaryotic vector Champion™ pET101 Directional (D) TOPO for bacterial expression in *E. coli* and simultaneously into the eukaryotic vector pcDNA 3.1 D/V5-His TOPO for eukaryotic expression or DNA vaccination.

Plasmids coding for fusion proteins were applicated intramuscularly into BALB/c mice. Whereas the cellular immune response was analyzed by flow – cytometry, specific anti – p24 antibodies were determined by ELISA.

Proteins p24, hsp70, p24-hsp70 and hsp70-p24 were expressed in expression lines of *E. coli* bacteria BL21(DE3) and purified by metalloaffinity chromatography. The identity was confirmed by SDS – PAGE electrophoresis, Western Blot analysis and MALDI – TOF mass spectrometry.

Because the purified protein should be used for mice vaccination the lipopolysaccharide (LPS) coming from the bacterial cell walls needed to be removed. LPS was removed by several – times extraction into Triton X114.

Recombinant proteins in equimolar amount were applicated intradermally into BALB/c mice. Cellular immune response was analyzed by ELISPOT method and specific anti – p24 antibodies were determined by ELISA.

Parallelly, immature murine dendritic cells (BMDC) were isolated and differentiated. Immature BMDCs were pulsed by recombinant proteins. The cell differentiation and maturation was analyzed using antibodies by flow – cytometry. Whereas the antigen internalization was observed by confocal microscopy.

## 9 Seznam zkratek

AIDS - acquired immune deficiency syndrome  
AP 1 - activator protein 1  
APC - antigen presenting cell  
ATP - adenosine triphosphate  
BL21 - *Escherichia coli* strain  
BMDC – bone marrow - derived dendritic cells  
Cat S – cathepsin S  
CCR5 - C-C chemokine receptor type 5  
cDNA - complementary DNA  
CD4,5,6 atc - cluster of differentiation  
CIP - calf-intestinal alkaline phosphatase  
CLIP - class II associated invariant chain peptide  
CO<sub>2</sub> – oxid uhličitý  
CR3 – complement receptor 3  
CTL- cytotoxický T lymfocyt  
DAMP - damage-associated molecular patterns  
DAPI - 4',6-diamidin-2-fenyindol  
DC – dendritic cell  
DNA - deoxyribonucleic acid  
dNTP - dideoxynucleotide triphosphates  
DTT - dithiothreitol  
*E. coli* – *Escherichia coli*  
EDTA - ethylenediaminetetraacetic acid  
EEA1 - early endosome antigen 1  
ELISA - enzyme-linked Immunosorbent assay  
ELISPOT - enzyme-linked immunosorbent spot  
ER – endoplazmatické retikulum  
ERAD – endoplasmic reticulum associated protein degradation  
ERAP - endoplasmic reticulum aminopeptidase  
FBS - fetal bovine serum  
FITC - fluorescein isothiocyanate



GFAT - Glutamin fruktoza-6-phosfát amidotransferáza  
GILT - Gamma interferon-inducible lysosomal thiolreductase  
GLcN – glukosamin  
GLcNAc - *N*-acetylglukosamin  
GLcN6P – glukosamin-6-fosfát  
GMAT - gap junction-mediated antigen transport  
GM-CSF - Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor  
gp96 – glykoprotein 96  
grp170 – glukose regulated protein 170  
GTP - guanosintrifosfát  
HAART - highly active antiretroviral therapy  
HEPES - 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid  
HF – high fidelity  
His - histidin  
HIV - human immunodeficiency virus  
HLA - human leukocyte antigen  
HRP – horseradish peroxidase  
Hsp - heat shock protein  
IFN $\gamma$  - interferon gamma  
IL4 – interleukin 4  
IPTG - isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside  
IRAK4 - interleukin-1 receptor associated kinase 4  
IRAP - insulin-regulated aminopeptidase  
IRF - interferon regulatory factor  
kalcein-AM - acetomethoxy derivát kalceinu  
kDa - kilodalton  
KDEL – proteinový receptor v endoplazmatickém retikulu  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – dihydrogen fosforečnan draselný  
LAL - Limulus amebocyte lysate  
LB médium - Luria-Bertani broth médium  
LOX 1 - lectin-like oxidized low-density lipoprotein (LDL) receptor-1  
LPS - lipopolysacharid  
LR – ligační reakce  
Mac-1 - macrophage-1 antigen

MAGE 3 - melanoma-associated antigen 3  
MALDI – TOF - matrix assisted laser desorption/ionization, time-of-flight  
MDP - muramyl dipeptide  
MHC - Major Histocompatibility Complex  
MPLA - monophosphoryl lipid A  
MyD88 - myeloid differentiation primary response gene 88  
NaCl – natrium chloride  
NADPH - nicotinamide adenine dinucleotide phosphate  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – dihydrogen fosfát sodný  
NF- κB: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells  
NFM – non fat milk  
NaN<sub>3</sub> – azid sodný  
NO - nitric oxide  
NOD - nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein  
NOX2 - nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase (NADPHoxidase)  
NTA - nitrilotriacetic acid  
NY-ESO 1 - Autoimmunogenic Cancer/Testis Antigen  
OPD - o-Phenylenediamine dihydrochloride  
OspC - Outer surface protein C  
OVA – ovalbumin  
PAMP – pathogen - associated molecular pattern  
PBS - Phosphate-buffered saline  
PCR - polymerase chain reaction  
Pi – anorganický fosfát  
PLC – peptide loading complex  
PLGA - poly(lactic-coglycolic acid)  
PMSF - phenylmethylsulfonyl fluoride  
PVDF - polyvinylidene difluoride  
RAGE - the receptor for advanced glycation endproducts  
RME - receptor mediated endocytosis  
RNA - ribonucleic acid  
RNase - ribonuclease  
ROS - reactive oxygen species  
RPMI médium - Roswell Park Memorial Institute médium

SDS – PAGE - Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis

SR-A - scavenger receptor - A

SREC 1 - scavenger receptor expressed by endothelial cells 1

TAP - Transporter associated with antigen processing

TLR - Toll-like receptor

TNF  $\alpha$  - tumor necrosis factor  $\alpha$

TOPO – cloning using DNA topoisomerase I

UV – ultraviolet

V-ATPáza – vakuolární ATP-áza

VLP - virus-like particles

# 10 Publikace autora

## Původní a souborné práce související s tématem

- 1) **Zachova K.**, Krupka M., Raska M. (2015) Antigen cross-presentation and heat shock protein-based vaccines. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. přijato do tisku **IF 3.14**
- 2) Krupka M., **Zachova K.**, Cahlikova R., Vrbkova J., Novak Z., Sebla M., Weigl E., Raska M. (2015) Endotoxin-minimized HIV-1 p24 fused to murine hsp70 activates dendritic cells, facilitates endocytosis and p24-specific Th1 response in mice. *Immunology Letters* 166(1): pp.36-44 **IF 2.367**
- 3) **Zachova K.**, Krupka M., Chamrad I., Belakova J., Horynova M., Weigl E., Šebela M., Raska M. (2009) Novel modification of growth medium enables efficient E. coli expression and simple purification of an endotoxin-free recombinant murine hsp70 protein. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 19(7) pp.727-730 **IF 2.062**

## Abstrakta prezentací související s tématem – hlavní autor

- 1) **Zachová K.**, Krupka M., Raska M. (2010) Construction of recombinant plasmids for prokaryote and mammalian expression of HIV-1 p24-hsp70 fusion proteins as novel HIV-1 vaccine candidates. *The Student Scientific Conference on GMO*, p.92.
- 2) **Zachová K.**, Krupka M., Běláková J., Horynová M., Raška M. (2009) Příprava fúzních antigenů vyvolávajících specifickou buněčnou imunitní odpověď. XXI. biochemický sjezd České společnosti pro biochemii a molekulární biologii a Slovenské společnosti pre biochémiu a molekulárnu biológiu, p.55.

## Abstrakta prezentací související s tématem – spoluautor

- 1) Raska M., Krupka M. **Zachova K.** (2015) Immunological effects of HIV-1 p24 fusion to murine HSP70 - cellular response-eliciting strategy. *J Vaccines Vaccin* 6(3), p.76.
- 2) Krupka M, **Zachova K.**, Czernekova L, Weigl E, Raska M (2011) Fúze antigenu p24 viru HIV s autologním Heat shock proteinem 70 výrazně zvyšuje jeho imunogenitu na vyšším modelu. *Chem. Listy* 105, p.404.
- 3) Krupka M, **Zachova K.**, Czernekova L, Weigl E, Raska M (2011) Fusion of HIV-1 p24 Antigen with Autologous Heat Shock Protein 70 Increase Markedly Immunogenicity in Immunized Mice. 15th International Congress of Mucosal Immunology, p.166.

- 4) Krupka M., **Zachova K.**, Czernekova L., Weigl E., Raska M. (2010) Immunization of mice with HIV-1 p24 antigen fused on its N- or C-terminus with autologous Hsp70 induces p24-specific antibodies, whose isotype is affected by the orientation of both fusion partners. *The Student Scientific Conference on GMO*, p.108.
- 5) Krupka M., **Zachova K.**, Bari L., Horynova M., Weigl E., Raska M. (2009) Hsp70 - p24 fusion DNA vaccines as a new candidates for HIV vaccines. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 28 (6), p.181. **IF 2.723**
- 6) Raska M., **Zachova K.** (2008) HSP and HSP-gag fusion proteins as tool for increasing immune responses. Munanovac Meeting, Lyon, France 8 – 9th December (oral presentation).

### **Přednášky související s tématem**

- 1) Raska M., Krupka M., **Zachova K.** (2015) Immunological effects of HIV-1 p24 fusion to murine HSP70 - cellular response-eliciting strategy. 6th Euro Global Summit and Expo on Vaccines & Vaccination August 17-19, 2015 Birmingham, West Midlands, UK
- 2) **Zachova K.**, Raska M. (2008) Příprava rekombinantního myšního hsp70 pro vakcinační účely. *Konference vědeckých prací studentů DSP 2008 Abstrakta Olomouc*.
- 3) **Zachová K.**, Raška M. (2009) Význam heat shock proteinů při MHC I a MHC II prezentaci exogenních antigenů. Semináře Ústavu imunologie LF UP a FN Olomouc, České imunologické společnosti a České společnosti pro alergologii a klinickou imunologii.

### **Původní a souborné práce přímo nesouvisející s tématem – hlavní autor**

- 1) **Kolaříková K.**, Galuszka P., Sedlarova I., Sebela M., Frebort I. (2007) Functional expression of amine oxidase from *Aspergillus niger* (AO-I) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology reports* 36(1) pp.13-20 **IF 0.829**

### **Původní a souborné práce přímo nesouvisející s tématem – spoluautor**

- 1) Raska M., Czernekova L., Moldoveanu Z., **Zachova K.**, Elliott M.C., Novak Z., Hall S., Hoelscher M., Maboko L., Brown R., Smith P.D. ., Mestecky J., Novak J. (2014) Differential glycosylation of envelope gp120 is associated with differential recognition of HIV-1 by virus-specific antibodies and cell infection. *AIDS Research and Therapy* 11: pp:23 **IF 1.84**
- 2) Raska M., Kasperova A., Krupka M., Raskova Kafkova L., Stuchlova Horynova M., **Zachova K.** (2013) Imunologické vyšetřovací metody pro studenty LF UP Olomouc. Skriptum. Univerzita Palackého v Olomouci.

- 3) Krupka M., Masek J., Bartheldyova E., Knötigova P., Plockova J., Korvasova Z., Skrabalova M., Koudelka S., Kulich P., **Zachova K.**, Czernekova L., Strouhal O., Horynova M., Sebela M., Ledvina M., Miller A.D., Raska M., Turanek J. (2012) Enhancement of immune response towards non-lipidised *Borrelia burgdorferi* recombinant OspC antigen by binding onto the surface of metallochelating nanoliposomes with entrapped lipophilic derivatives of norAbuMDP. *J Control Release*. 160(2) pp.374-81 **IF 6.499**
- 4) Krupka M., **Zachova K.**, Weigl E., Raska M. (2011) Prevention of Lyme disease: promising research or Sisyphean task? *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 59 pp.261–275 **IF 2.3**
- 5) Masek J, Bartheldyova E, Turanek-Knotigová P, Skrabalová M, Korvasova Z, Plocková J, Koudelka S, Skodová P, Kulich P, Krupka M, **Zachova K**, Czernekova L, Horynova M, Kratochvílová I, Miller AD, Zýka D, Michálek J, Vrbková J, Sebela M, Ledvina M, Raska M, Turanek J. (2011) Metallochelating liposomes with associated lipophilised norAbuMDP as biocompatible platform for construction of vaccines with recombinant His-tagged antigens: Preparation, structural study and immune response towards rHsp90. *J Control Release*. 151(2) pp.193-201 **IF 5.9**
- 6) Raska M, Takahashi K, Czernekova L, **Zachova K**, Hall S, Moldoveanu Z, Elliot MC, Wilson L, Brown R, Jancova D, Barnes S, Vrbkova J, Tomana M, Smith PD, Mestecky J, Renfrow MB, Novak J. (2010) Glycosylation patterns of HIV-1 gp120 depend on the type of expressing cells and affect antibody recognition. *J Biol Chem*. 285(27) pp.20860-20869 **IF 5.3**
- 7) Raska M, Elliott MC, Hall S, Czernekova L, **Zachova K.**, Moldoveanu Z, Brown R, Mestecky J, Novak J (2010) HIV-1 gp120 glycosylation is cell type-specific and influences reactivity with HIV-1-specific antibodies. In Centennial Retrovirus Meeting Daniel R, Hejnar J, Skalka AM, Svoboda J. (eds) Medimond international proceedings, Bologna pp.56-60.

### **Abstrakta prezentací nesouvisející s tématem – spoluautor**

- 1) Laube A., Raska M., Wei Q., Knoppova B., Hall S., **Zachova K.**, Huang Z-Q., Moldoveanu Z., Novak J., Renfrow M. (2015) Glycosylation Patterns on HIV-1 Envelope Glycoprotein and Its Structural Implications. Abstracts of 63RD ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, May 31 - June 4, St. Louis, USA.
- 2) Czernekova L., Raska M., Moldoveanu Z., **Zachova K.**, Hall S., Badalova D., Krcmarska A., Synkova H., Hoelscher M., Maboko L., Brown R., Novak Z., Mestecky J., Novak J. (2014) Differential glycosylation of envelope gp120 affects reactivity with HIV-1 specific antibodies. *BMC Infectious Diseases* 14(Suppl 2), p.68.

- 3) Stuchlova-Horynova M., Takahashi K., **Zachova K.**, Kasperova A., Mestecky J.F., Novak J., Raska M. (2012) DNA Vaccination with Plasmids Encoding Different Human Glycosyltransferases Induces High Titers of Specific Serum Antibodies in Mice. *J Am Soc Nephrol* 23, p.854A.
- 4) Raska M., Moldoveanu Z., Czernekova L., **Zachova K.**, Elliott M., Hall S., Vrbkova J., Hoelscher M., Maboko L., Brown R., Mestecky J., Novak J. (2011) Differential Glycosylation of gp120 Affects the Recognition by Specific Antibodies and HIV-1 Infectivity. 15th International Congress of Mucosal Immunology, Paris, France, 5th-9th July (poster).
- 5) Raska M., **Zachova K.**, Czernekova L., Moldoveanu Z., Weigl E., Mestecky J., Novak J. (2010) Glykosylace antigenu a imunitní odpověď. *Alergie* 12 Suppl. 1, p.36.
- 6) Raska M., Hall S., Czernekova L., **Zachova K.**, Moldoveanu Z., Brown R., Elliott M.C., Mestecky J., Novak J. (2010) The reactivity of antibodies from sera of HIV-1-positive patients with gp120 antigen is affected by differential N-glycosylation in different cell lines used for gp120 production. 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan, 22nd-27th August (poster).
- 7) Raska M., Hall S., Elliott M.C., Czernekova L., **Zachova K.**, Moldoveanu Z., Brown R., Mestecky J., Novak J. (2010) HIV-1 gp120 glycosylation depends on the producing cell type and influences HIV-1-specific antibodies reactivity. Centennial Retrovirus Meeting, Prague, 29th Apr - 4th May (poster).

### **Přednášky nesouvisející s tématem**

- 1) **Zachova K.**, Jančová D., Hall S., Novak J., Raska M. (2009) Studium diferenciální glykosylace gp120 proteinu a jejího vlivu na reaktivitu specifických protilátek v sérech pacientů infikovaných virem HIV-1. *Konference vědeckých prací studentů DSP 2009 Abstrakta Olomouc*, p.70.
- 2) Křupka M., Běláková J., Horynová M., **Zachová K.**, Weigl E., Raška M. (2009) Využití molekulárních adjuvans pro DNA vakcinaci. 17. Severočeská imunologická konference Ústí nad Labem, Czech republic.

## 11 Seznam použité literatury

1. Raska, M., et al., *Comparison of protective effect of protein and DNA vaccines hsp90 in murine model of systemic candidiasis*. Folia Microbiol (Praha), 2005. **50**(1): p. 77-82.
2. Ritossa, F., *Discovery of the heat shock response*. Cell Stress Chaperones, 1996. **1**(2): p. 97-8.
3. Feder, M.E. and G.E. Hofmann, *Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology*. Annu Rev Physiol, 1999. **61**: p. 243-82.
4. Tamura, Y., et al., *Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock protein preparations*. Science, 1997. **278**(5335): p. 117-20.
5. Suto, R. and P.K. Srivastava, *A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides*. Science, 1995. **269**(5230): p. 1585-8.
6. Srivastava, P.K., *Endo-beta-D-glucuronidase (heparanase) activity of heat-shock protein/tumour rejection antigen gp96*. Biochem J, 1994. **301** ( Pt 3): p. 919.
7. Srivastava, P.K. and R.J. Amato, *Heat shock proteins: the 'Swiss Army Knife' vaccines against cancers and infectious agents*. Vaccine, 2001. **19**(17-19): p. 2590-2597.
8. Srivastava, P., *Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity*. Nature Reviews Immunology, 2002. **2**(3): p. 185-194.
9. Srivastava, P.K., *Immunotherapy for human cancer using heat shock protein-peptide complexes*. Curr Oncol Rep, 2005. **7**(2): p. 104-8.
10. Li, Z. and P.K. Srivastava, *Tumor rejection antigen gp96/grp94 is an ATPase: implications for protein folding and antigen presentation*. EMBO J, 1993. **12**(8): p. 3143-51.
11. Basu, S. and P.K. Srivastava, *Calreticulin, a peptide-binding chaperone of the endoplasmic reticulum, elicits tumor- and peptide-specific immunity*. Journal of Experimental Medicine, 1999. **189**(5): p. 797-802.
12. Srivastava, P.K. and M.R. Das, *THE SEROLOGICALLY UNIQUE CELL-SURFACE ANTIGEN OF ZAJDELA ASCITIC HEPATOMA IS ALSO ITS TUMOR-ASSOCIATED TRANSPLANTATION ANTIGEN*. International Journal of Cancer, 1984. **33**(3): p. 417-422.
13. Srivastava, P.K., A.B. Deleo, and L.J. Old, *TUMOR REJECTION ANTIGENS OF CHEMICALLY-INDUCED SARCOMAS OF INBRED MICE*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1986. **83**(10): p. 3407-3411.
14. Udono, H. and P.K. Srivastava, *Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity*. J Exp Med, 1993. **178**(4): p. 1391-6.
15. Wang, X.Y., et al., *Characterization of heat shock protein 110 and glucose-regulated protein 170 as cancer vaccines and the effect of fever-range hyperthermia on vaccine activity*. Journal of Immunology, 2001. **166**(1): p. 490-497.
16. Ullrich, S.J., et al., *A mouse tumor-specific transplantation antigen is a heat shock-related protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(10): p. 3121-5.
17. Suzue, K., et al., *Heat shock fusion proteins as vehicles for antigen delivery into the major histocompatibility complex class I presentation pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(24): p. 13146-51.



18. SenGupta, D., et al., *Heat shock protein-mediated cross-presentation of exogenous HIV antigen on HLA class I and class II*. J Immunol, 2004. **173**(3): p. 1987-93.
19. Arnold-Schild, D., et al., *Cutting edge: receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells*. J Immunol, 1999. **162**(7): p. 3757-60.
20. Delneste, Y., *Scavenger receptors and heat-shock protein-mediated antigen cross-presentation*. Biochem Soc Trans, 2004. **32**(Pt 4): p. 633-5.
21. Tobian, A.A., et al., *Bacterial heat shock proteins promote CD91-dependent class I MHC cross-presentation of chaperoned peptide to CD8+ T cells by cytosolic mechanisms in dendritic cells versus vacuolar mechanisms in macrophages*. J Immunol, 2004. **172**(9): p. 5277-86.
22. Murshid, A., et al., *Investigating receptors for extracellular heat shock proteins*. Methods Mol Biol, 2011. **787**: p. 289-302.
23. Chen, K., et al., *Mycobacterial heat shock protein 65 enhances antigen cross-presentation in dendritic cells independent of Toll-like receptor 4 signaling*. J Leukoc Biol, 2004. **75**(2): p. 260-6.
24. Zanin-Zhorov, A., et al., *T cells respond to heat shock protein 60 via TLR2: activation of adhesion and inhibition of chemokine receptors*. FASEB J, 2003. **17**(11): p. 1567-9.
25. Calderwood, S.K., S.S. Mambula, and P.J. Gray, Jr., *Extracellular heat shock proteins in cell signaling and immunity*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1113**: p. 28-39.
26. Panjwani, N.N., L. Popova, and P.K. Srivastava, *Activation of Nitric Oxide production in gp96-stimulated antigen presenting cells*. Cell Stress & Chaperones, 2000. **5**(4): p. 391-392.
27. Calderwood, S.K., et al., *Cell surface receptors for molecular chaperones*. Methods, 2007. **43**(3): p. 199-206.
28. Singh-Jasuja, H., et al., *The heat shock protein gp96: a receptor-targeted cross-priming carrier and activator of dendritic cells*. Cell Stress Chaperones, 2000. **5**(5): p. 462-70.
29. Basu, S., et al., *Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway*. International Immunology, 2000. **12**(11): p. 1539-1546.
30. Millar, D.G., et al., *Hsp70 promotes antigen-presenting cell function and converts T-cell tolerance to autoimmunity in vivo*. Nature Medicine, 2003. **9**(12): p. 1469-1476.
31. Singh-Jasuja, H., et al., *The heat shock protein gp96 induces maturation of dendritic cells and down-regulation of its receptor*. European Journal of Immunology, 2000. **30**(8): p. 2211-2215.
32. Zheng, H., et al., *Cell surface targeting of heat shock protein gp96 induces dendritic cell maturation and antitumor immunity*. Journal of Immunology, 2001. **167**(12): p. 6731-6735.
33. Binder, R.J., R. Vatner, and P. Srivastava, *The heat-shock protein receptors: some answers and more questions*. Tissue Antigens, 2004. **64**(4): p. 442-51.
34. Todryk, S., et al., *Heat shock protein 70 induced during tumor cell killing induces Th1 cytokines and targets immature dendritic cell precursors to enhance antigen uptake*. J Immunol, 1999. **163**(3): p. 1398-408.
35. Wallin, R.P., et al., *Heat-shock proteins as activators of the innate immune system*. Trends Immunol, 2002. **23**(3): p. 130-5.
36. Ohashi, K., et al., *Heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex*. Journal of Immunology, 2000. **164**(2): p. 558-561.

37. Gao, B. and M.F. Tsan, *Endotoxin contamination in recombinant human heat shock protein 70 (Hsp70) preparation is responsible for the induction of tumor necrosis factor alpha release by murine macrophages*. J Biol Chem, 2003. **278**(1): p. 174-9.
38. Ye, Z. and Y.H. Gan, *Flagellin contamination of recombinant heat shock protein 70 is responsible for its activity on T cells*. J Biol Chem, 2007. **282**(7): p. 4479-84.
39. Belli, F., et al., *Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous tumor-derived heat shock protein gp96-peptide complexes: clinical and immunologic findings*. J Clin Oncol, 2002. **20**(20): p. 4169-80.
40. Pilla, L., et al., *A phase II trial of vaccination with autologous, tumor-derived heat-shock protein peptide complexes Gp96, in combination with GM-CSF and interferon-alpha in metastatic melanoma patients*. Cancer Immunol Immunother, 2006. **55**(8): p. 958-68.
41. Lichtenfels, R., et al., *Heat shock protein expression and anti-heat shock protein reactivity in renal cell carcinoma*. Proteomics, 2002. **2**(5): p. 561-70.
42. Wood, C., et al., *An adjuvant autologous therapeutic vaccine (HSPPC-96; vitespen) versus observation alone for patients at high risk of recurrence after nephrectomy for renal cell carcinoma: a multicentre, open-label, randomised phase III trial*. Lancet, 2008. **372**(9633): p. 145-54.
43. Mazzaferro, V., et al., *Vaccination with autologous tumor-derived heat-shock protein gp96 after liver resection for metastatic colorectal cancer*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(9): p. 3235-45.
44. Michils, A., et al., *Peripheral blood mononuclear cell proliferation to heat shock protein-70 derived from autologous lung carcinoma*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. **166**(5): p. 749-53.
45. Matsumoto, H., et al., *p53 proteins accumulated by heat stress associate with heat shock proteins HSP72/HSC73 in human glioblastoma cell lines*. Cancer Lett, 1994. **87**(1): p. 39-46.
46. Zhu, X., et al., *Tumor antigen delivered by Salmonella III secretion protein fused with heat shock protein 70 induces protection and eradication against murine melanoma*. Cancer Sci, 2010. **101**(12): p. 2621-8.
47. Susumu, S., et al., *Cross-presentation of NY-ESO-1 cytotoxic T lymphocyte epitope fused to human heat shock cognate protein 70 by dendritic cells*. Cancer Sci, 2008. **99**(1): p. 107-12.
48. Ma, J.H., et al., *Heat shock protein 70/MAGE-3 fusion protein vaccine can enhance cellular and humoral immune responses to MAGE-3 in vivo*. Cancer Immunol Immunother, 2005. **54**(9): p. 907-14.
49. Wang, L., et al., *A Mage3/Heat Shock Protein70 DNA vaccine induces both innate and adaptive immune responses for the antitumor activity*. Vaccine, 2009. **28**(2): p. 561-70.
50. Haseltine, W.A., *Molecular biology of the human immunodeficiency virus type 1*. FASEB J, 1991. **5**(10): p. 2349-60.
51. Vlasuk, G.P., et al., *Purification and characterization of human immunodeficiency virus (HIV) core precursor (p55) expressed in Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 1989. **264**(20): p. 12106-12.
52. Peters, B.S., *The basis for HIV immunotherapeutic vaccines*. Vaccine, 2001. **20**(5-6): p. 688-705.
53. McMichael, A.J., et al., *The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(1): p. 11-23.

54. Seth, N., et al., *Expansion and contraction of HIV-specific CD4 T cells with short bursts of viremia, but physical loss of the majority of these cells with sustained viral replication.* J Immunol, 2005. **175**(10): p. 6948-58.
55. Ayash-Rashkovsky, M., et al., *Generation of Th1 immune responses to inactivated, gp120-depleted HIV-1 in mice with a dominant Th2 biased immune profile via immunostimulatory [correction of imunostimulatory] oligonucleotides--relevance to AIDS vaccines in developing countries.* Vaccine, 2002. **20**(21-22): p. 2684-92.
56. Pajot, A., et al., *The Th1 immune response against HIV-1 Gag p24-derived peptides in mice expressing HLA-A02.01 and HLA-DR1.* Eur J Immunol, 2007. **37**(9): p. 2635-44.
57. Donayre-Torres, A.J., et al., *Production and purification of immunologically active core protein p24 from HIV-1 fused to ricin toxin B subunit in E. coli.* Virol J, 2009. **6**: p. 17.
58. Valentinis, B., et al., *Human recombinant heat shock protein 70 affects the maturation pathways of dendritic cells in vitro and has an in vivo adjuvant activity.* J Leukoc Biol, 2008. **84**(1): p. 199-206.
59. Suzue, K. and R.A. Young, *Adjuvant-free hsp70 fusion protein system elicits humoral and cellular immune responses to HIV-1 p24.* J Immunol, 1996. **156**(2): p. 873-9.
60. Banerjee, G., et al., *Role of keratinocytes in antigen presentation and polarization of human T lymphocytes.* Scand J Immunol, 2004. **59**(4): p. 385-94.
61. Haque, A., et al., *Invariant chain modulates HLA class II protein recycling and peptide presentation in nonprofessional antigen presenting cells.* Cell Immunol, 2007. **249**(1): p. 20-9.
62. Limmer, A., et al., *Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance.* Nat Med, 2000. **6**(12): p. 1348-54.
63. Tsunawaki, S., et al., *Possible function of salivary gland epithelial cells as nonprofessional antigen-presenting cells in the development of Sjogren's syndrome.* J Rheumatol, 2002. **29**(9): p. 1884-96.
64. Alexandropoulos, K. and N.M. Danzl, *Thymic epithelial cells: antigen presenting cells that regulate T cell repertoire and tolerance development.* Immunol Res, 2012. **54**(1-3): p. 177-90.
65. Mulder, D.J., et al., *Antigen presentation and MHC class II expression by human esophageal epithelial cells: role in eosinophilic esophagitis.* Am J Pathol, 2011. **178**(2): p. 744-53.
66. Corbiere, V., et al., *Phenotypic characteristics of human type II alveolar epithelial cells suitable for antigen presentation to T lymphocytes.* Respir Res, 2011. **12**: p. 15.
67. Reynoso, E.D. and S.J. Turley, *Unconventional antigen-presenting cells in the induction of peripheral CD8(+) T cell tolerance.* J Leukoc Biol, 2009. **86**(4): p. 795-801.
68. Beers, C., et al., *Cathepsin S controls MHC class II-mediated antigen presentation by epithelial cells in vivo.* J Immunol, 2005. **174**(3): p. 1205-12.
69. Londei, M., et al., *Epithelial cells expressing aberrant MHC class II determinants can present antigen to cloned human T cells.* Nature, 1984. **312**(5995): p. 639-41.
70. Buning, J., et al., *Antigen targeting to MHC class II-enriched late endosomes in colonic epithelial cells: trafficking of luminal antigens studied in vivo in Crohn's colitis patients.* FASEB J, 2006. **20**(2): p. 359-61.
71. Murphy, K., et al., *Janeway's immunobiology.* 8th ed. 2012, New York: Garland Science. xix, 868 p.
72. Cresswell, P., et al., *The nature of the MHC class I peptide loading complex.* Immunol Rev, 1999. **172**: p. 21-8.

73. Bevan, M.J., *Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay.* J Exp Med, 1976. **143**(5): p. 1283-8.
74. Sigal, L.J., et al., *Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen.* Nature, 1999. **398**(6722): p. 77-80.
75. Huang, A.Y., et al., *Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens.* Science, 1994. **264**(5161): p. 961-5.
76. Savina, A., et al., *The small GTPase Rac2 controls phagosomal alkalization and antigen crosspresentation selectively in CD8(+) dendritic cells.* Immunity, 2009. **30**(4): p. 544-55.
77. Delamarre, L., et al., *Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate.* Science, 2005. **307**(5715): p. 1630-4.
78. Trombetta, E.S., et al., *Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation.* Science, 2003. **299**(5611): p. 1400-3.
79. Macpherson, A.J. and T. Uhr, *Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria.* Science, 2004. **303**(5664): p. 1662-1665.
80. Iyoda, T., et al., *The CD8(+) dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo.* Journal of Experimental Medicine, 2002. **195**(10): p. 1289-1302.
81. Scheinecker, C., et al., *Constitutive presentation of a natural tissue autoantigen exclusively by dendritic cells in the draining lymph node.* Journal of Experimental Medicine, 2002. **196**(8): p. 1079-1090.
82. Yates, R.M., et al., *Macrophage activation downregulates the degradative capacity of the phagosome.* Traffic, 2007. **8**(3): p. 241-250.
83. Lukacs, G.L., O.D. Rotstein, and S. Grinstein, *PHAGOSOMAL ACIDIFICATION IS MEDIATED BY A VACUOLAR-TYPE H<sup>+</sup>-ATPASE IN MURINE MACROPHAGES.* Journal of Biological Chemistry, 1990. **265**(34): p. 21099-21107.
84. Jiang, Q., et al., *Intraphagosomal chlorination dynamics and yields determined using unique fluorescent bacterial mimics.* Chemical Research in Toxicology, 1997. **10**(10): p. 1080-1089.
85. Reeves, E.P., et al., *Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K<sup>+</sup> flux.* Nature, 2002. **416**(6878): p. 291-297.
86. Jankowski, A., C.C. Scott, and S. Grinstein, *Determinants of the phagosomal pH in neutrophils.* J Biol Chem, 2002. **277**(8): p. 6059-66.
87. DeCoursey, T.E., et al., *The gp91phox component of NADPH oxidase is not the voltage-gated proton channel in phagocytes, but it helps.* J Biol Chem, 2001. **276**(39): p. 36063-6.
88. Nanda, A., J.T. Curnutte, and S. Grinstein, *Activation of H<sup>+</sup> conductance in neutrophils requires assembly of components of the respiratory burst oxidase but not its redox function.* J Clin Invest, 1994. **93**(4): p. 1770-5.
89. Decoursey, T.E., *Voltage-gated proton channels and other proton transfer pathways.* Physiol Rev, 2003. **83**(2): p. 475-579.
90. Mantegazza, A.R., et al., *NADPH oxidase controls phagosomal pH and antigen cross-presentation in human dendritic cells.* Blood, 2008. **112**(12): p. 4712-22.
91. Savina, A., et al., *NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells.* Cell, 2006. **126**(1): p. 205-18.
92. Savina, A., et al., *Measuring pH, ROS production, maturation, and degradation in dendritic cell phagosomes using cytofluorometry-based assays.* Methods Mol Biol, 2010. **595**: p. 383-402.

93. Bond, S. and M. Forgac, *The Ras/cAMP/protein kinase A pathway regulates glucose-dependent assembly of the vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPase in yeast*. J Biol Chem, 2008. **283**(52): p. 36513-21.
94. Gromme, M., et al., *Recycling MHC class I molecules and endosomal peptide loading*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(18): p. 10326-31.
95. Barysch, S.V., et al., *Sorting in early endosomes reveals connections to docking- and fusion-associated factors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(24): p. 9697-702.
96. Win, S.J., et al., *Cross-presentation of epitopes on virus-like particles via the MHC I receptor recycling pathway*. Immunol Cell Biol, 2011. **89**(6): p. 681-8.
97. Segura, E., et al., *Different cross-presentation pathways in steady-state and inflammatory dendritic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(48): p. 20377-81.
98. Moron, V.G., et al., *In vivo, dendritic cells can cross-present virus-like particles using an endosome-to-cytosol pathway*. J Immunol, 2003. **171**(5): p. 2242-50.
99. Wiertz, E.J., et al., *Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction*. Nature, 1996. **384**(6608): p. 432-8.
100. Glickman, M.H. and A. Ciechanover, *The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction*. Physiol Rev, 2002. **82**(2): p. 373-428.
101. Driscoll, J. and A.L. Goldberg, *The proteasome (multicatalytic protease) is a component of the 1500-kDa proteolytic complex which degrades ubiquitin-conjugated proteins*. J Biol Chem, 1990. **265**(9): p. 4789-92.
102. Huang, A.Y., et al., *In vivo cross-priming of MHC class I-restricted antigens requires the TAP transporter*. Immunity, 1996. **4**(4): p. 349-55.
103. Serwold, T., et al., *ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum*. Nature, 2002. **419**(6906): p. 480-483.
104. Serwold, T., S. Gaw, and N. Shastri, *ER aminopeptidases generate a unique pool of peptides for MHC class I molecules*. Nature Immunology, 2001. **2**(7): p. 644-651.
105. Kovacsovics-Bankowski, M. and K.L. Rock, *A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules*. Science, 1995. **267**(5195): p. 243-6.
106. Norbury, C.C., et al., *Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble antigen by bone marrow-derived dendritic cells*. Eur J Immunol, 1997. **27**(1): p. 280-8.
107. Svensson, M. and M.J. Wick, *Classical MHC class I peptide presentation of a bacterial fusion protein by bone marrow-derived dendritic cells*. Eur J Immunol, 1999. **29**(1): p. 180-8.
108. Stober, D., et al., *Dendritic cells pulsed with exogenous hepatitis B surface antigen particles efficiently present epitopes to MHC class I-restricted cytotoxic T cells*. Eur J Immunol, 2002. **32**(4): p. 1099-108.
109. Shen, L., et al., *Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crosspresentation in vivo*. Immunity, 2004. **21**(2): p. 155-65.
110. Song, R. and C.V. Harding, *Roles of proteasomes, transporter for antigen presentation (TAP), and beta 2-microglobulin in the processing of bacterial or particulate antigens via an alternate class I MHC processing pathway*. J Immunol, 1996. **156**(11): p. 4182-90.
111. Wick, M.J. and J.D. Pfeifer, *Major histocompatibility complex class I presentation of ovalbumin peptide 257-264 from exogenous sources: protein context influences the degree of TAP-independent presentation*. Eur J Immunol, 1996. **26**(11): p. 2790-9.
112. Campbell, D.J., T. Serwold, and N. Shastri, *Bacterial proteins can be processed by macrophages in a transporter associated with antigen processing-independent,*

- cysteine protease-dependent manner for presentation by MHC class I molecules.* Journal of Immunology, 2000. **164**(1): p. 168-175.
113. Ruedl, C., et al., *Cross-presentation of virus-like particles by skin-derived CD8(-) dendritic cells: A dispensable role for TAP.* European Journal of Immunology, 2002. **32**(3): p. 818-825.
  114. Bachmann, M.F., et al., *TAP1-Independent Loading of Class-I Molecules by Exogenous Viral-Proteins.* European Journal of Immunology, 1995. **25**(6): p. 1739-1743.
  115. Chen, L.Y. and M. Jondal, *Alternative processing for MHC class I presentation by immature and CpG-activated dendritic cells.* European Journal of Immunology, 2004. **34**(4): p. 952-960.
  116. Rock, K.L. and L. Shen, *Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance.* Immunol Rev, 2005. **207**: p. 166-83.
  117. Shi, G.P., et al., *Molecular cloning and expression of human alveolar macrophage cathepsin S, an elastinolytic cysteine protease.* J Biol Chem, 1992. **267**(11): p. 7258-62.
  118. Weimershaus, M., et al., *Conventional dendritic cells require IRAP-Rab14 endosomes for efficient cross-presentation.* J Immunol, 2012. **188**(4): p. 1840-6.
  119. Guermonprez, P. and S. Amigorena, *Pathways for antigen cross presentation.* Springer Semin Immunopathol, 2005. **26**(3): p. 257-71.
  120. Chen, L. and M. Jondal, *Brefeldin A inhibits vesicular MHC class I processing in resting but not in CpG- and disruption-activated DC.* Mol Immunol, 2008. **46**(1): p. 158-65.
  121. Ackerman, A.L., et al., *Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(22): p. 12889-12894.
  122. Guermonprez, P., et al., *ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells.* Nature, 2003. **425**(6956): p. 397-402.
  123. Houde, M., et al., *Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation.* Nature, 2003. **425**(6956): p. 402-6.
  124. Mukai, Y., et al., *Induction of endoplasmic reticulum-endosome fusion for antigen cross-presentation induced by poly (gamma-glutamic acid) nanoparticles.* J Immunol, 2011. **187**(12): p. 6249-55.
  125. Basha, G., et al., *A CD74-dependent MHC class I endolysosomal cross-presentation pathway.* Nat Immunol, 2012. **13**(3): p. 237-45.
  126. Touret, N., et al., *Quantitative and dynamic assessment of the contribution of the ER to phagosome formation.* Cell, 2005. **123**(1): p. 157-70.
  127. Suh, W.K., et al., *Interaction of MHC class I molecules with the transporter associated with antigen processing.* Science, 1994. **264**(5163): p. 1322-6.
  128. Handel, A., et al., *Gap junction-mediated antigen transport in immune responses.* Trends Immunol, 2007. **28**(11): p. 463-6.
  129. Pang, B., et al., *Direct antigen presentation and gap junction mediated cross-presentation during apoptosis.* J Immunol, 2009. **183**(2): p. 1083-90.
  130. Neijssen, J., et al., *Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions.* Nature, 2005. **434**(7029): p. 83-8.
  131. Mendoza-Naranjo, A., et al., *Functional gap junctions facilitate melanoma antigen transfer and cross-presentation between human dendritic cells.* J Immunol, 2007. **178**(11): p. 6949-57.

132. Saccheri, F., et al., *Bacteria-induced gap junctions in tumors favor antigen cross-presentation and antitumor immunity*. Sci Transl Med, 2010. **2**(44): p. 44ra57.
133. Schreckenberger, C. and A.M. Kaufmann, *Vaccination strategies for the treatment and prevention of cervical cancer*. Curr Opin Oncol, 2004. **16**(5): p. 485-91.
134. Mizukami, S., et al., *Differential MyD88/IRAK4 requirements for cross-priming and tumor rejection induced by heat shock protein 70-model antigen fusion protein*. Cancer Sci, 2012. **103**(5): p. 851-9.
135. Baykov, A.A., O.A. Evtushenko, and S.M. Avaeva, *A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay*. Anal Biochem, 1988. **171**(2): p. 266-70.
136. Geladopoulos, T.P., T.G. Sotiroudis, and A.E. Evangelopoulos, *A malachite green colorimetric assay for protein phosphatase activity*. Anal Biochem, 1991. **192**(1): p. 112-6.
137. Nadeau, K., et al., *83-kilodalton heat shock proteins of trypanosomes are potent peptide-stimulated ATPases*. Protein Sci, 1992. **1**(8): p. 970-9.
138. Aida, Y. and M.J. Pabst, *Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114*. J Immunol Methods, 1990. **132**(2): p. 191-5.
139. Raska, M., et al., *Delivery of DNA HIV-1 vaccine to the liver induces high and long-lasting humoral immune responses*. Vaccine, 2008. **26**(12): p. 1541-51.
140. Inaba, K., et al., *Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor*. J Exp Med, 1992. **176**(6): p. 1693-702.
141. Nadeau, K., A. Das, and C.T. Walsh, *Hsp90 chaperonins possess ATPase activity and bind heat shock transcription factors and peptidyl prolyl isomerases*. J Biol Chem, 1993. **268**(2): p. 1479-87.
142. Lopez-Buesa, P., C. Pfund, and E.A. Craig, *The biochemical properties of the ATPase activity of a 70-kDa heat shock protein (Hsp70) are governed by the C-terminal domains*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(26): p. 15253-8.
143. Ha, J.H. and D.B. McKay, *ATPase kinetics of recombinant bovine 70 kDa heat shock cognate protein and its amino-terminal ATPase domain*. Biochemistry, 1994. **33**(48): p. 14625-35.
144. Bojak, A., et al., *Impact of codon usage modification on T cell immunogenicity and longevity of HIV-1 gag-specific DNA vaccines*. Intervirology, 2002. **45**(4-6): p. 275-86.
145. Olson, C.L., et al., *Molecular and biochemical comparison of the 70-kDa heat shock proteins of Trypanosoma cruzi*. J Biol Chem, 1994. **269**(5): p. 3868-74.
146. Han, K.G., S.S. Lee, and C. Kang, *Soluble expression of cloned phage K11 RNA polymerase gene in Escherichia coli at a low temperature*. Protein Expr Purif, 1999. **16**(1): p. 103-8.
147. Voulgaridou, G.P., et al., *Efficient E. coli expression strategies for production of soluble human crystallin ALDH3A1*. PLoS One, 2013. **8**(2): p. e56582.
148. Bendz, H., et al., *Calcium signaling in dendritic cells by human or mycobacterial Hsp70 is caused by contamination and is not required for Hsp70-mediated enhancement of cross-presentation*. J Biol Chem, 2008. **283**(39): p. 26477-83.
149. Marincek, B.C., et al., *Heat shock protein-antigen fusions lose their enhanced immunostimulatory capacity after endotoxin depletion*. Mol Immunol, 2008. **46**(1): p. 181-91.
150. Krupka, M., et al., *Enhancement of immune response towards non-lipidized Borrelia burgdorferi recombinant OspC antigen by binding onto the surface of*

- metallochelating nanoliposomes with entrapped lipophilic derivatives of norAbuMDP*. J Control Release, 2012. **160**(2): p. 374-81.
151. Masek, J., et al., *Metallochelating liposomes with associated lipophilised norAbuMDP as biocompatible platform for construction of vaccines with recombinant His-tagged antigens: preparation, structural study and immune response towards rHsp90*. J Control Release, 2011. **151**(2): p. 193-201.
  152. Bagley, K.C., et al., *Pasteurella multocida toxin activates human monocyte-derived and murine bone marrow-derived dendritic cells in vitro but suppresses antibody production in vivo*. Infect Immun, 2005. **73**(1): p. 413-21.
  153. Bhattacharya, P., et al., *GM-CSF-induced, bone-marrow-derived dendritic cells can expand natural Tregs and induce adaptive Tregs by different mechanisms*. J Leukoc Biol, 2011. **89**(2): p. 235-49.
  154. Anzinger, J.J., et al., *Murine bone marrow-derived macrophages differentiated with GM-CSF become foam cells by PI3Kgamma-dependent fluid-phase pinocytosis of native LDL*. J Lipid Res, 2012. **53**(1): p. 34-42.
  155. Lacey, D.C., et al., *Defining GM-CSF- and macrophage-CSF-dependent macrophage responses by in vitro models*. J Immunol, 2012. **188**(11): p. 5752-65.
  156. Wei, Y., et al., *Coxiella burnetii antigen-stimulated dendritic cells mediated protection against Coxiella burnetii in BALB/c mice*. J Infect Dis, 2011. **203**(2): p. 283-91.
  157. Schneider, A.G., et al., *Toxoplasma gondii triggers phosphorylation and nuclear translocation of dendritic cell STAT1 while simultaneously blocking IFNgamma-induced STAT1 transcriptional activity*. PLoS One, 2013. **8**(3): p. e60215.
  158. Kim, J.S. and C. Jobin, *The flavonoid luteolin prevents lipopolysaccharide-induced NF-kappaB signalling and gene expression by blocking IkappaB kinase activity in intestinal epithelial cells and bone-marrow derived dendritic cells*. Immunology, 2005. **115**(3): p. 375-87.
  159. Janelsins, B.M., et al., *Proinflammatory tachykinins that signal through the neurokinin 1 receptor promote survival of dendritic cells and potent cellular immunity*. Blood, 2009. **113**(13): p. 3017-26.
  160. Wilson, J.M., et al., *The A2B adenosine receptor impairs the maturation and immunogenicity of dendritic cells*. J Immunol, 2009. **182**(8): p. 4616-23.
  161. Nikulina, M., et al., *Wheat gluten causes dendritic cell maturation and chemokine secretion*. J Immunol, 2004. **173**(3): p. 1925-33.
  162. Udono, H., et al., *Hsp-antigen fusion and their use for immunization*. Methods, 2004. **32**(1): p. 21-4.
  163. Bausinger, H., et al., *Endotoxin-free heat-shock protein 70 fails to induce APC activation*. European Journal of Immunology, 2002. **32**(12): p. 3708-3713.
  164. Gao, B. and M.F. Tsan, *Induction of cytokines by heat shock proteins and endotoxin in murine macrophages*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **317**(4): p. 1149-54.



## 12 Přílohy