

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2021

Bc. Denisa Štanclová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Analýza buněčných procesů v antigen prezentujících
buňkách při podání rekombinantního antigenu *in vitro***

Diplomová práce

Bc. Denisa Štanclová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2021

Vedoucí práce: Mgr. Kateřina Zachová, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Denisa ŠTANCOVÁ
Osobní číslo: R190069
Studijní program: N1501 Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Téma práce: Analýza buněčných procesů v antigen prezentujících buňkách při podání rekombinantního antigenu in vitro
Zadávající katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

Teoretická část: 1) Souhrnný přehled možností prezentace antigenu – MHC I, MHC II, zkřížená – prezentace. 2) Princip působení anti-virových a anti-tumorových vakcín, efektivita, navození CTL imunitní odpovědi. 3) Podrobný vhled do problematiky CRISPER-CAas9 technologií, jejich benefity v porovnáním s siRNA, využití v imunologii.

Experimentální část: 1) Charakteristika prezentace antigenu v myších antigen prezentujících buňkách. a) Příprava medií pro savčí buňky, práce při sterilních podmínkách, kultivace savčích buněk. b) Stanovení exprese aktivačních a diferenciačních markerů dendritických buněk (DC) po pulsaci rekombinantním antigenem. c) Analýza cesty zkřížené prezentace použitím sady inhibitorů buněčného zpracování antigenu. 2) Příprava TAP1- a MHCI-knock-out klonů dendritických buněk. d) Příprava knock-outových linií TAP- a MHCI- pomocí CRISPER-Cas9 systému a jejich charakterizace. e) Funkční analýzy pomocí průtokové cytometrie a konfokální mikroskopie. f) Zpracování získaných dat v programech FlowJo, ImageJ, GraphPad.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

- 1) Křupka M., Zachová K., Cahlíková R., Vrbková J., Novák Z., Šebela M., Weigl E., Raška 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, 36-44.
- 2) Zachová K., Křupka M., Raška M. (2016): Antigen Cross-Presentation and Heat Shock Protein-Based Vaccines. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 64, 1-18.
- 3) Bartheldyová E., Knotigova P. T., Zachová K., Mašek J., Kulich P., Effenberg R., Zyka D., Hubatka F., Kotouček J., Čelechovská H., Hléžová R., Tomečková A., Mašková E., Fojtíková M., Macaulay S., Bystrický P., Paulovičová L., Paulovičová E., Drož L., Ledvína M., Raška M., Turánek J. (2019): N-Oxy lipid-based click chemistry for orthogonal coupling of mannan onto nanoliposomes prepared by microfluidic mixing: Synthesis of lipids, characterisation of mannan-coated nanoliposomes and in vitro stimulation of dendritic cells. *Carbohydrate polymers*, 207, 521-532.
- 4) Hashemi A. (2018): CRISPR-Cas system as a genome engineering platform: Applications in biomedicine and biotechnology. *Current gene therapy*, 18, 115-124.
- 5) Ratan Z. A., Son Y. J., Haidere M. F., Uddin B. M. M., Yusuf M. A., Zaman S. B., Kim J. H., Banu L. A., Cho J. Y. (2018): CRISPR-Cas9: a promising genetic engineering approach in cancer research. *Therapeutic advances in medical oncology*, 10, 1758834018755089.
- 6) Adli M. (2018): The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nature communications*, 9, 1911.

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Kateřina Zachová, Ph.D.
Ústav imunologie

Datum zadání diplomové práce: 12. října 2019
Termín odevzdání diplomové práce: 31. července 2021

UNIVERSITA PALACKÉHO
Zachová
Břevčická 4, 775 15 Olomouc
Tel. 585 437231
E-mail: zachova@upol.cz

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

01-11-2019

V Olomouci dne 8. listopadu 2018

Bibliografická identifikace

| | |
|-------------------------|--|
| Jméno a příjmení autora | Bc. Denisa Štanclová |
| Název práce | Analyza buněčných procesů v antigen prezentujících buňkách při podání rekombinantního antigenu <i>in vitro</i> |
| Typ práce | Diplomová |
| Pracoviště | Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci |
| Vedoucí práce | Mgr. Kateřina Zachová, Ph.D. |
| Rok obhajoby práce | 2021 |

Abstrakt

Antigen prezentující buňky tvoří důležitou součást imunitního systému. Vyznačují se schopností prezentovat antigeny buňkám adaptivního imunitního systému. Za hlavní APC jsou považovány dendritické buňky (DC). Ty totiž disponují nejen schopností vázat exogenní antigen klasicky na MHCII molekuly, ale i zkříženě prezentovat tento antigen na MHCI molekulách. DC jsou takto schopny zprostředkovat nejen CD4⁺ T-lymfocytární odpověď, ale i cytotoxickou CD8⁺ T-lymfocytární imunitní odpověď, která hraje zásadní roli při virových infekcích nebo nádorových onemocnění. Cílem diplomové práce bylo analyzovat cestu prezentace RBD domény spike proteinu (RBDS) izolovaného z koronaviru SARS-CoV-2. Studie byla realizována na buňkách cDC1 MutuDC ošetřených sadou inhibitorů zkřížené prezentace. Tyto buňky byly poté pulzovány rekombinantním proteinem RBDS. Výsledky buněčné odezvy byly analyzovány metodou spektrální průtokové cytometrie, pomocí níž byla sledována změna exprese aktivačních a diferenciačních markerů. Výsledky experimentu ukázaly, že protein RBDS může být prezentován nejen klasickou cestou, ale také cestou zkříženou.

CRISPR/Cas9 je prokaryotický adaptivní imunitní systém, který zajišťuje rezistenci vůči bakteriofágům či plazmidům. Systém umožňuje prostřednictvím nukleázy Cas9 a vodící sgRNA indukovat vypnutí, zapnutí nebo záměnu genu za jiný. V diplomové práci byla technika CRISPR/Cas9 použita k přípravě knock-outované buněčné linie cDC1 MutuDC pro gen *TAP1* a *B2M*. Pro účely experimentu byla u buněk optimalizována transfekční metoda nukleofekce pomocí elektroporačního programu D-032 a U-001. Nejvhodnějším programem pro transfekci buněk MutuDC je U-001. Experimentální práce se také zabývala přípravě CRISPR/Cas9 vektoru pro knock-out manózoový receptor MRC1 exprimovaného na povrchu DC za použití technik molekulárního klonování. Pro vnesení genu *MRC1* kódujícího protein Cas9 byl použit vektor pX458 nesoucí gen pro rezistenci k ampicilinu. Přítomnost inzerty ve vektoru pX458 byla úspěšně ověřena restriční analýzou. Takto upravené buněčné linie mohou sloužit jako efektivní nástroj studia prezentace antigenů.

| | |
|---------------|---|
| Klíčová slova | Dendritické buňky, hlavní histokompatibilní komplex, rekombinantní protein, CRISPR/Cas9, průtoková cytometrie |
| Počet stran | 81 |
| Počet příloh | 0 |
| Jazyk | Český |

Bibliographical identification

| | |
|---------------------------------|--|
| Author's first name and surname | Bc. Denisa Štanclová |
| Title | Analysis of cellular processes in antigen presenting cells by recombinant protein pulsing in vitro |
| Type of thesis | Master |
| Department | Department of cell biology and genetics, Faculty of Science, Palacký University Olomouc |
| Supervisor | Mgr. Kateřina Zachová, Ph.D. |
| The year of presentation | 2021 |

Abstract

Antigen-presenting cells are an important part of the immune system. Their main function is to present antigens to cells of the adaptive immune system. Dendritic cells (DCs) are regarded as the main APCs. These have not only the ability to bind exogenous antigen classically to MHCII molecules but also to cross-present this antigen on MHCI molecules. DCs are thus able to mediate not only the CD4⁺ T-lymphocyte immune response but also the cytotoxic CD8⁺ T-lymphocyte immune response against viral infections or cancer cells. The main aim of the thesis was to analyse the pathway of cross-presentation of the RBD domain of spike protein (RBDS) isolated from the coronavirus SARS-CoV-2. For experiments, cDC1 MutuDC cells treated with a set of cross-presentation inhibitors, were used. These cells were then pulsed with recombinant RBDS protein. The results of the cellular response were analysed by spectral flow cytometry method for monitoring the change in the expression of activation and differentiation markers. The results of experiments prove that the RBDS protein can be presented not only by the classical pathway but also by the process of cross-presentation.

CRISPR/Cas9 is a prokaryotic adaptive immune system that provides resistance to bacteriophages or plasmids. The system makes it possible to induce to switch-off, switch-on or exchange of a gene by means of the Cas9 nuclease and the sgRNA. The CRISPR/Cas9 method was used to prepare a knock-out cell line cDC1 MutuDC for the *TAP1* and *B2M* genes in this diploma. The transfection method of nucleofection was optimized in the cells using the electroporation program D-032 and U-001. The most suitable program for transfection of MutuDC cells is U-001. The experimental work was also devoted to the preparation of a CRISPR/Cas9 vector for the knock-out mannose receptor MRC1 expressed on the surface of DCs using molecular cloning techniques. The pX458 vector carrying the ampicillin resistance gene was used to introduce the *MRC1* gene encoding the Cas9 protein. The presence of the insert in the pX458 vector was successfully verified by restriction analysis. Such modified cell lines could serve as a perfect tool for antigen presentation studies.

| | |
|----------------------|---|
| Keywords | Dendritic cells, major histocompatibility complex, recombinant protein, CRISPR/Cas9, flow cytometry |
| Number of pages | 81 |
| Number of appendices | 0 |
| Language | Czech |

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Kateřiny Zachové, Ph.D. s využitím literárních zdrojů, které jsou uvedeny v závěru této práce.

V Olomouci dne

.....

Denisa Štanclová

Ráda bych chtěla poděkovat své vedoucí diplomové práce Mgr. Kateřině Zachové, Ph.D. za odborné vedení, ochotu, pomoc a cenné rady při řešení dané problematiky. Poděkování také patří Ústavu imunologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci za milý přístup a možnost využití jejich laboratoří. V neposlední řadě bych chtěla také poděkovat své rodině za podporu po celou dobu mého studia.

OBSAH

| | | |
|---------|--|----|
| 1 | ÚVOD | 1 |
| 2 | CÍLE PRÁCE | 2 |
| 3 | SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY | 3 |
| 3.1 | Imunitní systém | 3 |
| 3.1.1 | Vrozená imunita | 3 |
| 3.1.2 | Získaná imunita | 3 |
| 3.2 | Hlavní histokompatibilní komplex | 4 |
| 3.2.1 | Struktura MHC glykoproteinů | 4 |
| 3.3 | Antigen prezentující buňky | 5 |
| 3.3.1 | Dendritické buňky | 6 |
| 3.4 | T-lymfocyty | 7 |
| 3.5 | Imunitní odpověď založená na cytotoxických T-lymfocytech | 8 |
| 3.6 | Apoptóza..... | 9 |
| 3.7 | Cesty prezentace antigenu | 9 |
| 3.7.1 | Prezentace antigenu MHC glykoproteiny třídy I | 9 |
| 3.7.2 | Prezentace antigenu MHC glykoproteiny třídy II | 10 |
| 3.7.3 | Zkřížená prezentace antigenu | 11 |
| 3.7.4 | Zkřížená prezentace antigenu populacemi DC..... | 12 |
| 3.7.5 | Cesty zkřížené prezentace antigenu | 13 |
| 3.7.5.1 | Dráha endozom-cytosol | 13 |
| 3.7.5.2 | Dráha endozom-cytosol-endozom | 14 |
| 3.7.5.3 | Vakuolární dráha..... | 15 |
| 3.7.5.4 | Dráha pomocí „Gap junction“ | 16 |
| 3.8 | Inhibitory zkřížené prezentace antigenu | 17 |
| 3.9 | Virus SARS-CoV-2 | 20 |
| 3.9.1 | Genom viru SARS-CoV-2 | 20 |
| 3.9.2 | Patogeneze a imunita u Covid-19..... | 21 |
| 3.9.3 | Vakcína proti SARS-CoV-2..... | 22 |
| 3.10 | Systém CRISPR/Cas | 23 |
| 3.10.1 | Charakteristika CRISPR..... | 23 |
| 3.10.2 | CRISPR/Cas9 | 24 |
| 3.10.3 | Využití CRISPR/Cas9 technologie | 25 |

| | | |
|----------|--|----|
| 3.11 | CRISPR/Cas vs RNAi..... | 26 |
| 3.12 | Průtoková cytometrie | 27 |
| 4 | MATERIÁL A METODY | 29 |
| 4.1 | Materiál..... | 29 |
| 4.1.1 | Biologický materiál | 29 |
| 4.1.2 | Chemikálie | 29 |
| 4.1.3 | Komerční soupravy | 31 |
| 4.1.4 | Roztoky, pufry, média..... | 31 |
| 4.1.5 | Přístroje a zařízení..... | 32 |
| 4.1.6 | Počítačový software a programy | 33 |
| 4.2 | Použité experimentální a vyhodnocovací postupy | 34 |
| 4.2.1 | Příprava CRISPR/Cas9 vektoru pro knock-out manózoového receptoru MRC1 | 34 |
| 4.2.1.1 | Primery..... | 34 |
| 4.2.1.2 | Komplementární spojení oligonukleotidových párů..... | 34 |
| 4.2.1.3 | Ligace do vektoru pX458..... | 35 |
| 4.2.1.4 | pSpCas9(BB)-2A-GFP (pX458) vektor..... | 35 |
| 4.2.1.5 | Transformace kompetentních buněk <i>E. coli</i> | 36 |
| 4.2.1.6 | Kontrolní PCR | 36 |
| 4.2.1.7 | Izolace plazmidové DNA..... | 37 |
| 4.2.1.8 | Stanovení koncentrace a čistoty plazmidové DNA | 38 |
| 4.2.1.9 | Restrikční analýza..... | 38 |
| 4.2.1.10 | Horizontální agarózová elektroforéza..... | 40 |
| 4.2.2 | Příprava rekombinantního proteinu RBDS | 40 |
| 4.2.2.1 | Expese a purifikace proteinu | 40 |
| 4.2.2.2 | Zakoncentrování proteinu | 41 |
| 4.2.2.3 | SDS-PAGE | 41 |
| 4.2.2.4 | Stanovení koncentrace proteinu metodou BCA..... | 42 |
| 4.2.2.5 | Stanovení koncentrace metodou denzitometrie proužků na gelu pro SDS-PAGE | 43 |
| 4.2.3 | Práce se savčími liniemi | 44 |
| 4.2.3.1 | Rozmražení buněčné linie..... | 44 |
| 4.2.3.2 | Pasážování buněčné linie | 44 |
| 4.2.3.3 | Počítání buněk..... | 44 |
| 4.2.3.4 | Transfekce buněk cDC1 MutuDC | 45 |

| | | |
|---------|---|----|
| 4.2.3.5 | Barvení transfekovaných buněk..... | 46 |
| 4.2.4 | Analýza imunitní odpovědi buněčné linie cDC1 MutuDC | 47 |
| 4.2.4.1 | Pulzace buněk sadou inhibitorů buněčného zpracování antigenu a rekombinantním proteinem RBDS..... | 47 |
| 4.2.4.2 | Průtoková cytometrie | 47 |
| 4.2.4.3 | Nastavení knihovny s fluorochromy | 48 |
| 4.2.4.4 | Analýza dat | 48 |
| 5 | VÝSLEDKY | 49 |
| 5.1 | Příprava CRISPR/Cas9 vektoru pro knock-out manózoový receptor | 49 |
| 5.2 | Purifikace proteinu RBDS | 51 |
| 5.2.1 | Stanovení koncentrace proteinu | 52 |
| 5.3 | Práce se savčími liniemi | 56 |
| 5.3.1 | Transfekce buněk cDC1 MutuDC | 57 |
| 5.4 | Analýza imunitní odpovědi buněk cDC1 MutuDC | 59 |
| 5.4.1 | Stanovení aktivace MutuDC pulzovaných proteinem RBDS | 59 |
| 5.4.2 | Analýza cesty zkřížené prezentace proteinu RBDS | 62 |
| 6 | DISKUZE..... | 68 |
| 7 | ZÁVĚR..... | 73 |
| 8 | LITERATURA..... | 75 |

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

| | |
|--------------------|---|
| 2-APB | 2-aminoethoxydifenyl borát |
| A/B | akrylamid-N,N' methylenbisakrylamid |
| ACE2 | angiotenzin konvertující enzym 2 |
| APC | antigen prezentující buňka (z angl. antigen presenting cell) |
| B2M | β_2 -mikroglobulin |
| BCA | kyselina bicinchoninová (z angl. bicinchoninic acid) |
| BfA | brefeldin A |
| BSA | bovinní sérový albumin |
| Cas | CRISPR asociovaný protein |
| CatS | catepsin S |
| CLIP | peptid invariantního řetězce asociovaný s třídou II (z angl. class II-associated invariant chain peptide) |
| Covid-19 | koronavirové onemocnění 19 (z angl. coronavirus disease 2019) |
| CRISPR | segmenty pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetit (z angl. clustered regularly interspaced short palindromic repeats) |
| crRNA | CRISPR RNA |
| ČE | časný endozom |
| DC | dendritická buňka (z angl. dendritic cell) |
| ddH ₂ O | deionizovaná voda |
| DMA | 5(N,N-Dimethyl)amilorid hydrochlorid |
| ER | endoplazmatické retikulum |
| ERAP | aminopeptidáza endoplazmatického retikula (angl. endoplasmatic reticulum aminopeptidase) |
| ExoA | exotoxin A |
| FBS | fetální bovinní sérum |
| FVD | Fixable Viability Dye |
| GA | Golgiho aparát |
| GFP | zelený fluorescenční protein (z angl. green fluorescent protein) |
| HLA | lidské leukocytární antigeny (z angl. human leukocyte antigen) |
| Ii | invariantní řetězec |
| IMDM | médium Iscove's Modified Dulbecco's |

| | |
|----------------|---|
| IRAP | inzulinem regulovaná aminopeptidáza (z angl. insulin-regulated aminopeptidase) |
| LB médium | Luria- Bertani médium |
| LPS | lipopolysacharid |
| MHC | hlavní histokompatibilní komplex (z angl. major histocompatibility complex) |
| miRNA | mikroRNA |
| mRNA | mediátorová RNA |
| NK | přirození zabíječi (z angl. natural killers) |
| PAM | protospacer sousední motiv (z angl. protospacer adjacent motif) |
| PBS | fosfátový pufr |
| pre-crRNA | prekurzorová crRNA |
| RBD | doména vázající receptor (z angl. receptor-binding domain) |
| RNAi | RNA interference |
| SDS | dodecylsírán sodný |
| SDS-PAGE | elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného (z angl. sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis) |
| sgRNA | jednovláknová vodící RNA (z angl. single guide RNA) |
| siRNA | krátká interferující RNA (z angl. short interfering RNA) |
| SOC médium | super optimální médium s potlačením katabolitů (z angl. super optimal broth with catabolite repression) |
| TAE pufr | Tris-acetát-EDTA pufr |
| TAP | transportér spojený se zpracováním antigenu (z angl. transporter associated with antigen processing) |
| T _C | cytotoxický T-lymfocyt (z angl. cytotoxic T lymphocyte) |
| TCR | T-buněčný receptor (z angl. T-cell receptore) |
| TEMED | N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin |
| T _H | pomocný T-lymfocyt (z angl. helper T lymphocyte) |
| tracrRNA | transaktivační crRNA |

SEZNAM OBRÁZKŮ

| | |
|--|----|
| Obrázek 1 Struktura MHC glykoproteinů..... | 5 |
| Obrázek 2 Stimulace T-lymfocytu..... | 8 |
| Obrázek 3 Prezentace antigenu pomocí MHCI molekul. | 10 |
| Obrázek 4 Prezentace antigenu pomocí MHCII molekul. | 11 |
| Obrázek 5 Zkřížená prezentace antigenu dráhou endozom-cytosol. | 14 |
| Obrázek 6 Zkřížená prezentace antigenu dráhou endozom-cytosol-endozom. | 15 |
| Obrázek 7 Zkřížená prezentace antigenu vakuolární dráhou..... | 16 |
| Obrázek 8 Zkřížená prezentace antigenu dráhou „Gap junction“..... | 17 |
| Obrázek 9 Inhibitory zkřížené prezentace antigenu..... | 19 |
| Obrázek 10 Mechanismus systému CRISPR/Cas..... | 25 |
| Obrázek 11 Schématické znázornění vektoru pX458..... | 36 |
| Obrázek 12 Restrikční místa endonukleáz (<i>SacI</i> , <i>PstI</i> , <i>EcoRV</i> , <i>XbaI</i>) ve vektoru pX458. | 39 |
| Obrázek 13 Ověření přítomnosti DNA inzertu ve vektoru pX458 pomocí PCR reakce. | 49 |
| Obrázek 14 Elektroforetogram restrikční analýzy plazmidové DNA..... | 51 |
| Obrázek 15 Purifikace proteinu RBDS pomocí Ni-NTA afinitní chromatografie. | 52 |
| Obrázek 16 Kalibrační křivka BSA s rovnicí lineární regrese pro výpočet koncentrace proteinu RBDS metodou BCA. | 53 |
| Obrázek 17 Denzitometrické stanovení koncentrace proteinu RBDS po SDS-PAGE separaci..... | 54 |
| Obrázek 18 Kalibrační křivka BSA s rovnicí lineární regrese pro stanovení koncentrace proteinu RBDS v závislosti na intenzitě gelových proužků..... | 55 |
| Obrázek 19 Fluorescenční mikroskopie adherentní buněčné linie cDC1 MutuDC konstitutivně exprimující GFP..... | 56 |
| Obrázek 20 Analýza účinnosti transfekce buněk cDC1 MutuDC pomocí průtokové cytometrie..... | 58 |
| Obrázek 21 Stanovení živých a mrtvých buněk cDC1 MutuDC pomocí průtokové cytometrie..... | 59 |
| Obrázek 22 Analýza viability buněk cDC1 MutuDC po transfekci pMax-GFP, pX458-TAP1 a pX458-B2M s programem D-032 a U-001. | 59 |
| Obrázek 23 Expres markerů CD11c a CD40 při pulzaci buněk cDC1 MutuDC rekombinantním proteinem RBDS..... | 60 |
| Obrázek 24 Expres markerů MHCI a MHCII při pulzaci buněk cDC1 MutuDC rekombinantním proteinem RBDS..... | 61 |

| | |
|--|----|
| Obrázek 25 Exprese markerů CD80 a CD86 při pulzaci buněk cDC1 MutuDC rekombinantním proteinem RBDS. | 62 |
| Obrázek 26 Exprese markeru CD11c při pulzaci buněk cDC1 MutuDC sadou inhibitorů buněčného zpracování antigenu a rekombinantním proteinem RBDS. | 63 |
| Obrázek 27 Exprese markeru CD40 při pulzaci buněk cDC1 MutuDC sadou inhibitorů buněčného zpracování antigenu a rekombinantním proteinem RBDS. | 64 |
| Obrázek 28 Exprese markeru MHCI při pulzaci buněk cDC1 MutuDC sadou inhibitorů buněčného zpracování antigenu a rekombinantním proteinem RBDS. | 64 |
| Obrázek 29 Exprese markeru MHCII při pulzaci buněk cDC1 MutuDC sadou inhibitorů buněčného zpracování antigenu a rekombinantním proteinem RBDS. | 65 |
| Obrázek 30 Exprese markeru CD80 při pulzaci buněk cDC1 MutuDC sadou inhibitorů buněčného zpracování antigenu a rekombinantním proteinem RBDS. | 65 |
| Obrázek 31 Exprese markeru CD86 při pulzaci buněk cDC1 MutuDC sadou inhibitorů buněčného zpracování antigenu a rekombinantním proteinem RBDS. | 66 |
| Obrázek 32 Souhrnný přehled působení inhibitorů buněčného zpracování antigenu na expresi markerů u buněk cDC1 MutuDC. | 67 |

SEZNAM TABULEK

| | |
|--|----|
| Tabulka 1 Vybraná cílová sekvence genu <i>MRC1</i> | 34 |
| Tabulka 2 Sekvence DNA oligonukleotidů pro tvorbu sgRNA. | 34 |
| Tabulka 3 Složení reakční směsi pro komplementární spojení DNA oligonukleotidů. | 35 |
| Tabulka 4 Složení reakční směsi pro ligaci oligonukleotidů do vektoru pX458. | 35 |
| Tabulka 5 Nukleotidové sekvence použitých primerů pro kontrolní PCR. | 37 |
| Tabulka 6 Složení PCR reakční směsi pro ověření přítomnosti DNA inzertu ve vektoru pX458. | 37 |
| Tabulka 7 Podmínky PCR reakce. | 37 |
| Tabulka 8 Obecné složení restrikční směsi pro ověření přítomnosti DNA inzertu ve vektoru pX458. | 39 |
| Tabulka 9 Přehled použitých restrikčních endonukleáz a pufrů pro restrikční analýzu plazmidové DNA za účelem ověření přítomnosti DNA inzertu ve vektoru pX458. | 39 |
| Tabulka 10 Složení 2% a 0,7% agarózového gelu pro horizontální elektroforézu. | 40 |
| Tabulka 11 Složení 10% separačního a 4% zaostřovacího gelu pro SDS-PAGE. | 42 |
| Tabulka 12 Příprava standardních roztoků BSA. | 43 |
| Tabulka 13 Příprava vzorků zakoncentrovaného proteinu RBDS pro jeho kvantifikaci BCA metodou. | 43 |
| Tabulka 14 Složení transfekční směsi pro transfekci buněčné linie cDC1 MutuDC s elektroporačním programem D-032. | 46 |
| Tabulka 15 Složení transfekční směsi pro transfekci buněčné linie cDC1 MutuDC s elektroporačním programem U-001. | 46 |
| Tabulka 16 Množství inhibitorů buněčného zpracování antigenu, rekombinantního proteinu RBDS a LPS použitých k pulzaci buněk cDC1 MutuDC. | 47 |
| Tabulka 17 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty plazmidové DNA izolované z bakteriální suspenze <i>E. coli</i> | 50 |
| Tabulka 18 Velikost očekávaných fragmentů plazmidové DNA po štěpení restrikčními enzymy. | 50 |
| Tabulka 19 Naměřené absorpance standardu BSA při vlnové délce 562 nm. | 52 |
| Tabulka 20 Intenzita gelových proužků standardu BSA. | 54 |

1 ÚVOD

Antigen prezentující buňky (APC) představují spojovací článek mezi vrozeným a získaným imunitním systémem. Nejúčinnějšími APC jsou zejména dendritické buňky (DC), které se vyznačují schopností rozeznat antigen, internalizovat ho a vzniklé antigenní peptidy spojit s molekulou hlavního histokompatibilního komplexu (MHC). Takto vzniklý komplex MHC-peptid dále prezentují na svém povrchu a tím aktivují příslušnou T-lymfocytární imunitní odpověď (Hořejší *et Bartůňková*, 1998). Bylo prokázáno, že DC jako jediná buněčná populace se účastní i tzv. zkřížené prezentace antigenu, která nachází uplatnění i při konstrukci vakcín (Bevan, 1976). Většina klinicky používaných vakcín obsahuje adjuvans, které stimulují zejména T_H2 typ imunitní odpovědi spojenou s produkcí protilátek. Vzhledem k tomu, že tento typ imunitní odpovědi má omezený účinek proti nádorovým a virovým onemocněním, se výzkum vývoje vakcín snaží navrhnout takovou vakcínu, která by byla schopná stimulovat antigen-specifickou $CD8^+$ T-lymfocytární odpověď včetně cytotoxických T-lymfocytů, které svými cytotoxickými mechanismy eliminují napadené buňky (Hořejší *et Bartůňková*, 1998; Zachová *et al.*, 2016).

V současné době je středem vědeckého zájmu především vývoj účinné vakcíny proti novému typu koronaviru SARS-CoV-2 vyvolávajícího onemocnění Covid-19. Většina vyvíjených vakcín proti Covid-19 cílí na RBD doménu koronavirového spike proteinu (RBDS), který hraje klíčovou roli při vstupu viru do hostitelské buňky (Wang *et al.*, 2020). Doposud jsou schválené vakcíny na bázi mRNA a vakcíny využívající jiný nepatogenní oslabený virus. Nadějná se také zdá být vakcína založená na rekombinantních proteinech získaných vnesením rekombinantní DNA do expresního systému. Rekombinantní proteiny se považují za bezpečnější oproti klasickým vakcínám. Nicméně využití rekombinantních proteinů pro konstrukci vakcín vyžaduje doplnění proteinů o vhodná adjuvans, která zaručí dostatečně imunogenní účinek dané vakcíny (Tregoning *et al.*, 2020; Klika, 2021).

Velmi spolehlivým nástrojem pro úpravu genů se stalo spojení segmentů pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetitiv (CRISPR) a CRISPR-asociované nukleázy 9 (Cas9). Při této technice je Cas9 nukleáza schopná pomocí jednovláknové vodící RNA (sgRNA) štěpit molekulu DNA za vzniku dvouvláknového zlomu. Poškozená vlákna DNA mohou být poté opravnými buněčnými mechanismy opět spojena. Podle způsobu opravy porušeného vlákna pak může docházet k deaktivaci, aktivaci nebo ke změně sekvence genu (Moravec, 2017; Ratan *et al.*, 2018).

2 CÍLE PRÁCE

Teoretická část:

- Zpracovat literární rešerši zaměřenou na charakterizaci možností prezentace antigenu (MHCI, MHCII a zkřížená prezentace), působení anti-virových a anti-tumorových vakcín, popis navození cytotoxické T-lymfocytární imunitní odpovědi, charakterizace CRISPR/Cas9 technologie.

Experimentální část:

- Manipulace s buněčnými kulturami.
- Stanovení exprese aktivačních a diferenciacních markerů dendritických buněk po pulzaci rekombinantním antigenem.
- Analýza cesty zkřížené prezentace použitím sady inhibitorů buněčného zpracování antigenu.
- Příprava knock-outových linií TAP1 a MHCI pomocí CRISPR/Cas9 systému a jejich charakterizace.
- Funkční analýzy pomocí průtokové cytometrie a konfokální mikroskopie.
- Zpracování získaných dat v programech FlowJo, ImageJ, GraphPad.

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 Imunitní systém

Imunitní systém spolu s nervovou a endokrinní soustavou patří mezi homeostatické mechanismy zajišťující integritu a rovnováhu organismu. Jedná se o složitou síť molekul, buněk, tkání a orgánů, které chrání organismus proti patogenním mikroorganismům a jejich toxickým produktům. Rozpoznává a toleruje jak vlastní zdravé buňky, tak cizí neškodné látky z prostředí (např. složky potravin, komensální bakterie ve střevě). Na druhou stranu je imunitní systém schopen eliminovat vlastní zestárlé nebo patologicky změněné buňky. Výše zmíněné molekuly rozpoznané imunitním systémem a zároveň schopné vyvolat imunitní reakci vedoucí k jejich eliminaci se označují jako antigeny. Imunitní systém organismu pro rozpoznávání a odstranění antigenu vyvinul dva imunitní mechanismy: vrozenou (neadaptivní) a získanou (adaptivní) imunitu. Každý typ se dále rozlišuje na buněčnou a humorální složku (Hořejší *et* Bartůňková, 1998).

3.1.1 Vrozená imunita

Vrozená imunita představuje první reakci organismu na přítomnost širokého spektra patogenů a dalších nebezpečných částic. Reakce na přítomnost škodliviny je řádově v minutách až hodinách. Vrozené rozpoznávací mechanismy jsou během života organismu neměnné a nepodléhají žádným modifikacím. Imunitní odpověď na první nebo opakované setkání s antigenem je z hlediska mechanismu, rychlosti a intenzity vždy stejné kvality, proto lze konstatovat, že vrozená imunita nemá imunologickou paměť. Buněčná složka vrozené imunity je tvořena fagocytujícími buňkami (granulocyty, makrofágy, monocyty, dendritické buňky) a přirozeně cytotoxickými buňkami (NK buňky, z angl. natural killers cells). Humorální složka zahrnuje proteiny komplementu, interferony, lektiny a jiné sérové proteiny (Hořejší *et* Bartůňková, 1998).

3.1.2 Získaná imunita

Získaná imunita je sice aktivovaná pomaleji, ale proti patogenům reaguje účinněji a efektivněji. K úplnému rozvoji imunitní reakce je potřeba několik dnů až týdnů. Oproti vrozené imunitě disponuje imunologickou pamětí, kdy při opakovaném setkání se stejným antigenem jsou složky získané imunity schopny zahájit mnohem účinnější reakci než při prvním setkání. Za imunologickou paměť zodpovídají především T-lymfocyty a B-lymfocyty. Zatímco T-lymfocyty jsou součástí buněčné složky získané imunity, B-lymfocyty se podílejí na humorální složce získané imunity, a to tvorbou specifických protilátek. Součástí získané

imunity jsou také antigen prezentující buňky (APC, z angl. antigen-presenting cells) a MHC glykoproteiny, jimž spolu s T-lymfocyty bude převážně věnována pozornost této diplomové práce. Nicméně je důležité připomenout, že imunita zprostředkovaná B-lymfocyty je založena na rozpoznání antigenu pomocí B-buněčného receptoru. Při vazbě antigenu na tento receptor dochází k proliferaci B-lymfocytů na lymfoblasty. Větší část lymfoblastů se diferencuje do efektorových plazmatických buněk, ty produkují protilátky, které navázáním na příslušný antigen napomáhají jeho neutralizaci, nebo pomocí opsonizace dávají signál fagocytům k jeho zneškodnění (Hořejší *et Bartůňková*, 1998).

3.2 Hlavní histokompatibilní komplex

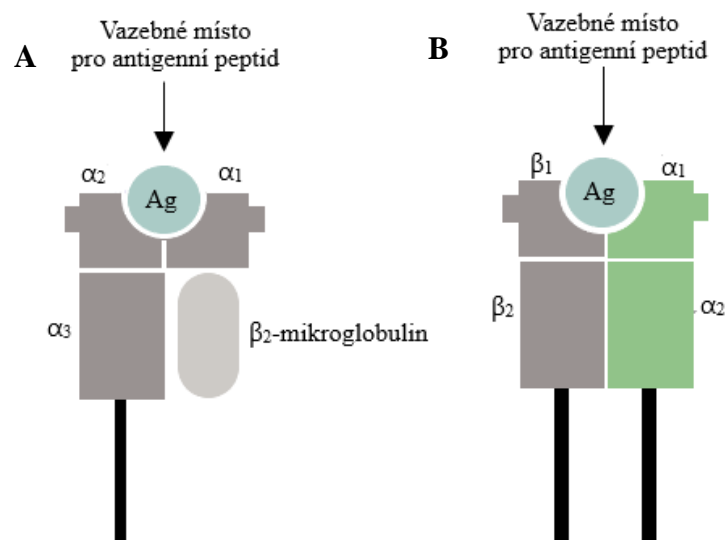
Proteiny hlavního histokompatibilního komplexu (MHC, z angl. major histocompatibility complex) jsou vysoce polymorfní glykoproteiny nacházející se na buněčném povrchu, jejichž hlavní funkcí je prezentovat antigenní peptidy na povrchu buněk imunitního systému pro rozpoznávání T-lymfocyty. Rozlišujeme dvě hlavní třídy molekul MHC. Jedná se o MHC glykoproteiny I. a II. třídy (dále jen MHCI, MHCII) (Wieczorek *et al.*, 2017). Zatímco MHCI molekuly jsou přítomné na všech jaderných buňkách, MHCII molekuly jsou exprimované na APC. MHC se u lidí označuje jako HLA komplex (z angl. human leukocyte antigen) a u myši jako H-2 komplex. MHC je kódován souborem genů, které se u lidí vyskytují na 6. chromozomu a u myši na 17. chromozomu (Murray *et al.*, 2015).

3.2.1 Struktura MHC glykoproteinů

MHCI molekuly jsou heterodimery složené z transmembránového α -řetězce, který je nekovalentně asociován s nepolymorfním β_2 -mikroglobulinem (B2M, z angl. β_2 -microglobulin) (Reche *et al.*, 2003). B2M je nezbytný pro funkční konformaci komplexu MHCI-peptid. V jeho nepřítomnosti nejsou MHCI molekuly správně složeny, a tudíž nejsou ani exprimovány na buněčném povrchu (Arase, 2016). Transmembránový α -řetězec je tvořen doménami α_1 , α_2 a α_3 (Obrázek 1A). Zatímco doména α_3 se váže na membránu, N-terminální domény α_1 a α_2 tvoří vazebné místo pro peptidy. Strany vazebného místa se skládají ze dvou α -helixů překrývajících jeho dno tvořené osmi antiparalelními β -řetězci. Doména α_3 navíc také interaguje s koreceptorem CD8 T-lymfocytů (Reche *et al.*, 2003).

MHCII molekuly jsou také heterodimery sestávající se ze dvou nekovalentně spojených transmembránových řetězců. Jedná se o jeden α -řetězec a jeden β -řetězec, z nichž každý je tvořen ze dvou domén (α_1 , α_2 , β_1 , β_2) (Obrázek 1B). Domény α_2 a β_2 se skládají jako nezávislé domény podobné imunoglobulinové struktuře, zatímco N-terminální domény α_1 a β_1 vytvářejí

vazebné místo pro peptidy se strukturou podobnou vazebnému místu v MHC I molekulách. Domény α_2 a β_2 se kromě toho váží na membránu, přičemž s koreceptorem CD4 T-lymfocytů interaguje pouze doména α_2 (Reche *et al.*, 2003; Apostolopoulos *et al.*, 2008; Hořejší *et Bartůňková*, 2009). Velkým rozdílem mezi molekulami MHC I a MHC II je skutečnost, že vazebné místo pro peptidy je u molekul MHC II na obou koncích otevřené, tudíž mohou vázat peptidy o velikosti 9–22 aminokyselin. Naopak molekuly MHC I mají vazebné místo na obou koncích uzavřené, takže mohou vázat peptidy pouze o velikosti 8–10 aminokyselin (Nielsen *et al.*, 2004).



Obrázek 1 Struktura MHC glykoproteinů. A) MHC I molekuly jsou tvořeny jedním α -řetězcem, který je složen ze tří domén (α_1 , α_2 , α_3) spojených s β_2 -mikroglobulinem. Domény α_1 a α_2 tvoří vazebné místo pro antigení peptid. B) MHC II molekuly jsou složeny z jednoho α -řetězce (α_1 , α_2) a jednoho β -řetězce (β_1 , β_2), přičemž domény α_1 a β_1 vytvářejí vazebné místo pro antigení peptid.

3.3 Antigen prezentující buňky

Jednou z nejdůležitějších funkcí APC je prezentace antigenu buňkám imunitního systému. Existují profesionální a neprofesionální APC. Za neúčinnější profesionální APC jsou považovány dendritické buňky (DC, z angl. dendritic cells), B-lymfocyty a makrofágy/monocyty. Profesionální APC pohlcují z okolí cizorodé částice, které se následně rozloží na krátké peptidové fragmenty a ty jsou poté vázány na molekuly MHC II. Po vazbě jsou fragmenty antigenu prezentovány na povrchu APC pro rozpoznání T-lymfocytů, které zprostředkují příslušnou imunitní odpověď. Neprofesionální APC exprimují na svém povrchu MHC II molekuly pouze za specifických podmínek, nikoliv konstitutivně. Příkladem neprofesionálních APC mohou být fibroblasty, keratinocyty, lidské epiteliální buňky thymu, lidské epiteliální buňky slinných žláz, lidské epiteliální buňky jícnu, lidské epiteliální buňky

alveolů nebo jaterní sinusové endoteliální buňky (Limmer *et al.*, 2000; Tsunawaki *et al.*, 2002; Banerjee *et al.*, 2004; Haque *et al.*, 2007; Corbière *et al.*, 2011; Mulder *et al.*, 2011; Alexandropoulos *et Danzl*, 2012).

3.3.1 Dendritické buňky

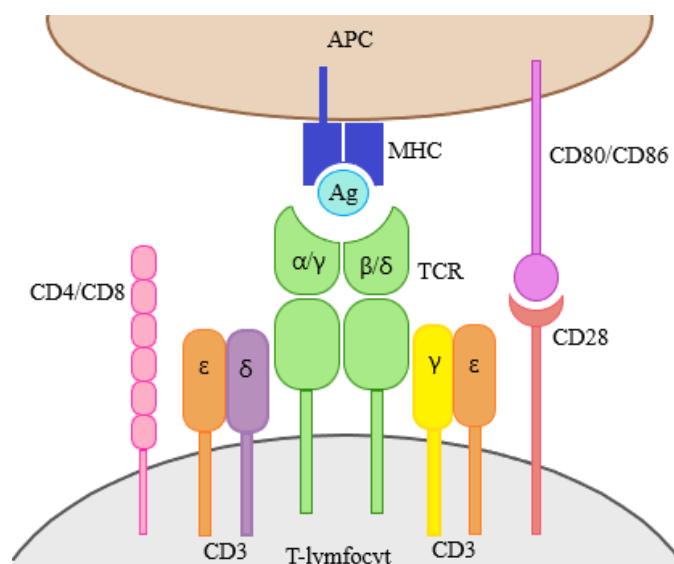
Již bylo zmíněno, že nejvýznamnějšími APC jsou DC, které se spolu s makrofágy a neutrofilů řadí mezi buňky schopné fagocytózy. DC se vyskytují v organismu jak v nezralé, tak ve zralé formě. Nezralé DC jsou přítomny ve většině tkání, které jsou na rozhraní organismu a okolního prostředí, jako je kůže, sliznice dýchacího a zažívacího traktu (Hořejší *et Bartůňková*, 2009). Nezralé DC sice nemají schopnost stimulovat T-lymfocyty, ale vyznačují se vysokou schopností zachycovat a zpracovávat antigen (Cella *et al.*, 1997). Na svém povrchu exprimují CD206 známý také jako manózoový receptor, který patří do superrodiny lektinů typu C. CD206 je membránový protein typu I o velikosti 175 kDa představující spojující článek mezi vrozeným a získaným imunitním systémem. Tento receptor může být také mimo jiné exprimován na povrchu makrofágů, Langerhansových buněk, jaterních nebo lymfatických endoteliálních buněk. Manózoový receptor je schopen rozpoznat řadu mikrobiálních polysacharidů obsahujících manózu, a proto hraje důležitou roli v obraně hostitele proti patogenům (Gazi *et Martinez-Pomares*, 2009). Za zánětlivých podmínek nezralé DC migrují z nelymfoidních tkání (např. kůže, střevní sliznice, játra, tuková tkáň) do lymfatických uzlin a jiných sekundárních lymfatických orgánů (např. slezina, mandle, Peyerovy plaky), ztrácejí schopnost pohlcovat částice z okolí a mění se na účinné APC. Pouze zralé DC aktivují naivní T-lymfocyty (Cella *et al.*, 1997; Hořejší *et Bartůňková*, 2009).

Buněčná populace dendritických buněk jako jediná dokáže paralelně s prezentací antigenu na MHCII molekulách vázat exogenní antigen na MHCI molekuly. Nezralé DC mohou totiž ve fagozomech regulovat pH a tím zabránit následné fúzi s lysozomy, kde by došlo k antigenní proteolýze a následnému navázání na MHCII molekuly. Antigeny jsou po internalizaci v DC vystaveny téměř neutrálnímu pH, oxidačnímu a nízko proteolytickému prostředí. Enzymatický komplex zodpovídající za alkalizaci fagozomů se nazývá NADPH oxidáza 2 (NOX2), což podporuje zkříženou prezentaci antigenu. Díky tomu může být exogenní peptid translokován do cytoplazmy a štěpen v proteazomu (Trombetta *et al.*, 2003; Delamarre *et al.*, 2005; Mantegazza *et al.*, 2008; Savina *et al.*, 2009).

3.4 T-lymfocyty

T-lymfocyty mají velký význam při obraně proti virům a jiným parazitům. Vývoj T-lymfocytů začíná v kostní dřeni ze společného lymfoidního progenitoru. Z něj se diferencují prekursory T-lymfocytů, které poté krví migrují do thymu, kde dozrávají na jednotlivé T-lymfocytární subpopulace. T-lymfocyty se dále rozvíjí v sekundárních lymfatických orgánech, v nichž se naivní T-lymfocyty setkávají s antigenem vystaveným na povrchu APC. Tato interakce aktivuje T-lymfocyty. Ty následně proliferují a přeměňují se v efektorové buňky, které produkují široké spektrum cytokinů ovlivňující procesy proliferace, diferenciace a migrace buněk. Část aktivovaných T-lymfocytů se diferencuje v paměťové buňky, které při dalším setkání se stejným antigenem navozují rychlejší a efektivnější imunitní reakci než při první stimulaci (Hořejší *et* Bartůňková, 1998).

T-lymfocyty rozpoznávají antigeny prostřednictvím svého T-buněčného receptoru (TCR, z angl. T-cell receptore) složeného ze dvou transmembránových řetězců α a β , popřípadě γ a δ . (Hořejší *et* Bartůňková, 1998). TCR není schopen s antigenem reagovat přímo, ale vyžaduje spolupráci s APC (Wieczorek *et al.*, 2017). T-lymfocyty potom reagují na antigen vázaný na MHC molekulách, které jsou právě součástí APC. TCR je nekovalentní vazbou asociován s dalšími molekulami účastnicích se aktivace T-lymfocytů. Jedním z těchto molekul je komplex tří membránových proteinů označovaný jako CD3 (γ , δ , ϵ), který se podílí na přenosu signálu z receptoru do nitra buňky. Na povrchu každého T-lymfocytu se nachází jeden z koreceptorových proteinů (CD4 resp. CD8) tvořící komplex s MHC molekulami. V závislosti na expresi CD4 a CD8 mohou být T-lymfocyty rozděleny do dvou skupin. CD8⁺ T-lymfocyty, prekursory cytotoxických T-lymfocytů (T_C, z angl. cytotoxic T lymphocyte), rozpoznávají antigeny endogenního původu prezentované na povrchu molekul MHCI. Naopak CD4⁺ T-lymfocyty, prekursory pomocných T-lymfocytů (T_H, z angl. helper T lymphocyte), interagují s molekulami MHCII prezentující na svém povrchu antigeny exogenního původu (Reche *et al.*, 2003). Úplná aktivace T-lymfocytů vyžaduje také účast proteinu CD28, ten rozeznává kostimulační molekuly B7 (CD80 a CD86) na povrchu APC (Obrázek 2). Na povrchu aktivovaných T-lymfocytů se navíc vyskytuje protein CD40 ligand (CD40L), který interaguje s CD40 na povrchu APC. Tím se APC aktivují a zvyšují tak expresi kostimulačních molekul B7 (Hořejší *et* Bartůňková, 1998).



Obrázek 2 Stimulace T-lymfocyty. T-buněčný receptor (TCR) tvořený dvěma řetězci (α , β nebo γ , δ) představuje vazebné místo pro antigen (Ag). Součástí TCR je koreceptor CD3 (γ , δ , ϵ), který je důležitý pro přenos signálu dovnitř buňky. Koreceptory CD8 resp. CD4 se váží na molekuly MHC I resp. MHC II na povrchu antigen prezentující buňky (APC). Absolutní aktivace T-lymfocyty potřebuje přítomnost kostimulačního receptoru CD28 schopného rozpoznat kostimulační molekuly CD80 a CD86 na povrchu APC.

3.5 Imunitní odpověď založená na cytotoxických T-lymfocytech

T_C rozeznávají buňky infikované virem nebo jinými intracelulárními patogeny a některé nádorové buňky. Prekurzor T_C musí rozpoznat komplex MHC I-peptid na povrchu APC, které musí být vybavené adhezivními a kostimulačními molekulami (TCR, CD80, CD86, CD28). APC jsou virem infikovány, nebo pohltní příslušné antigeny pocházející z odumřelých infikovaných, nádorových nebo stresových buněk. Pokud prekurzorové T_C rozeznají antigen na povrchu jiných buněk, které nemají stimulační vlastnosti profesionálních APC, dostanou pouze první signál přes TCR a to je utlumí. Když dojde k prvnímu kontaktu na povrchu účinné APC, prekurzor T_C se začne proliferovat a diferenciovat na klon zralých efektorových cytotoxických T-lymfocytů. Efektorové T_C jsou pak roznášeny krví do tkání, kde mohou začít působit. K procesu aktivace T_C také napomáhají T_H produkující cytokiny, které jsou pro proliferaci T_C nezbytné, protože je tyto buňky produkují poměrně málo. Zralé T_C jsou k aktivaci cytotoxických mechanismů stimulovány pouze jedním signálem přes TCR a signál přes CD28 již není nutný. Aktivované T_C prostřednictvím jednoho z cytotoxických mechanismů indukují apoptózu (Hořejší *et Bartůňková*, 1998).

3.6 Apoptóza

Apoptóza neboli programovaná buněčná smrt je fyziologický proces potřebný nejen k zachování homeostázy organismu, ale také ke kontrole velikosti a tvaru tkání v různých vývojových stádiích (Los *et al.*, 1999). Buňky procházejí během apoptózy mnoha morfologickými změnami (Elmore, 2007). Společným rysem všech apoptotických drah je aktivace aspartát-specifických cysteinových proteáz tzv. kaspáz, jejichž hlavní funkcí je štěpit cílové proteiny v místě karboxylové kyseliny na kyselině asparagové. Kaspázy jsou ve většině buněk exprimovány v neaktivní proenzymové formě a po aktivaci mohou často aktivovat další prokaspázy, což umožňuje zahájení proteázové kaskády, ve které iniciační kaspáza aktivuje exekutorové kaspázy a ty štěpí buněčné substráty známé jako tzv. substráty smrti, mezi které patří cytoskeletální proteiny nebo proteiny řídící opravy DNA (Slee *et al.*, 2001; Elmore, 2007).

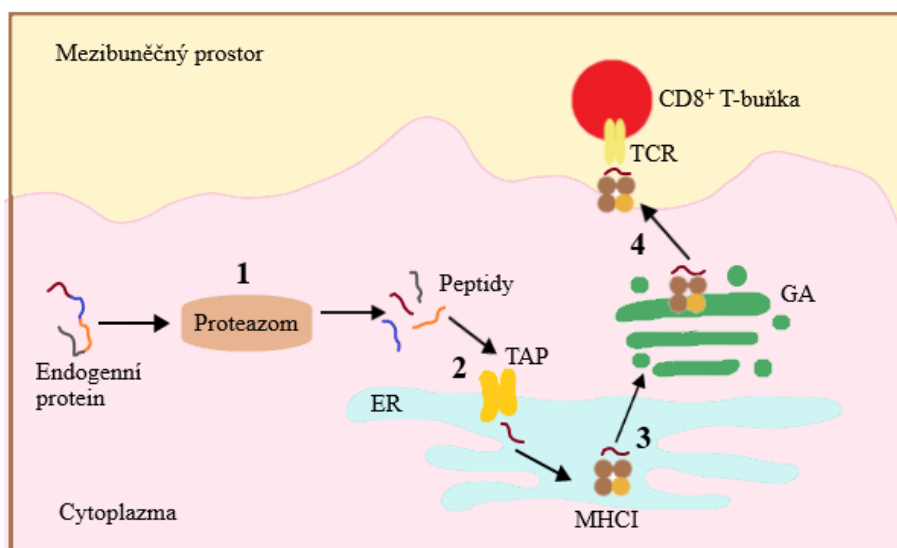
Proces apoptózy může být zahájen buď vnitřní (mitochondriální), nebo vnější (receptorovou) cestou, podle toho odkud signál přišel. Do skupiny podnětů indukující vnější cestu apoptózy řadíme toxiny, růstové faktory, oxid dusnatý, ligandy, hormony nebo cytokiny (Popov *et al.*, 2002; Brüne, 2003). Vnitřní cesta je naopak iniciována podněty působící uvnitř buňky, jako je poškození DNA, oxidativní stres, hypoxie či zvýšená koncentrace vápenatých iontů (Mattson *et al.*, 2003; Rizzuto *et al.*, 2003). Další mechanismus vyvolání apoptózy jsou cytotoxické granule, které se nacházejí v cytoplazmě T_C, a které obsahují protein perforin a proteázy granzymy. Samotný perforin, jehož aktivita je závislá na vazbě vápenatých iontů, narušuje cytoplazmatickou membránu cílové buňky a vytváří v ní póry. Přes vzniklé póry pronikají do nitra buňky granzymy. Granzymy poté spouští proteolytickou kaspázovou kaskádu vedoucí k apoptóze (Elmore, 2007).

3.7 Cesty prezentace antigenu

3.7.1 Prezentace antigenu MHC glykoproteiny třídy I

MHCI molekuly prezentují na svém povrchu peptidy endogenního i cytosolického původu. Proteiny určené pro MHC I prezentaci jsou v cytosolu nejdříve označeny krátkým proteinem ubikvitinem, následně v proteazomu degradovány, fragmentovány a částečně štěpeny aminopeptidázami a hydrolázami (Saveanu *et al.*, 2002; Zachová *et al.*, 2016). Vzniklé peptidové fragmenty jsou poté prostřednictvím transportéru spojeným s prezentací antigenu (TAP, z angl. transporter associated with antigen processing) a adenosintrifosfátu translokovány do endoplazmatického retikula (ER), kde dochází ke správnému sestavení těžkého řetězce MHC I molekuly s B2M. MHC I molekuly jsou bez navázaných peptidů

stabilizovány tapasinem, thiol oxidoreduktázou ERp57 a lektinovými chaperony calreticulinem a calnexinem (Abele *et al.*, 1999; Schubert *et al.*, 2000; Serwold *et al.*, 2002). Tapasin funguje nejen jako spojovací molekula mezi komplexem MHCI-chaperony a TAP, ale především usnadňuje vazbu vysoce afinitních peptidů k molekulám MHCI (Wearsch *et al.*, 2011). Po vazbě peptidu dochází k disociaci chaperonových proteinů a vzniklý komplex MHCI-peptid je transportován přes Golgiho aparát (GA) na cytoplazmatickou membránu, kde je rozpoznán CD8⁺ T-lymfocyty (Spiliotis *et al.*, 2000; Cresswell *et al.*, 2005). Naopak peptidy, které se na molekuly MHCI neváží, musí být translokovány zpět do cytosolu a degradovány (Obrázek 3) (Hughes *et al.*, 1997).

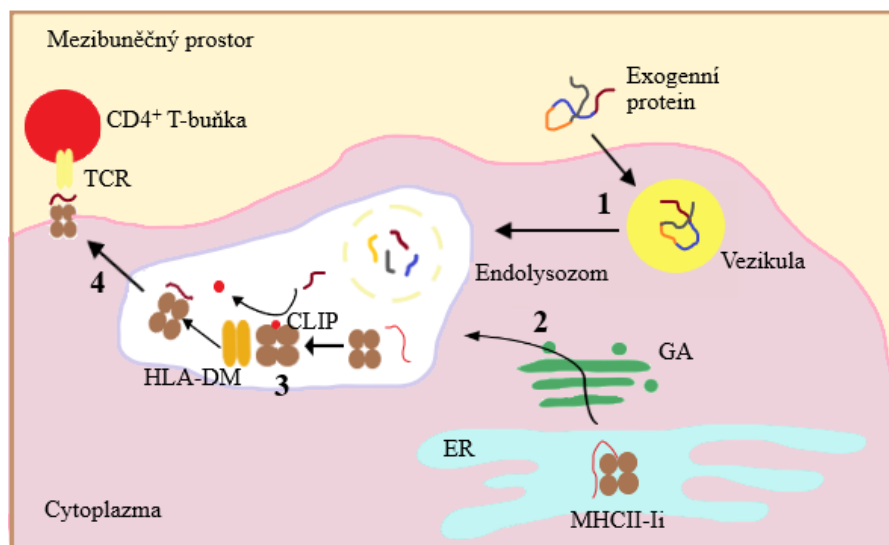


Obrázek 3 Prezentace antigenu pomocí MHCI molekul. ER - endoplazmatické retikulum, GA - Golgiho aparát, TAP - transportér spojený s prezentací antigenu, TCR - T-buněčný receptor. 1) Proteazomální degradace proteinu. 2) Vstup antigenních fragmentů do ER pomocí transportéru TAP a tvorba komplexu MHCI-peptid. 3) Vstup komplexu MHCI-peptid do GA. 4) Prezentace komplexu MHCI-peptid CD8⁺ T-lymfocytům.

3.7.2 Prezentace antigenu MHC glykoproteiny třídy II

MHCII molekuly váží na svém povrchu antigeny exogenního původu, které jsou antigen prezentující buňkou endocytovány ve formě vezikul. Tyto endocytické vezikuly jsou následně transportovány do endolysosomu obsahující cysteinové a aspartátové proteázy s optimálním pH (Grant *et al.*, 2009). Nejvýznamnější lysozomální proteázy jsou katepsiny B, D, E, L a S, které štěpí pohlcené exogenní antigeny na krátké peptidové fragmenty (Riese *et al.*, 1996; Hořejší *et al.*, 2009). MHCII molekuly se stejně jako MHCI molekuly sestavují v ER, kde se α a β podjednotky spojují s transmembránovým proteinem zvaným invariantní řetězec (Ii). Ten blokuje vazebné místo před navázáním nevhodných molekul. Vzniklý komplex

MHCII-Ii směřuje z ER přes GA do endolysozomu (Cresswell, 1996; Hořejší *et Bartůňková*, 2009). Lysozomální proteázy přítomné v endolysozomech odštěpují řetězec Ii a na MHCII molekulách zůstává napojený pouze malý fragment Ii zvaný CLIP (z angl. class II-associated invariant chain peptide), který je pomocí chaperonu HLA-DM vyměněn za cizorodý antigenní peptid. Plně sestavený komplex MHCII-peptid je poté transportován na cytoplazmatickou membránu, kde je prezentován CD4⁺ T-lymfocytům (Obrázek 4) (Riese *et al.*, 1996; Nakagawa *et al.*, 1999).



Obrázek 4 Prezentace antigenu pomocí MHCII molekul. ER - endoplazmatické retikulum, GA - Golgiho aparát, TCR - T-buněčný receptor, Ii - invariantní řetězec, CLIP - peptid invariantního řetězce spojený s třídou II. 1) Tvorba endocytických vezikul s proteinem a jejich transport do endolysozomu. 2) Transport komplexu MHCII-Ii přes GA do endolysozomu. 3) Odstranění Ii a výměna CLIP za peptid pomocí chaperonu HLA-DM. 4) Prezentace komplexu MHCII-peptid CD4⁺ T-lymfocytům.

3.7.3 Zkřížená prezentace antigenu

Studie J. Bevana z roku 1976 ukázala, že MHC I molekuly mohou na svém povrchu vázat exogenní antigeny, jako jsou nádorové antigeny nebo antigeny odvozené z apoptotických, nekrotických nebo virem infikovaných buněk, a tím je prezentovat CD8⁺ T-lymfocytům (Bevan, 1976). Tento proces se nazývá zkřížená prezentace (z angl. cross-presentation) a zahrnuje fragmentaci exogenního antigenu na peptidy, jejich vazbu na MHC I molekuly, a nakonec transport komplexu MHC I-peptid na buněčný povrch, kde stimulují naivní CD8⁺ T-lymfocyty, které se tak mohou stát efektorovými T_C (Bevan, 1976; Hořejší *et Bartůňková*, 1998).

Existuje několik různých cest popisujících zkříženou prezentaci exogenních antigenů. Nejzásadnějším krokem zkřížené prezentace je zajištění neutrálního pH a tím zabránění fúze pozdního endozomu s lysozomem. Dále každá dráha zajišťuje ještě tři následné kroky: fragmentaci antigenu na peptidy, jejich navázání na MHCI molekuly a transport komplexu MHCI-peptid na buněčný povrch. Antigen může být fragmentován prostřednictvím cytosolické nebo vakuolární dráhy. Podstatou cytosolické dráhy je přemístění antigenu z endozomu do cytosolu, kde dochází k fragmentaci proteazomem. Takto zpracovaný antigen může být transportován do ER, kde se spojí s MHCI molekulou, nebo může být dopraven zpět do endozomů k MHCI prezentaci. Cytosolická dráha je ještě členěna na dráhu endozom-cytosol a dráhu endozom-cytosol-endozom. Vakuolární dráha zahrnuje fragmentaci antigenu uvnitř endozomu pomocí katepsinu S (CatS). Antigenní peptid je poté navázán na MHCI molekulu a transportován na buněčný povrch, aniž by byl vystaven cytosolickému prostředí (Grommé *et al.*, 1999). Vyjma vakuolární a cytosolické dráhy zkřížené prezentace bylo rovněž zjištěno, že ke zkřížené prezentaci může také docházet prostřednictvím mezibuněčného spojení nazývaného gap junction (Neijssen *et al.*, 2005).

3.7.4 Zkřížená prezentace antigenu populacemi DC

Ne všechny podskupiny myších nebo lidských DC mají schopnost prezentovat exogenní antigeny na MHCI molekulách CD8⁺ T-lymfocytům. *In vitro* experimenty ukázaly, že DC jsou schopné zkříženě prezentovat antigeny, ale o zkřížené prezentaci *in vivo* není příliš informací (Dudziak *et al.*, 2007).

V myší slezině a lymfatických uzlinách se nacházejí dvě podskupiny DC, z nichž obě exprimují vysoké hladiny CD11c (CD11c^{high}). První podskupina je pozitivní na marker CD8 α a CD205 (CD8 α ⁺ CD205⁺), zatímco druhá podskupina postrádá CD8 α marker, ale exprimuje antigen 33D1 (CD8 α ⁻ 33D1⁺). CD8 α ⁺ DC oproti CD8 α ⁻ DC vykazují schopnost zkřížené prezentace antigenu, navíc bylo prokázáno, že CD8 α ⁺ DC se vyvíjejí z lymfoidního progenitoru, zatímco CD8 α ⁻ DC pocházejí z myeloidního progenitoru (den Haan *et al.*, 2000; Dudziak *et al.*, 2007).

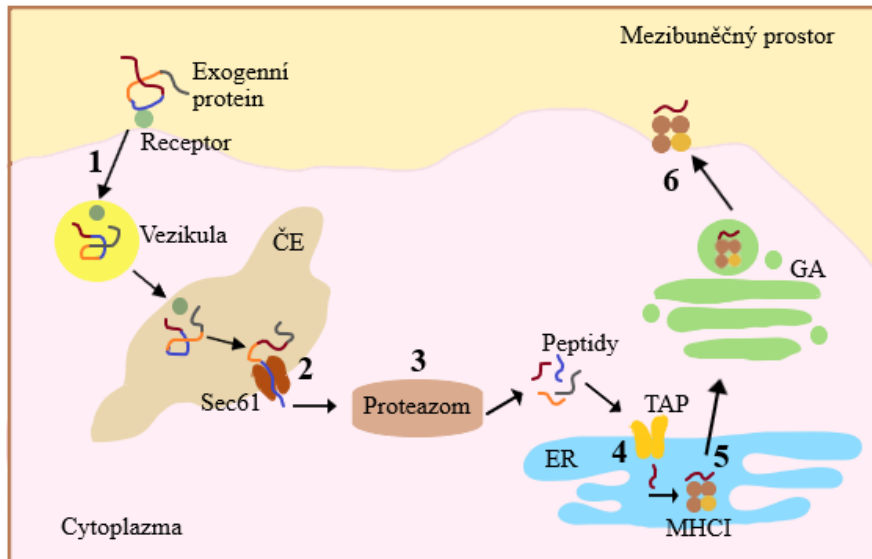
Lidská periferní krev obsahuje dvě hlavní populace DC: CD11c⁺ myeloidní DC a CD11c⁻ plazmacytoidní DC, které na rozdíl od myeloidních DC nefungují primárně jako APC, ale jako buňky produkující cytokiny. Lidské myeloidní DC lze na základě povrchové exprese rozdělit na CD16, BDCA-1 a BDCA-3, přičemž BDCA-3⁺ DC představují hlavní podmnožinu myeloidních DC schopných zkříženě prezentovat antigeny. Lidské BDCA-3⁺ DC, které byly nalezeny v krvi, slezině, lymfatických uzlinách, kostní dřeni a mandlích, jsou

charakterizovány expresí lektinového receptoru typu C (CLEC9A) a receptorů pro chemokiny XCL1 a XCL2 (Jongbloed *et al.*, 2010; Schreiber *et al.*, 2012). BDCA-3⁺ DC tvoří pouze ~0,03 % mononukleárních buněk lidské periferní krve, proto je jejich využití pro klinické aplikace omezené (Jongbloed *et al.*, 2010). Vzhledem ke schopnostem BDCA-3⁺ DC zkříženě prezentovat antigeny a jejich profilům exprese v celém genomu se předpokládá, že BDCA-3⁺ DC se podobají myším CD8 α ⁺ DC (Robbins *et al.*, 2008). Lidské BDCA-3⁺ DC a myši CD8 α ⁺ DC sdílejí řadu fenotypových podobností, včetně exprese Toll-like receptoru 3, proteinu podobného nektinu-2 a CLEC9A (Edwards *et al.*, 2003; Galibert *et al.*, 2005; Caminschi *et al.*, 2008; Huysamen *et al.*, 2008; Sancho *et al.*, 2009).

3.7.5 Cesty zkřížené prezentace antigenu

3.7.5.1 Dráha endozom-cytosol

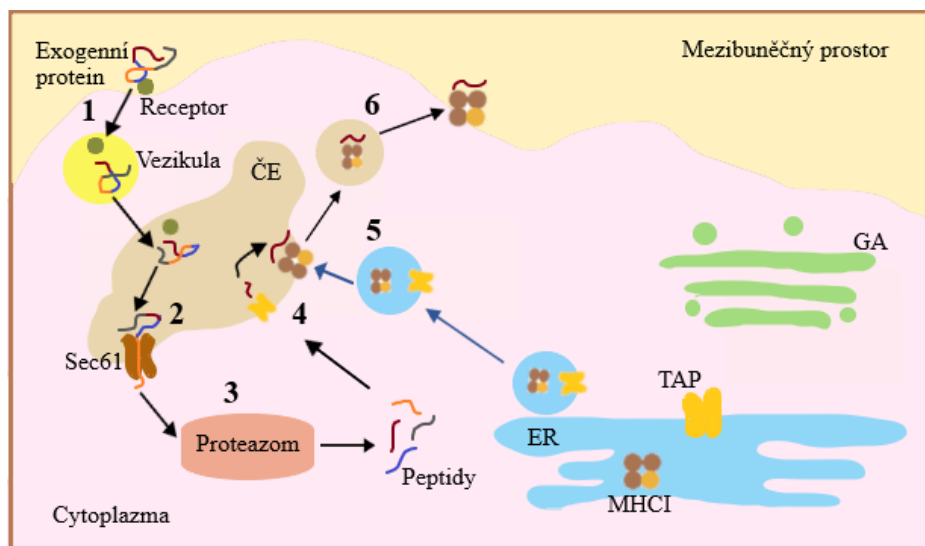
Endozom-cytosolická dráha zkřížené prezentace je zahájena pohlcením exogenního antigenu z buněčného povrchu dendritickou buňkou za vzniku endocytických vezikul, které pomocí receptoru endocytózy fúzí s časnými endozomy (ČE). Následně je antigen transportován z endozomu do cytosolu za účasti Sec61 komplexu (Wiertz *et al.*, 1996). V cytosolu je antigen označen ubikvitinem a dopraven do proteazomu, kde dochází k částečnému hydrolytickému štěpení antigenu na krátké peptidy, které jsou poté transportovány do ER pomocí přenašeče TAP podle klasické cesty prezentace MHCI endogenních peptidů. V ER dochází k závěrečnému štěpení peptidů aminopeptidázou ERAP-1 a ERAP-2 (z angl. endoplasmatic reticulum aminopeptidase) (Serwold *et al.*, 2001, 2002). Následně jsou peptidy navázány na MHCI molekuly a přes GA transportovány na buněčný povrch (Obrázek 5). Dráha endozom-cytosol je závislá na TAP a citlivá na inhibitory proteazomu.



Obrázek 5 Zkřížená prezentace antigenu dráhou endozom-cytosol. ER - endoplazmatické retikulum, GA - Golgiho aparát, ČE - časný endozom, TAP - transportér spojený s prezentací antigenu. 1) Tvorba endocytických vezikul s proteinem a jejich transport do ČE. 2) Transport proteinu z ČE do proteazomu. 3) Proteazomální degradace proteinu. 4) Vstup antigenních fragmentů do ER pomocí transportéru TAP a tvorba komplexu MHCI-peptid. 5) Transport komplexu MHCI-peptid do GA. 6) Prezentace komplexu MHCI-peptid na buněčném povrchu.

3.7.5.2 Dráha endozom-cytosol-endozom

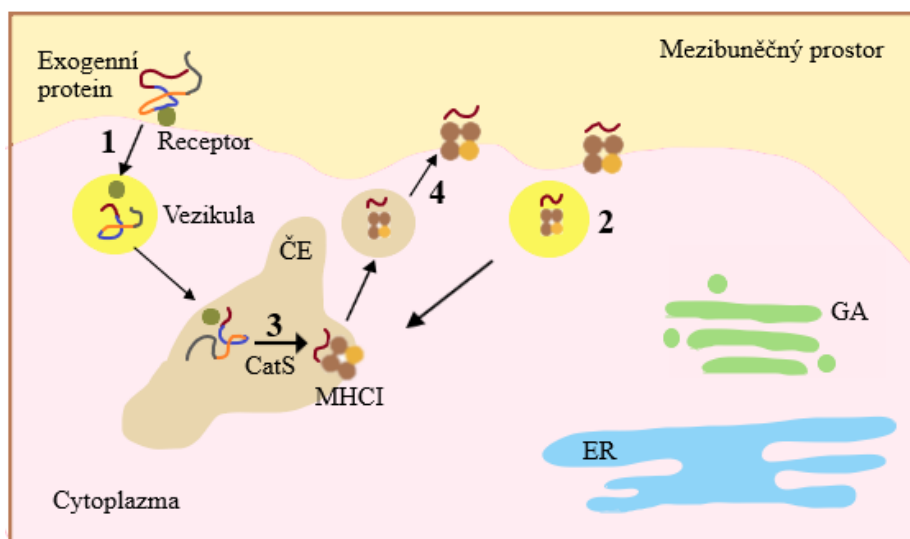
První tři kroky této cesty jsou analogické k úsekům probíhající v dráze endozom-cytosol. Rozdílem je, že peptidy částečně naštěpené proteazomem nejsou transportovány do ER, ale zpět do ČE prostřednictvím TAP přenašeče. Endozom obsahuje proteiny (tapasin, ERp57, calreticulin, calnexin, MHC-I molekuly) potřebné pro MHCI prezentaci. Již zmíněné proteiny se přirozeně vyskytují v ER, ale díky fúzi ČE s vezikuly odštěpených z ER mohou být přítomné i v endozomech, kde také probíhá závěrečné štěpení peptidů aminopeptidázou IRAP (z angl. insulin-regulated aminopeptidase) (Segura *et al.*, 2009). Nakonec jsou peptidy navázané na MHCI molekuly dopraveny na buněčný povrch (Obrázek 6).



Obrázek 6 Zkřížená prezentace antigenu dráhou endozom-cytosol-endozom. .ER - endoplazmatické retikulum, GA - Golgiho aparát, ČE - časný endozom, TAP - transportér spojený s prezentací antigenu. 1) Tvorba endocytických vezikul s proteinem a jejich transport do ČE. 2) Transport proteinu z ČE do proteazomu. 3) Proteazomální degradace proteinu. 4) Vstup antigenních fragmentů zpět do ČE pomocí transportéru TAP. 5) Vstup váčku s MHCI do ČE a tvorba komplexu MHCI-peptid. 6) Prezentace komplexu MHCI-peptid na buněčném povrchu.

3.7.5.3 Vakuolární dráha

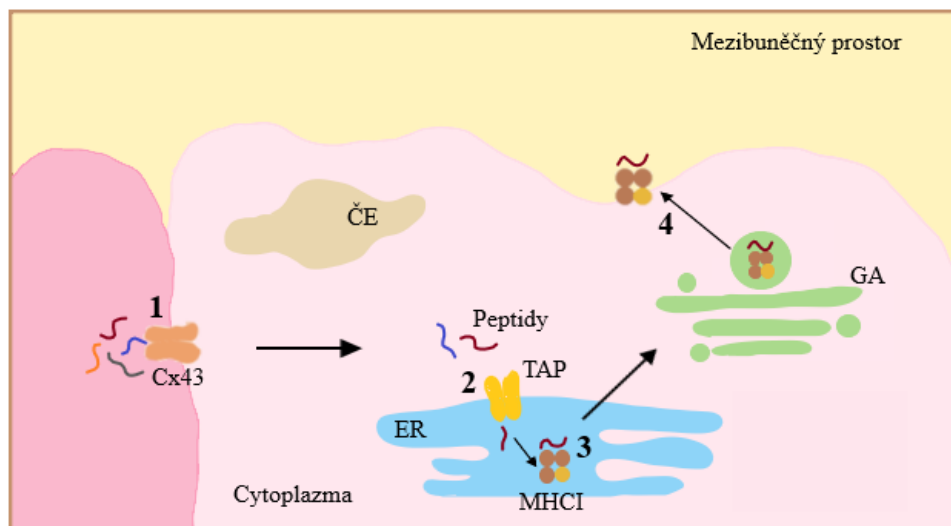
Při vakuolární dráze opět dochází k fúzi endocytických vezikul s ČE. V endozomech jsou antigeny štěpeny pomocí lysozomální cysteinové proteázy CatS, která může vykazovat aktivitu jak v kyselém, tak neutrálním pH, což se zdá být pro zkříženou prezentaci rozhodující (Shi *et al.*, 1992). Na štěpení antigenů se může také podílet proteáza katepsin B, L, D, E a S, aspartyl proteáza katepsin D a E, a asparagin specifická endopeptidáza. Vzniklé peptidy jsou poté navázány na MHCI molekuly a vzniklý komplex MHCI-peptid je přenesen na buněčný povrch (Obrázek 7). Vakuolární dráha nezávislá na TAP není blokována inhibitory proteazomu, ale je blokována inhibitory cysteinové proteázy leupeptinem (Shen *et al.*, 2004).



Obrázek 7 Zkřížená prezentace antigenu vakuolární dráhou. ER - endoplazmatické retikulum, GA - Golgiho aparát, ČE - časný endozom, CatS - katepsin S. 1) Tvorba endocytických vezikul s proteinem a jejich transport do ČE. 2) Vstup váčku s MHC I do ČE. 3) Degradace proteinu pomocí CatS a tvorba komplexu MHC I-peptid. 4) Prezentace komplexu MHC I-peptid na buněčném povrchu.

3.7.5.4 Dráha pomocí „Gap junction“

„Gap junction“ na bázi konexinu představují shluky vodných kanálků spojující cytoplazmu sousedních buněk. „Gap junction“ zprostředkovávají mezibuněčnou komunikaci umožňující výměnu iontů, malých molekul nebo druhých posílů mezi dvěma sousedními buňkami. Tento typ mezibuněčné komunikace je důležitým mechanismem udržování homeostázy a také hraje klíčovou roli v imunitní odpovědi (Handel *et al.*, 2007). Základem „gap junction“ jsou konexiny, z nichž nejznámější je Cx43 exprimovaný v různých hematopoetických buňkách, jako jsou folikulární dendritické buňky, aktivované lymfocyty a monocyty (Oviedo-Orta *et Evans*, 2004). Každý kanál „gap junction“ je tvořen ze dvou hemikanálů zvaných také jako konexony, které jsou složené z šesti konexinů (Handel *et al.*, 2007). Zkřížená prezentace dráhou pomocí „gap junction“ je zahájena přenosem antigenních fragmentů ze sousedních buněk do DC. V cytosolu jsou fragmenty antigenů štěpeny na krátké peptidy, které jsou poté transportovány do ER pomocí přenašeče TAP. V ER jsou peptidy navázány na MHC I molekuly a vzniklý komplex MHC I-peptid je dopraven na buněčný povrch (Obrázek 8). Komunikace pomocí „gap junction“ byla pozorována jak v myších DC, tak v lidských monocitech nebo DC (Neijssen *et al.*, 2005; Matsue *et al.*, 2006; Mendoza-Naranjo *et al.*, 2007).



Obrázek 8 Zkřížená prezentace antigenu dráhou „Gap junction“. ER - endoplazmatické retikulum, GA - Golgiho aparát, ČE - časný endozom, TAP - transportér spojený s prezentací antigenu. 1) Vstup antigenních fragmentů do buňky pomocí proteinu Cx43. 2) Transport antigenních fragmentů do ER pomocí transportéru TAP a tvorba komplexu MHCI-peptid. 3) Transport komplexu MHCI-peptid do GA. 4) Prezentace komplexu MHCI-peptid na buněčném povrchu.

3.8 Inhibitory zkřížené prezentace antigenu

Již bylo zmíněno, že principem zkřížené prezentace antigenu je vystavení antigenních peptidů exogenního původu na molekulách MHCI s následnou aktivací CD8⁺ T-lymfocytů. Mnohé studie identifikují jednotlivé dráhy zkřížené prezentace a jejich složky použitím sadou různých inhibitorů. Prvním krokem každé dráhy zkřížené prezentace antigenu je pohlcení exogenního antigenu z buněčného povrchu antigen prezentující buňkou resp. dendritickou buňkou za vzniku endocytických vezikul. Dendritické buňky mohou exogenní antigeny internalizovat různými mechanismy, jako je endocytóza zprostředkovaná klatrinem, endocytóza v tekuté fázi, makropinocytóza nebo fagocytóza. Bylo zjištěno, že použití inhibitoru **5(N,N-Dimethyl)amilorid hydrochlorid (DMA)** způsobuje inhibici fagocytózy a makropinocytózy antigenu v APC (Fonteneau *et al.*, 2003).

Dalším z inhibitorů, který specificky potlačuje cytosolickou dráhu zkřížené prezentace, je **exotoxin A (ExoA)** produkovaný bakterií *Pseudomonas aeruginosa*. ExoA inhibuje funkci komplexu Sec61, který se podílí na přenosu proteinů z endozomu do cytoplazmy a naopak. Také bylo prokázáno, že ExoA zabraňuje transportu antigenních peptidů pomocí transportéru TAP (Ackerman *et al.*, 2006).

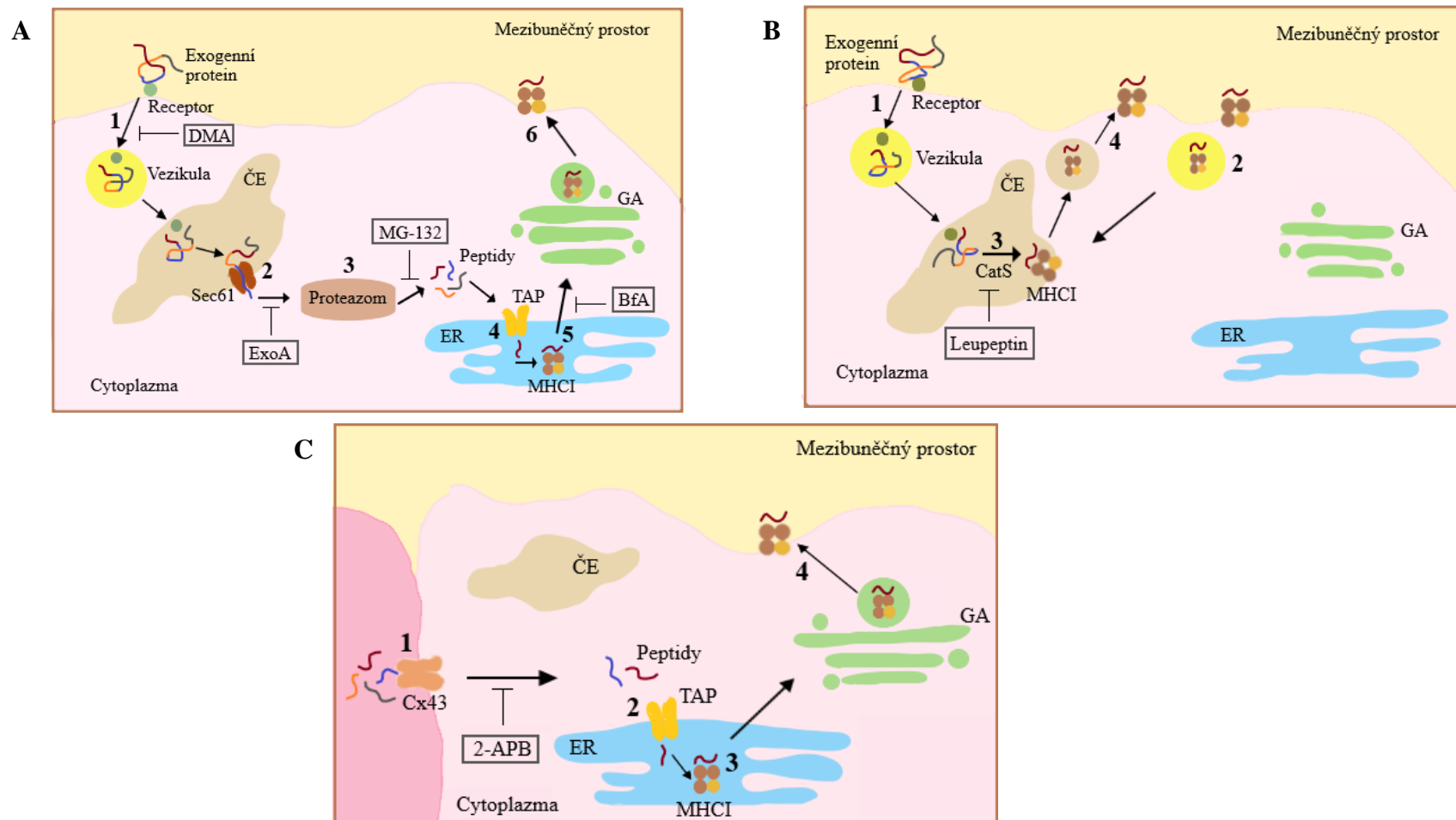
Cytosolická dráha, konkrétně dráha endozom-cytosol, a dráha pomocí „gap junction“ může být inhibována použitím **brefeldinu A (BfA)**. BfA je fungální metabolit, u něhož bylo prokázáno, že inhibuje transport proteinů z ER do GA. Také blokuje obrat komplexu MHCI-peptid na povrchu buněk, což způsobuje rozklad GA a jeho redistribuci do ER (Benke

et al., 2006). Několik studií ukázalo, že BfA také inhibuje export nově syntetizovaných komplexů MHCI-peptid z GA na povrch buněk, takže stávající komplexy nejsou nahrazeny (Benke *et al.*, 2006).

Inhibice zkřížené prezentace pomocí „gap junction“ může být také vyvolána použitím inhibitoru **2-aminoethoxydifenyl borát (2-APB)**. Inhibice těchto mezerových spojovacích kanálů zabraňuje přenos intracelulárních proteinů mezi buňkami. Bai *et al.* (2006) ve své studii uvádí, že 2-APB účinně blokuje „gap junction“ tvořené z Cx36 a Cx50, ale ne „gap junction“ tvořené z Cx45, Cx46 a Cx43.

Vakuolární dráha zkřížené prezentace antigenu může být blokována **leupeptinem**, který inhibuje cysteinové proteázy (CatS). Inhibice CatS vede k opožděné degradaci antigenu na peptidy a tím i k opožděné tvorbě komplexu MHCI-peptid. Bylo také zjištěno, že dendritické buňky s deficitem CatS postrádají vakuolární dráhu, ale nevykazují poruchy v dráze endozom-cytosol (Shen *et al.*, 2004).

Při možnostech ovlivnění zkřížené prezentace antigenu je nutné také zmínit **MG-132**, který selektivně blokuje proteolytickou aktivitu proteazomu. Vystavení buněk inhibitoru MG-132 může vést k dramatickému snížení proteazomální aktivity a tím k akumulaci ubikvitinylovaných proteinů v buňkách. MG-132 navíc zvyšuje aktivitu exekutorové kaspázy-3 indikující apoptózu (Sun *et al.*, 2006). Působení jednotlivých inhibitorů zkřížené prezentace antigenu ukazuje Obrázek 9.



Obrázek 9 Inhibitory zkřížené prezentace antigenu. ER - endoplazmatické retikulum, GA - Golgiho aparát, ČE - časný endozom, TAP - transportér spojený s prezentací antigenu, CatS - katepsin, Cx43 - konexin 43, 2-APB - 2-aminoethoxydifenyl borát, ExoA - exotoxin A, BfA - brefeldin A, DMA - 5(N,N-Dimethyl)amilorid hydrochlorid. A) ExoA způsobuje inhibici funkce komplexu Sec61. BfA inhibuje transport proteinů z ER do GA. MG-132 blokuje proteolytickou aktivitu proteazomu. DMA inhibuje fagocytózu nebo makropinocytózu antigenu v antigen prezentující buňce. B) Leupeptin jako inhibitor cysteinových proteáz (CatS) blokuje vakuolární dráhu zkřížené prezentace. C) 2-APB inhibuje „gap junction“ tvořené z konexinů.

3.9 Virus SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 je posledním objeveným lidským koronavirem, který primárně postihuje dýchací systém a způsobuje onemocnění Covid-19 (z angl. coronavirus disease-2019), ten byl poprvé objeven v čínském městě Wu-chan v prosinci 2019 a od té doby se rozšířil nejméně do 200 zemí včetně České republiky (ČR) (Zhu *et al.*, 2020). Fylogenetická analýza genomové sekvence SARS-CoV-2 odhalila jeho 79,5% identitu s dříve identifikovaným lidským koronavirem SARS-CoV (Zhou *et al.*, 2020). Stejně jako SARS-CoV a MERS-CoV patří SARS-CoV-2 do rodu *Betacoronavirus*. Všechny tři koronaviry se přenášejí zoonoticky, nicméně SARS-CoV-2 je z nich nejvíce patogenní (Naqvi *et al.*, 2020). V současné době se předpokládá, že primárním zdrojem nového koronaviru jsou netopýři, ale stále není jasné, jaký druh zvířete je jeho možným mezihostitelem (Zhou *et al.*, 2020). Některé studie spekulují, že k přenosu na člověka mohlo dojít z luskounů, nicméně tato teorie nebyla zatím potvrzena (Liu *et al.*, 2020).

Nákaza Covidem-19 byla Světovou zdravotnickou organizací označena za pandemii v březnu 2020. K 10. únoru 2021 bylo ve světě nakaženo 107,64 miliónu lidí a 2,36 miliónu úmrtí. V ČR bylo ke stejnému datu hlášeno 1,06 miliónů případů onemocnění a 17,64 tisíc úmrtí. Nejvíce postiženými zeměmi jsou USA, Indie, Brazílie, Rusko, Velká Británie, Francie, Španělsko a Itálie (WHO, ©2021).

3.9.1 Genom viru SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 patří mezi obalené jednovláknové RNA viry s pozitivní polaritou. Genom viru má velikost přibližně 29,9 kb a obsahuje několik otevřených čtecích rámců, přičemž první z nich kóduje dva polyproteiny, které jsou po translaci rozštěpeny virovými proteázami 3CLPro (3C like-proteáza) a PLPro (papain-like proteáza) na 16 nestrukturálních proteinů (nsp1–nsp16). Tyto proteiny se účastní sestavení komplexu replikáza/transkriptáza zajišťující replikaci virové RNA a její přepis do struktury proteinů. Řada nestrukturálních proteinů je pro životní cyklus viru SARS-CoV-2 nepostradatelná, a to zejména RNA replikáza (nsp12) a RNA helikáza (nsp13). Zbývající část genomu kóduje čtyři hlavní strukturální proteiny: spike („hrotový“) protein, obalový protein, membránový protein a nukleokapsidový protein obklopující virovou RNA (Lu *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020). Zatímco membránové a obalové proteiny jsou důležité při morfogenezi, sestavení a uvolňování virionů, spike protein hraje důležitou roli při vstupu viru do hostitelské buňky (Li *et al.*, 2020).

Spike protein se skládá ze dvou funkčních podjednotek S1 a S2. Podjednotka S1 obsahuje doménu vázající receptor (RBD, z angl. receptor-binding domain), prostřednictvím

níž se spike protein váže na receptory angiotenzin konvertujícího enzymu (ACE2) hostitelské buňky. Tyto receptory jsou exprimovány v buňkách většiny orgánů včetně plic, ledvin, srdce, tepen a mozkové kůry. Druhá podjednotka S2 funguje jako fúzní protein a zodpovídá za fúzi virální a buněčné membrány (Hamming *et al.*, 2004; Tai *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020). Aktivace spike proteinu vyžaduje proteolytické štěpení mezi podjednotkami S1 a S2 a uvnitř podjednotky S2 za účasti furinu (Madu *et al.*, 2009). Furin je exprimovaný v celém lidském těle, proto se předpokládá, že napomáhá rychlejšímu šíření viru mezi buňkami (Sternberg *et al.*, 2020). Papa *et al.* (2021) se ve své studii zabývali tím, jak štěpení furinem ovlivňuje vstup a šíření viru. Výsledky ukázaly, že léčiva založená na furinu mohou snižovat, ale nikoliv zabránit šíření virové infekce.

3.9.2 Patogeneze a imunita u Covid-19

Jak již bylo zmíněno vazba RBD domény spike proteinu na receptor ACE2 umožňuje vstup viru do buňky a poté ji infikovat. Průběh onemocnění závisí především na věku a zdravotním stavu jedince. Statistiky uvádějí, že u lidí starších 60 let a pacientů s vyšším krevním tlakem, diabetem, obtížemi s plícemi, se srdcem a dalšími jinými chorobami je průběh onemocnění závažnější. Nejčastějšími projevy Covidu-19 jsou horečka, suchý kašel, bolest kloubů, svalů, hlavy a v závažnějších případech potíže s dýcháním (Deng *et al.*, 2020; Zou *et al.*, 2020). V některých případech se může také projevit ztráta čichu a chuti (Spinato *et al.*, 2020).

Při vstupu koronaviru SARS-CoV-2 do buňky je proti němu ihned zahájena imunitní reakce pomocí humorální a buněčné imunity. V počátečních stádiích infekce jsou v těle nejdříve aktivovány mechanismy vrozené imunity, a posléze, v řádu dnů, se začíná aktivovat získaná imunita zprostředkovaná T- a B-lymfocyty. Bohužel u SARS-CoV-2 není stále přesně známo, jak dlouho může imunita trvat. Z toho důvodu současná studia vychází z dostupných informací z předchozích výzkumů o SARS-CoV. Podobně jako u SARS-CoV, tak i v případě SARS-CoV-2 se předpokládá, že protilátková imunitní reakce spočívá v tvorbě časných IgA a IgM protilátek, které mizí do 12. týdne, a pozdějších IgG protilátek, které jsou trvalejší (Li *et al.*, 2003). Naopak buněčná imunita zprostředkovaná CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocyty přetrvává dlouhodobě. U onemocnění koronavirem SARS-CoV byly T-lymfocyty detekovány i 11 let po infekci. Jestli tomu bude také v případě SARS-CoV-2 nelze předpovídat, ale očekává se podobná situace (Ng *et al.*, 2016).

Bylo zjištěno, že častou příčinou úmrtí pacientů s těžkým průběhem nemoci Covid-19 je tzv. cytokinová bouře způsobena nekontrolovatelným uvolňováním velkého množství

protizánětlivých cytokinů (Huang *et al.*, 2020). Vyvolaná cytokinová bouře bývá nejčastěji příčinou syndromu akutní dechové tísně a následného selhání orgánů, které nakonec vede ke smrti (Xu *et al.*, 2020).

3.9.3 Vakcína proti SARS-CoV-2

Doposud není zatím registrovaný žádný účinný lék proti nemoci Covid-19. Proto nejúčinnější způsob, jak snížit morbiditu a mortalitu spojenou s tímto novým onemocněním, se zdá očkování. K 29. 1. 2021 je celosvětově hlášeno 192 kandidátních vakcín proti Covid-19 a 68 je ve fázi klinického hodnocení (Biorender, ©2021). Předpokládá se, že výzkum vývoje vakcín se zaměřuje na obě virové proteázy (3CLPro, PLPro), RBD doménu spike proteinu, RNA helikázu a RNA replikázu, ty jsou považovány za nejdůležitější vakcinační antigeny potřebné ke stimulaci imunitní odpovědi (Wang *et al.*, 2020). V současnosti jsou proti onemocnění Covid-19 ve vývoji čtyři základní typy vakcín: inaktivované nebo živé oslabené vakcíny, vektorové vakcíny, proteinové vakcíny a DNA, RNA vakcíny. Jako nejvíce nadějně se zatím jeví vektorové, rekombinantní a genetické vakcíny. Vzhledem k povaze inaktivovaných a živých oslabených vakcín se jejich využití v EU nepředpokládá.

Dnes jsou k dispozici čtyři vakcíny proti nemoci Covid-19. První schválená vakcína byla od firmy BioNTech/Pfizer, následovala vakcína od firmy Moderna, dále vakcína od společnosti AstraZeneca, a nakonec vakcína od společnosti Johnson & Johnson. Výše zmíněné společnosti využívají ve vývoji vakcíny jako antigen koronavirový spike protein. Po intramuskulární aplikaci vakcíny imunitní systém rozpozná daný protein jako cizorodý a navodí proti němu bezpečnou imunitní odpověď (Klika, 2021).

Vakcíny výrobců BioNTech/Pfizer a Moderna se řadí mezi mRNA vakcíny, jejichž technologie je nová, ale nikoliv neznámá. Tato technologie byla například využita při přípravě vakcíny proti viru chřipky, viru Zika, ale i proti některým typům zhoubných nádorů. Vakcíny na této bázi obsahují genetický materiál v podobě mRNA, která kóduje pouze část koronavirového spike proteinu. Po vpravení vakcíny poté svalové buňky použijí tuto mRNA jako templát pro syntézu části daného spike proteinu. Výhodou mRNA vakcín je jejich rychlý vývoj a vysoká účinnost. Výrobci BioNTech/Pfizer a Moderna udávají účinnost vakcíny kolem 95 % (Baden *et al.*, 2020; Polack *et al.*, 2020). Nicméně i mRNA vakcíny mají své nevýhody. mRNA je totiž nestabilní a při dlouhodobém uchovávání při vysokých teplotách nebo působením enzymů RNáz se může v těle rozkládat. Z toho důvodu bývá mRNA obalena lipidovými nanočásticemi tzv. liposomy, jejímž prostřednictvím je mRNA chráněna před

degradací a dopravena do cílových buněk imunitního systému (Komaroff, 2020; Tregoning *et al.*, 2020; Klika, 2021).

Vakcína Comirnaty od společnosti AstraZeneca se skládá z oslabeného nepatogenního opičího adenoviru, který byl modifikován takovým způsobem, aby obsahoval gen pro expresi koronavirového spike proteinu. Buňky po vpravení tohoto genu pak produkují spike protein. Společnost Johnson & Johnson využívá pro vývoj vakcíny vzácnější typ lidského adenoviru (Ad26) a oproti ostatním vakcínám byla navržena tak, aby poskytla imunitní odpověď v jedné dávce. Podle studií tato vakcína prokázala 66% účinnost (Johnson & Johnson; ©2021). Do této kategorie patří také ruská vakcína Sputnik V, která oproti vakcínám od firem AstraZeneca a Johnson & Johnson používá pro každou dávku jiný druh adenoviru. Konkrétně se jedná o adenovirus typu 5 (Ad5) a adenovirus typu 26 (Ad26). Cílem použití dvou různých typů adenovirů je tímto způsobem snížit riziko možnosti tvorby protilátek při podání první dávky. Studie zveřejněna v časopise *The Lancet* udává 91% účinnost vakcíny (Logunov *et al.*, 2021). Nyní je vakcína Sputnik V ve třetí fázi klinického hodnocení (Tregoning *et al.*, 2020; Klika, 2021).

Další slibnou vakcínou proti Covid-19 může být rekombinantní vakcína vyvíjena společností Novavax. Vakcína obsahuje laboratorně připravenou formu koronavirového spike proteinu, který je uměle syntetizován v hmyzím bakulovirovém expresním systému. Sama vakcína je málo imunogenní, proto je ještě doplněna o vhodná adjuvans, která zaručí dostatečně imunogenní účinek vakcíny (Tregoning *et al.*, 2020; Klika, 2021). Bylo ukázáno, že účinnost vakcíny Novavax je 95 % proti původní variantě viru a 85 % proti britské mutaci (Mahase, 2021).

3.10 Systém CRISPR/Cas

3.10.1 Charakteristika CRISPR

CRISPR (z angl. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) jsou segmenty pravidelně rozmístěných krátkých (cca 24-47 bp) palindromických repetit, mezi kterými se nacházejí krátké (27–72 bp) fragmenty cizorodé DNA (spacer) (Wiedenheft *et al.*, 2012). Prokaryota využívají systém CRISPR jako formu adaptivního imunitního systému sloužící k získání rezistence proti genetickým elementům, jako jsou viry a plazmidy (Horvath *et Barrangou*, 2010). Nicméně CRISPR lokusy byly nalezeny také u některých sinic, proteobakterií a několik skupin grampozitivních bakterií s nízkým obsahem guaninu a cytosinu (Mojica *et al.*, 2000). Přítomnost CRISPR není pro konkrétní taxon charakteristická, neboť se

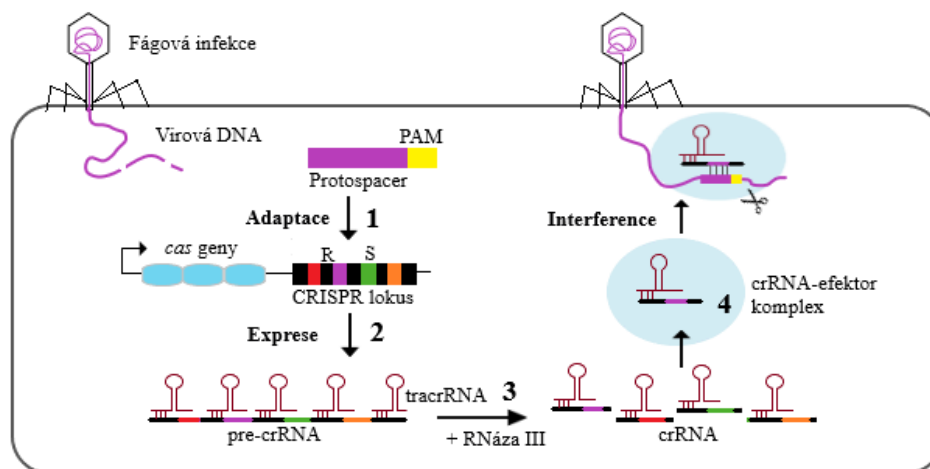
mohou lišit i mezi druhy patřící do stejného rodu nebo čeledi. Například *Bacillus subtilis* a *Bacillus halodurans* patří do stejné čeledi, ale CRISPR je přítomen pouze u *B. subtilis*. Naopak tyto opakující repetice nebyly nalezeny u *Escherichia coli* a *Sulfolobus solfataricus* (Jansen *et al.*, 2002). Důležitou součástí CRISPR lokusů jsou *cas* geny kódující proteiny asociované s CRISPR (Cas, z angl. CRISPR-associated proteins), prostřednictvím nichž je CRISPR/Cas systém klasifikován do tří hlavních typů. Typ I obsahuje Cas3, typ II Cas9 a typ III Cas10 (Makarova *et al.*, 2006, 2011a, 2011b). Ve všech CRISPR/Cas systémech jsou přítomny proteiny Cas1 a Cas2, které spolu tvoří stabilní komplex nezbytného pro vložení nového spaceru do CRISPR lokusu (Nuñez *et al.*, 2014). Zatímco Cas1 proteiny jsou na kovu závislé DNázy, Cas2 proteiny jsou na kovu závislé RNázy (Beloglazova *et al.*, 2008; Wiedenheft *et al.*, 2009).

3.10.2 CRISPR/Cas9

Z hlediska technologického využití je nejvýznamnějším a nejpoužívanějším nástrojem právě systém CRISPR/Cas typu II, jehož charakteristickým znakem je přítomnost multidoménového proteinu Cas9 původem ze *Streptococcus pyogenes* (Cong *et al.*, 2013). CRISPR/Cas9 systém zprostředkovává imunitu proti napadení viry nebo poškozeními cizími plazmidy ve třech fázích: adaptace, exprese a interference (Obrázek 10). Zpočátku jsou spacery z cizorodé DNA integrovány do CRISPR lokusu. Takto integrovaná DNA je poté procesem transkripce přepsána do prekurzorové crRNA (pre-crRNA), na kterou se váže transkripční crRNA (tracrRNA) komplementární k sekvenci obsažené v CRISPR lokusu. Duplex pre-crRNA/tracrRNA je následně štěpen pomocí ribonukleázy RNázy III za vzniku zralých molekul CRISPR RNA (crRNA). Párování tracrRNA a crRNA nakonec vede ke vzniku jednovláknové vodící RNA (sgRNA, z angl. single guide RNA), která navádí endonukleázu Cas9 k cílové sekvenci DNA. Protein Cas9 štěpí cizorodou DNA pouze v případě, že za ní následuje krátká (2–4 bp) sekvence DNA zvaná protospacer sousední motiv (PAM, z angl. protospacer adjacent motif) (Mojica *et al.*, 2009; Makarova *et al.*, 2011a; Ratan *et al.*, 2018).

Proteiny Cas9 jsou crRNA dependentní endonukleázy, které se liší velikostí i sekvencí. Většina proteinů Cas9 obsahuje přibližně 1100–1400 aminokyselin a dvě nukleázové domény HNH a RuvC (Jinek *et al.*, 2014). Obě domény jsou zodpovědné za sestřih cílové DNA. Zatímco HNH doména štěpí řetězec DNA komplementární k sekvenci sgRNA (cílové vlákno), RuvC doména štěpí naopak nekomplementární řetězec (necílové vlákno), čímž vznikají dvouřetězcové zlomy DNA (Jinek *et al.*, 2012). Proteiny Cas9 také obsahují vysoce

konzervovanou oblast bohatou na arginin určenou pro interakci s nukleovými kyselinami (Sampson *et al.*, 2013).



Obrázek 10 Mechanismus systému CRISPR/Cas. R - repetice, S - spacer, crRNA - CRISPR RNA, pre-crRNA - prekurzorová crRNA, tracrRNA - transkripční crRNA, PAM - protospacer sousedící motiv. 1) Integrace spaceru do CRISPR lokusu. 2) Přepis DNA do pre-crRNA a vazba tracrRNA. 3) Štěpení pre-crRNA pomocí RNázy III za vzniku crRNA. 4) Tvorba komplexu crRNA-efektor štěpící cizorodou DNA.

3.10.3 Využití CRISPR/Cas9 technologie

CRISPR/Cas9 technologie nachází uplatnění v mnoha oborech klinické praxe včetně biotechnologie, nukleární medicíny a zejména molekulární biologie. Zde CRISPR/Cas9 představuje mocný nástroj pro editaci genomu, při níž dochází působením Cas9 ke štěpení DNA na přesně definovaném místě. Rozštěpená vlákna DNA jsou poté opravnými buněčnými mechanismy opět spojena. Opravou mohou vznikat mutace (inzerce, delece) nebo může také dojít k opravě poškozené části podle neporušeného homologního templátu. Podle způsobu opravy porušeného vlákna pak může docházet k deaktivaci, aktivaci nebo ke změně sekvence genu (Moravec, 2017; Adli, 2018; Ratan *et al.*, 2018). Ve výzkumné oblasti se editace genomu s podporou CRISPR používá různými způsoby, jako je např. kontrola transkripce, modifikace epigenomů, skrínig celého genomu a zobrazování chromozomů (Barrangou *et al.*, 2016).

Systém CRISPR/Cas9 byl také upraven pro vytvoření dvou technologií zvaných CRISPR interference (CRISPRi) a CRISPR aktivace (CRISPRa), které regulují genovou expresi. Obě technologie používají katalyticky inaktivní variantu proteinu Cas9 (dCas9) postrádající endonukleázovou aktivitu způsobenou bodovými mutacemi v jeho dvou endonukleázových doménách (Jinek *et al.*, 2012; Larson *et al.*, 2013). Takto inaktivní protein dCas9 sice nemůže štěpit cílovou DNA, ale je schopen se na ní v komplexu se sgRNA a dalšími transkripčními regulátory vázat a tím zvyšovat nebo snižovat genovou expresi. V případě

CRISPRi je dCas9 fúzován s transkripčními represory (např. KRAB) vedoucí k potlačení exprese cílového genu (Gilbert *et al.*, 2013). V CRISPRa dCas9 interaguje s transkripčními aktivátory (např. VP64), což vede naopak upregulaci genové exprese (Chavez *et al.*, 2015).

Technologie CRISPR/Cas9 má také uplatnění v imunoterapii nádorových onemocnění, a to především v adaptivní imunoterapii, která je založena na izolaci pacientových T-lymfocytů, jejich modifikaci *ex vivo*, kultivaci a následnému navrácení zpět do organismu, kde dojde k navození imunitní odpovědi v oblasti nádoru (Zatloukalová *et al.*, 2019).

3.11 CRISPR/Cas vs RNAi

Proces RNA interference (RNAi, z angl. RNA interference) je důležitým postranskripčním mechanismem, který majoritně reguluje transkripci a expresi genů u eukaryotních buněk. Mechanismus RNAi vznikl jako obrana buněk proti virům a transpozonům. Klíčovým krokem procesu RNAi je štěpení dvouvláknové RNA na malé nekódující RNA - miRNA (z angl. microRNA) a siRNA (z angl. short interfering RNA), které se následně párují s cílovou mRNA. Tato interakce vede ke štěpení mRNA nebo k inhibici translace a tím i k potlačení syntézy polypeptidů (Siomi *et Siomi*, 2009).

Obě genetické technologie RNAi a CRISPR/Cas9 se vyvinuly jako mocné nástroje určené k potlačení genové exprese (Schuster *et al.*, 2019). Primárním rozdílem mezi RNAi a CRISPR spočívá v tom, že RNAi snižuje expresi genu na úrovni mRNA (knock-down), zatímco CRISPR trvale umlčuje gen na úrovni DNA (knock-out). Při volbě použití dané technologie k umlčování genů je potřeba zvážit výhody a nevýhody každého uvedeného přístupu.

Hlavní výhodou RNAi je přítomnost jeho aparátu téměř v každé savčí somatické buňce, proto není nutná žádná předchozí genetická manipulace s cílovou buněčnou linií a jednoduchá transfekce siRNA může vést ke ztrátě funkce fenotypu (Boettcher *et McManus*, 2015). Vzhledem k tomu, že mechanismus RNAi je většinou cytoplazmatický a působí na RNA, nikoliv na genomovou DNA v jádře, není knock-down genů ovlivněn ploidií buněk a dostupností chromatinu, jak bylo pozorováno u přístupů založených na CRISPR. Zde mohou genomické oblasti s uzavřeným stavem chromatinu blokovat vazbu a tím i funkci Cas9 (Kuscu *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2014; Schuster *et al.*, 2019).

Největším problémem, který omezuje využití CRISPR/Cas technologie v editaci genomu, je zvýšená přítomnost off-target efektů. Příčinou těchto efektů je vazba sgRNA na cílovou sekvenci DNA s tolerancí dokonce 3–5 bp, které nejsou komplementární, což vede k rozvoji mutací nejen v cílové DNA, ale také napříč celým genomem (Cho *et al.*, 2014). Popsány byly různé strategie vedoucí ke snížení off-target aktivity. Příkladem může být použití

již zmíněného Cas9 proteinu a dvou sgRNA (Mali *et al.*, 2013). Další možností je také zkrácení 3' konce sgRNA o velikosti do 17 bp nebo přidání dvou guaninových nukleotidů na 5' konec sgRNA (Fu *et al.*, 2014).

S rychlým vývojem CRISPR technologie se může zdát, že období nástrojů založených na RNAi skončilo, přesto si RNAi stále zachovává silnou pozici a lze předpokládat, že obě technologie budou spolu po nějaký čas koexistovat.

3.12 Průtoková cytometrie

Metoda průtokové cytometrie umožňuje kvalitativní a kvantitativní analýzu fyzikálních (optických) a chemických (fluorescenčních) vlastností jednotlivých buněk nebo jiných částic (jádra, mikroorganismy, chromozomy, latexové kuličky a další) během průchodu laserovým paprskem (Brown *et Wittwer*, 2000). Hlavní výhodou průtokové cytometrie je její schopnost měřit více parametrů na úrovni jedné buňky ve vzorku o velkém počtu buněk během krátkého časového intervalu. Pro analýzu musí být buňky ve formě suspenze. Je totiž nezbytné, aby v daný okamžik procházela systémem jedna buňka z analyzované suspenze. Tato buňka je pak ozářena sadou laserů a je detekován vyzářený fluorescenční signál (Roubalová, 2012; McKinnon, 2018).

Průtoková cytometrie je slibným nástrojem, který usnadňuje rutinní analýzy v klinické praxi. Nejběžněji vyšetřovaným materiálem je periferní krev, aspiráty kostní dřeně, leukocyty, buněčné kultury a suspenze buněk připravené z tkání. Materiály jako mozkomíšní mok, bronchoalveolární laváž a punktáty se z důvodu nedostatečného počtu buněk analyzují vzácně (Roubalová, 2012). V současnosti má technika průtokové cytometrie uplatnění v mnoha oborech klinické praxe, včetně molekulární biologie, bakteriologie, imunologie, virologie a mnoho jiné (Suda, 2005; McKinnon, 2018). V molekulární biologii se využívá při stanovení obsahu jaderné DNA, určení ploidie, při analýze a detekci buněčného cyklu, apoptózy nebo při studiu genové exprese. V bakteriologii je průtoková cytometrie uplatňována při diagnostice a charakterizaci patogenních mikroorganismů. V imunologii je průtoková cytometrie nejčastěji aplikována při imunofenotypizaci, kdy pomocí vhodného výběru fluorescenčně značených mononukleárních protilátek specifických pro markery na buněčném povrchu lze charakterizovat danou populaci buněk. Mezi takové markery používané k definování specifických buněčných populací patří markery T-lymfocytů (CD3, CD4, CD8), B-lymfocytů (CD19, CD20), monocytů (CD14), DC (CD40, CD80, CD86) nebo NK buněk (CD56) (McKinnon, 2018). Tímto způsobem lze provést imunofenotypizaci leukémie, lymfomů nebo buněk infikovaných virem HIV. Průtoková cytometrie se také využívá při analýze

intracelulárních cytokinů, signálních proteinů, nádorových buněk, při hodnocení životaschopnosti buněk, při diagnostice defektů funkce imunitního systému, diagnostice a sledování autoimunitních chorob, v transplantační imunologii nebo při studiu vývoje léků (Šinkorová *et* Zárybnická, 2008; Jahan-Tigh *et al.*, 2012; McKinnon, 2018; Chelkar *et* Panda, 2020).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Materiál

4.1.1 Biologický materiál

Myší adherentní buněčná linie cDC1 MutuDC izolovaná ze splenocytů inbredního kmene C57BL/6 (Lausanne, Švýcarsko). Buňky se vyznačují expresí genu pro zeleně fluorescenční protein (GFP, z angl. green fluorescent protein).

Kompetentní bakterie *Escherichia coli* kmen DH5 α (kat. číslo: C2987; New England Biolabs, USA)

4.1.2 Chemikálie

Agar (kat. číslo A5054; Sigma-Aldrich, USA)

Agaróza (kat. číslo 11404; SERVA, Německo)

Akrylamid (kat. číslo A8887; Sigma-Aldrich, USA)

Ampicilin (kat. číslo A0839; PanReac AppliChem, Německo)

Bovinní sérový albumin (kat. číslo 12659; Sigma-Aldrich, USA)

Dihydrogenfosforečnan draselný, p.a. (kat. číslo 30016-AP0; Lach:ner s.r.o., ČR)

Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát, p.a. (kat. číslo 30017-AP0; Lach:ner s.r.o., ČR)

dNTPs mix (10 mmol/l) (kat. číslo 18427013; Invitrogen, USA)

Dodecylsírán sodný (kat. číslo 444464T; VWR International, USA)

Ethanol 96 %, p.a. (kat. číslo 20025-A96; Lach:ner s.r.o., ČR)

Fetální bovinní sérum (8% roztok) (PAN-Biotech, Německo)

Fixable Viability Dye-ef506 (kat. číslo 65-0866-14; eBioscience, USA)

Gel loading Dye purple (6x) (kat. číslo B7025S; New England Biolabs, USA)

GelRed Nucleic Acid Gel Stain (kat. číslo 41003; Biotium, USA)

Glycerol, kapalina (kat. číslo G5516; Sigma-Aldrich, USA)

Glycin, p.a. (kat. číslo 40059-AP0; Lach:ner s.r.o., ČR)

GolgiPlug (obsahuje Brefeldin A) (kat. číslo 555029; Becton Dickinson, USA)

Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát, p.a. (kat. číslo 30061-AP0; Lach:ner s.r.o., ČR)

Chlorid draselný, p.a. (kat. číslo 30076-AP0; Lach:ner s.r.o., ČR)

Chlorid sodný, p.a. (kat. číslo 30093-AP0; Lach:ner s.r.o., ČR)

IMDM + GlutaMAX™ (kat. číslo 31980030; Gibco, UK)

Imidazol (kat. číslo 0527; VWR International, USA)

Inhibitory (Sigma-Aldrich, USA)

- 2-APB (kat. číslo D9754)
- 5(N,N-Dimethyl)amilorid hydrochlorid (kat. číslo A4562)
- Exotoxin A (kat. číslo PO184)
- MG-132 (kat. číslo SML1135)
- Leupeptin (kat. číslo L2884)
- Lipopolysacharid (kat. číslo L8274)

2-merkapt ethanol, kapalina (50 μ M) (kat. číslo M-3148; Sigma-Aldrich, USA)

Dulbecco's PBS pufr (1x) (kat. číslo BDL-001; Serana Europe GmbH, Německo)

Isopropanol (kat. číslo 17500; PENTA, s.r.o., ČR)

Kyselina ethylendiamintetraoctová, p.a. (EDTA) (kat. číslo 11278; SERVA, Německo)

Kyselina octová 99,8 %, p.a. (kat. číslo 10047-A9B; Lach:ner s.r.o., ČR)

Luria Bertani médium (LB), Miller (kat. číslo J63905.K2; VWR International, USA)

Methanol, p.a. (kat. číslo 20038-AT0; Lach:ner s.r.o., ČR)

N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (kat. číslo 35925; SERVA, Německo)

N,N'-metylenbisakrylamid (kat. číslo 146072; Sigma-Aldrich, USA)

NEBuffer 1.1 (10x) (kat. číslo B7001S; New England Biolabs, USA)

NEBuffer 3.1 (10x) (kat. číslo B7203S; New England Biolabs, USA)

Ni-NTA agaróza (kat. číslo 30230; Qiagen, USA)

PageRuller Plus Prestained Protein Ladder (kat. číslo 26619; Thermo Fisher Scientific, USA)

Paraformaldehyd 16% (kat. číslo 15710; Electron Microscopy Sciences, USA)

Penicilin-Streptomycin (100x) (kat. číslo R.HP10.1; PAN-Biotech, Německo)

Plus DNA ladder 1 kb (kat. číslo N3200L; New England Biolabs, USA)

Protilátky konjugované s fluorochromy (eBioscience, USA)

- CD11c-eFluor506 (kat. číslo 69-0114-82)
- CD40-PE (kat. číslo 12-0401-82)
- CD80-PE-cy5 (kat. číslo 15-0801-82)
- CD86-PE-cy7 (kat. číslo 25-0862-82)
- MHCI-eFluor50 (kat. číslo 48-5958-82)
- MHCII-PE-eFluor610 (kat. číslo 61-5321-82)

pSpCas9(BB)-2A-GFP (pX458) vektor (kat. číslo 48138; Addgen, USA)

Restrikční endonukleázy (New England Biolabs, USA)

- EcoRV* (20 000 units/ml) (kat. číslo R0195S)
- PstI* (20 000 units/ml) (kat. číslo R0140S)

SacI (20 000 units/ml) (kat. číslo R0156S)

XbaI (20 000 units/ml) (kat. číslo R0145S)

SOC médium (kat. číslo B9020S; New England Biolabs, USA)

Standard *Taq* Reaction Buffer 10x (kat. číslo B9014S; New England Biolabs, USA)

T4 DNA Ligase buffer (5x) (kat. číslo 46300-018; Invitrogen, USA)

T4 DNA Ligáza (5 U/μl) (kat. číslo 15224-041; Invitrogen, USA)

Taq DNA polymeráza (kat. číslo M0273S; New England Biolabs, USA)

Tris base (kat. číslo 648310; Merck, Německo)

Trypanová modř (0,4% roztok) (kat. číslo T10282; Thermo Fisher Scientific, USA)

Trypsin-EDTA, roztok (1x) (kat. číslo 59428C; Thermo Fisher Scientific, USA)

Tween-20 (kat. číslo 37470.01; SERVA, Německo)

4.1.3 Komerční soupravy

ABC Total Antibody Compensation Bead Kit (kat. číslo A10513; Invitrogen, USA)

Amaxa Cell line Nucleofector Kit V (kat. číslo VCA-1003; Lonza, Německo)

Pierce BCA Protein Assay Kit (kat. číslo 23227; Thermo Fisher Scientific, USA)

Plasmid Plus Midi Kit (kat. číslo 19243, 12945; Qiagen, USA)

4.1.4 Roztoky, pufrы, média

10x PBS pufr: 1,37 mol·l⁻¹ NaCl, 27 mmol·l⁻¹ KCl, 37 mmol·l⁻¹ NaH₂PO₄·12H₂O, 15 mmol·l⁻¹ KH₂PO₄; pH = 7,4

1x PBS pufr: 100 ml 10x PBS pufr, doplněno destilovanou vodou do 1000 ml

(Pozn.: Pro tkáňové kultury byl použit Dulbecco's PBS pufr (1x))

Kultivace *E. coli*

LB médium tekuté: 6,25 g LB médium, doplněno destilovanou vodou do 250 ml

LB médium tuhé: 2,5 g LB médium, 1,5 g agar, doplněno destilovanou vodou do 100 ml

Horizontální agarózová elektroforéza

50x TAE pufr: 2 mol·l⁻¹ Tris, 1 mol·l⁻¹ kyselina octová, 50 mmol·l⁻¹ EDTA; pH = 8

1x TAE pufr: 20 ml 50x TAE pufr, doplněno destilovanou vodou do 1000 ml

Imunoafinitní purifikace

Promývací pufr: 50 mmol·l⁻¹ NaH₂PO₄·2H₂O, 300 mmol·l⁻¹ NaCl, 10 mmol·l⁻¹ Imidazol, 0,05% (v/v) Tween 20; pH = 8

Eluční pufr: 50 mmol·l⁻¹ NaH₂PO₄·2H₂O, 300 mmol·l⁻¹ NaCl, 200 mmol·l⁻¹ Imidazol, 0,05% (v/v) Tween 20; pH = 8

SDS-PAGE

30% (w/v) akrylamid-bisakrylamid: 75 g akrylamid, 2 g bisakrylamid, doplněno destilovanou vodou do 1000 ml

5x SDS elektrodový pufr: 125 mmol·l⁻¹ Tris, 0,960 mol·l⁻¹ glycin, 17 mmol·l⁻¹ SDS

1x SDS elektrodový pufr: 100 ml 5x SDS elektrodový pufr, doplněno destilovanou vodou do 500 ml

2x SDS vzorkovací pufr: 125 mmol·l⁻¹ Tris, 15,9% (v/v) glycerol, 160 mmol·l⁻¹ SDS, 10% (v/v) merkptoethanol, 0,01% (w/v) bromfenolová modř; pH = 6,8

Pufr pro separační gel: 1,5 mol·l⁻¹ Tris, 12 mmol·l⁻¹ SDS; pH = 8,8

Pufr pro zaostřovací gel: 0,5 mol·l⁻¹ Tris, 12 mmol·l⁻¹ SDS; pH = 6,8

Barvení a odbarvování proteinů

Fixační roztok: 25% (v/v) isopropanol, 10% (v/v) kyselina octová

Barvicí roztok: 10% (v/v) kyselina octová, 40% (v/v) methanol, 0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250

Odbarvovací roztok: 5% (v/v) methanol, 7% (v/v) kyselina octová

Průtoková cytometrie

Barvicí roztok (roztok FBS v 5% PBS): 2,5 µl FBS, 47,5 µl 5% PBS, 0,5 µl barvivo Fixable Viability Dye, 5 µl monoklonální protilátky konjugované s fluorochromem (anti- CD40-PE, CD80-PE-cy5, CD86-PE-cy7, CD11c-eFluor506, MHCI-eFluor450, MHCII-PE-eFluor610)

4.1.5 Přístroje a zařízení

Automatické pipety (Thermo Fisher Scientific, USA)

Centrifuga stolní chlazená MIKRO 22R (Hettich, Německo)

Centrifuga stolní chlazená ROTINA 380R (Hettich, Německo)

Elektroforetický systém Mini Gel Owl EasyCast B2 (Thermo Fisher Scientific, USA)

Elektroforetický systém Mini PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad,; USA)

Fluorescenční mikroskop DM6 B (Leica, Německo)

Horizontálně plněný stolní autokláv DX90 (Systec, Německo)

Inkubátor CO₂ MCO-170AIC-PE (Panasonic, Japonsko)

Inkubátor s aktivním chlazením (5 °C–40 °C) MIR153 (Sanyo, Japonsko)

Kultivační materiál pro tkáňové linie (VWR International, USA)

Laboratorní váhy 440-33N (KERN, Německo)

Laminární box LC2.12 (Thermo Fisher Scientific, USA)

Mikroskop inverzní fluorescenční FILM (Intraco Micro, ČR)

Mikroskop pro počítání buněk Standard 20 (Opton, Německo)
Multidetekční reader Synergy HTX (BioTek, USA)
Multifunkční chlazená centrifuga MPW 3523 (MPW MED. Instruments, Polsko)
pH metr 210 (Hanna Instruments, ČR)
Pipetor (Hirschmann, Německo)
Spektrální průtokový cytometr SP6800 (Sony Biotechnology, USA)
Termoblok SBH130D Stuart (Thermo Fisher Scientific, USA)
Termocycler Biometra (Analytik Jena, Německo)
Třepačka s inkubátorem TH30 (Edmund Bühler GmbH, Německo)
Třepačka Vortex MS 3 basic (IKA, Německo)
Tube Roller CRR-08X (Capp, Německo)
UV transiluminátor G:Box (Syngene, Spojené Království)
Vivaspin 2 centrifugal concentrators, 10 000 MWCO (kat. číslo VS0202; Sartorius, Německo)
Vodní lázeň SUB14 (Grant Instruments, Spojené Království)
Vortex KS 130 basic (IKA, Německo)
Výrobník ledu CB 316 (Brema Ice Markers, ČR)
Zdroj pro elektroforézu PowerPac Basic (Bio-Rad, ČR)

4.1.6 Počítačový software a programy

BioEdit

FlowJo

GeneSnap (Syngene, Spojené Království)

GraphPad Prism 5.0

ChopChop

ImageJ

SnapGene viewer

4.2 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.2.1 Příprava CRISPR/Cas9 vektoru pro knock-out manóзовého receptoru MRC1

4.2.1.1 Primery

Pomocí online softwaru ChopChop (chopchop.cbu.uib.no) byla vybrána cílová nukleotidová sekvence genu *MRC1* kódujícího manóзовý receptor typu C1 (Tabulka 1), na jejímž základě byl poté navržen jeden pár jednovláknových DNA oligonukleotidů s fosforylovanými 5' konci (Tabulka 2). Primery byly syntetizované firmou Generi Biotech, ČR.

Tabulka 1 Vybraná cílová sekvence genu *MRC1*.

| Cílová sekvence | Vláknno | GC (%) | Off-targets | | | | Účinnost (%) |
|-------------------------|--------------|--------|-------------|---|---|---|--------------|
| | | | 0 | 1 | 2 | 3 | |
| GTACCGGAGGGTGCAGACAAAGG | kódující (+) | 60 | 0 | 0 | 0 | 0 | 64,53 |

Tučně zvýrazněná trojice nukleotidů v cílové sekvenci je PAM sekvence. Sloupec „Vláknno“ znázorňuje lokalizaci cílové sekvence na vlákně. Sloupec „GC“ ukazuje procentuální obsah guaninu a cytosinu. Sloupec „Off-targets“ znázorňuje počet potenciálních mimocílových vazeb, čímž dochází ke štěpení DNA sekvencí mimo sekvence zájmu. Sloupec „Účinnost“ ukazuje účinnost štěpení endonukleázy Cas9.

Tabulka 2 Sekvence DNA oligonukleotidů pro tvorbu sgRNA.

| | Sekvence (5' → 3') |
|------------------|---------------------------|
| Oligonukleotid 1 | CACCGTACCGGAGGGTGCAGACAA |
| Oligonukleotid 2 | AAACTTGTCTGCACCCTCCGGTACC |

4.2.1.2 Komplementární spojení oligonukleotidových párů

Navržené jednovláknové oligonukleotidy bylo nutno hybridizovat za vzniku dvouřetězcové molekuly. Syntetizované oligonukleotidy byly nejdříve rozpuštěny v předem určeném objemu deionizované vody (ddH₂O) na koncentraci 100 pmol·μl⁻¹ (uvedeno od výrobce). Reakční směs byla připravena podle Tabulky 3. Hybridizace oligonukleotidů probíhala za následujících podmínek: v 37 °C po dobu 30 minut, 95 °C na 5 minut a poté byla teplota postupně snižována na pokojovou teplotu.

Tabulka 3 Složení reakční směsi pro komplementární spojení DNA oligonukleotidů.

| Složka reakce | Počáteční koncentrace | Finální koncentrace | Objem [μ l] |
|--------------------|-------------------------------------|------------------------------------|------------------|
| Ligační pufr | 5x | 1x | 2 μ l |
| Oligonukleotid 1 | 100 pmol $\cdot\mu$ l ⁻¹ | 10 pmol $\cdot\mu$ l ⁻¹ | 1 μ l |
| Oligonukleotid 2 | 100 pmol $\cdot\mu$ l ⁻¹ | 10 pmol $\cdot\mu$ l ⁻¹ | 1 μ l |
| ddH ₂ O | - | - | 6 μ l |
| Celkem | | | 10 μ l |

4.2.1.3 Ligace do vektoru pX458

Hybridizované oligonukleotidy byly ligovány do linearizovaného vektoru pX458 pomocí T4 DNA ligázy. Roztok ligázy byl připraven smísením 2 μ l ligačního pufru, 1 μ l T4 DNA ligázy a 7 μ l ddH₂O. Ligační reakce zprvu probíhala při 37 °C po dobu 30 minut a poté při 16 °C přes noc. Druhý den byla reakce inaktivována přidáním 1 μ l 0,5mol \cdot l⁻¹ EDTA. Složení ligační reakce ukazuje Tabulka 4.

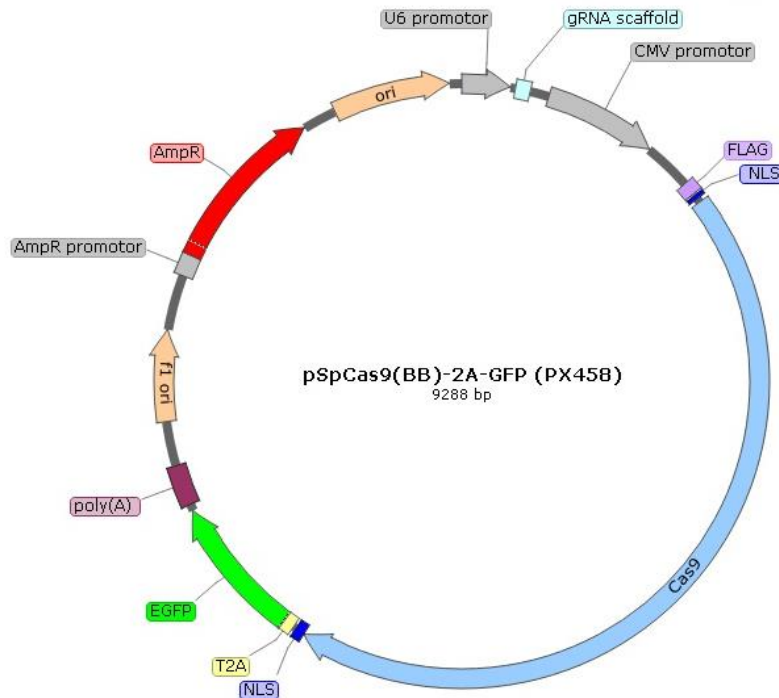
Tabulka 4 Složení reakční směsi pro ligaci oligonukleotidů do vektoru pX458.

| Složka reakce | Objem [μ l] |
|------------------------------------|------------------|
| Linearizovaný vektor pX458 (20 ng) | 2,5 |
| Hybridizované oligonukleotidy | 1 |
| 5x ligační pufr | 4 |
| T4 DNA ligáza | 1 |
| ddH ₂ O | 11,5 |
| Celkem | 20 |

4.2.1.4 pSpCas9(BB)-2A-GFP (pX458) vektor

Vektor pSpCas9(BB)-2A-GFP nazývaný také jako pX458 je klonovací vektor o velikosti 9288 bp obsahující replikační počátek ori a řádový replikační počátek fl. Součástí vektoru je také U6 promotor zajišťující expresi sgRNA, CMV promotor neboli promotor lidského viru *Cytomegalovirus*, dále gen pro endonukleázu Cas9, restriční místo pro vložení DNA inzertu a selekční marker. V případě vektoru pX458 je selekčním markerem gen pro rezistenci k antibiotiku ampicilin (Amp^R). Vektorový systém dále obsahuje poly(A) oblast a samovolně se štěpící peptid 2A z viru *Thossea asigna* (T2A), který během translace proteinu indukuje ribozomální přeskočení peptidové vazby mezi glycinem a prolinem. Součástí endonukleázy Cas9 je FLAG značka obsahující aminokyselinovou sekvenci DYKDDDDK (D - kyselina asparagová, Y - tyrosin, K - lysin). Díky FLAG značce je protein exprimován téměř ve všech prokaryotních a eukaryotních buňkách (Einhauer *et* Jungbauer, 2001). NLS značí jaderný lokalizační signál, který se podílí na transportu endonukleázy Cas9 do buňky.

Vektor pX458 se také vyznačuje expresí genu pro GFP, který při vystavení UV světlu fluoreskuje zeleně. GFP funguje jako reportérový gen umožňující vizualizovat expresi proteinů (Obrázek 11).



Obrázek 11 Schématické znázornění vektoru pX458.

4.2.1.5 Transformace kompetentních buněk *E. coli*

Klonovací vektor pX458 se zaligovanými oligonukleotidy byl transformován do kompetentních buněk *E. coli* kmene DH5 α . Práce s buňkami probíhala ve sterilním prostředí. Připravené kompetentní bakterie (25 μ l) byly rozmrazeny na ledu a poté k nim bylo přidáno 5 μ l ligační směsi. Transformační směs byla lehce promíchána a inkubována 30 minut na ledu. Po inkubaci byla provedena transformace teplotním šokem („heat-shock“), kdy zkumavka byla vložena do termobloku vyhřátého na 42 $^{\circ}$ C po dobu 30 sekund. Po uplynutí doby byly zkumavky ihned přemístěny na led po dobu 5 minut. Následně bylo ke směsi přidáno 300 μ l SOC média a celá směs byla inkubována na rotační třepačce po dobu 1 hodiny při teplotě 37 $^{\circ}$ C. Suspenzní kultura transformovaných bakterií byla inokulována na povrch pevného Luria-Bertani (LB) média obsahujícího ampicilin o koncentraci 100 μ g \cdot ml $^{-1}$ a inkubována při 37 $^{\circ}$ C přes noc.

4.2.1.6 Kontrolní PCR

Pro ověření přítomnosti oligonukleotidů ve vektoru pX458 byla provedena PCR reakce s primery navržených pro klonovaný úsek DNA (Tabulka 5). Jako templátová DNA byly

použity narostlé kolonie. Sterilní špičkou bylo odebráno a přeneseno malé množství bíle zbarvených kolonií do připravené PCR reakční směsi (Tabulka 6). Každá odebraná kolonie byla označena na Petriho misce číslem, pro pozdější zpětnou identifikaci. Reakce probíhala za specifických podmínek, které jsou shrnuty v Tabulce 7. Získané PCR produkty byly smíchány s 5 μl 6x vzorkovacího pufru a analyzovány pomocí horizontální elektroforézy v 2% agarózovém gelu. Očekávaná velikost PCR produktu byla 317 bp.

Tabulka 5 Nukleotidové sekvence použitých primerů pro kontrolní PCR.

| Primer | Sekvence (5' → 3') |
|---------|---------------------------|
| Forward | CTGGCCTTTTGCTCACATGT |
| Reverse | AAACTTGTCTGCACCCTCCGGTACC |

Tabulka 6 Složení PCR reakční směsi pro ověření přítomnosti DNA inzertu ve vektoru pX458.

| Složka reakce | Počáteční koncentrace | Finální koncentrace | Objem [μl] |
|---------------------------|--|--------------------------------------|-------------------------|
| Standard <i>Taq</i> pufr | 10x | 1x | 2,5 |
| dNTPs | 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ | 0,2 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ | 0,5 |
| Reverse primer | 100 $\text{pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ | 2 $\text{pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ | 0,5 |
| Forward primer | 100 $\text{pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ | 2 $\text{pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ | 0,5 |
| <i>Taq</i> DNA polymeráza | 5 $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ | 1 $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ | 0,125 |
| ddH ₂ O | - | - | 20,9 |
| Celkem | | | 25 |

Tabulka 7 Podmínky PCR reakce.

| Proces | Teplota [$^{\circ}\text{C}$] | Čas [s] | Počet cyklů |
|----------------------|--------------------------------|----------|-------------|
| Počáteční denaturace | 95 | 300 | 1x |
| Denaturace | 95 | 30 | 30x |
| Annealing | 58 | 30 | |
| Elongace | 68 | 60 | |
| Konečná elongace | 68 | 300* | 1x |
| Chlazení | 4 | ∞ | 1x |

Symbol *značí čas, který je doporučený pro PCR z kolonií.

4.2.1.7 Izolace plazmidové DNA

Positivně detekované klony vybrané po PCR amplifikaci byly použity pro další analýzy. Byla provedena kultivace v tekutém médiu a izolace plazmidové DNA podle protokolu Plasmid Plus Midi Kit od firmy QIAGEN. Do sterilní plastové zkumavky určené pro kultivaci bakterií bylo přeneseno 5 ml tekutého LB média s ampicilinem. Do média byla poté nanášena bakteriální kolonie s pozitivně detekovaným vklonovaným inzertem a takto připravená kultura

byla inkubována při 37 °C na třepačce (300 rpm) po dobu 8 hodin. Po uplynulé době byla bakteriální kultura přenesena do 100 ml tekutého LB média s ampicilinem. Inkubace probíhala při 37 °C na třepačce (300 rpm) přes noc. Následující den po inkubaci byla narostlá suspenzí bakteriální kultura centrifugována při 4820 g a 4 °C po dobu 3 minut. Supernatant byl odsát a pelet resuspendován ve 4 ml P1 pufru obsahujícího RNázu A. Buňky byly lyzovány přidáním 4 ml P2 pufru, suspenze byla promíchána převrácením zkumavky a inkubována při pokojové teplotě po dobu 3 minut. Vzniklý lyzát byl neutralizován 4 ml S3 pufru a zkumavka se suspenzí byla ihned převrácena, dokud se modrý roztok nezměnil na bezbarvý. Buněčný lyzát byl následně přenesen do QIAfilter kazety, která byla předtím ekvilibrována BB pufrem. Buněčný lyzát byl inkubován 10 minut při pokojové teplotě. Během inkubace byly připraveny Qiagen Plasmid Plus Midi spin kolonky, které byly umístěny do QIAvac 24 Plus, nepoužívané otvory QIAvac 24 Plus byly utěsněny zátkami. Po inkubační době byl buněčný lyzát přefiltrován do nové zkumavky a k přečištěnému lyzátu bylo přidáno 2 ml BB pufru. Po důkladném promíchání byl buněčný lyzát přenesen do již připravených kolonek, následně byl zapnutý zdroj vakua (300 mbar) a po nasátí kapaliny všemi kolonkami byl zdroj vakua vypnutý. K promytí DNA bylo do kolonky přidáno 0,7 ml ETR pufru. Poté byl opět zapnutý zdroj vakua, dokud kapalina nebyla nasáta všemi kolonkami. Tento krok byl zopakován ještě jednou s tím rozdílem, že bylo přidáno 0,7 ml PE pufru. Pro úplné odstranění promývacího pufru byla kolonka centrifugována 1 minutu při 10 000 g. Kolonky byly přeneseny do čistých 1,5ml mikrozkušavek. Plazmidová DNA byla eluována do 200 µl EB pufru, který byl nanesen do středu kolonky. Kolonka byla s EB pufrem inkubována 1 minutu při laboratorní teplotě a poté byla 1 minutu centrifugována.

4.2.1.8 Stanovení koncentrace a čistoty plazmidové DNA

Koncentrace a čistota plazmidové DNA byla změřena spektrofotometricky na přístroji Nanodrop. Měřicí ploška přístroje byla očištěna destilovanou vodou. Kalibrace přístroje byla provedena pomocí EB pufru. Vzorek DNA byl na měřicí plošku přístroje nanesen v objemu 2 µl. Měření probíhalo při laboratorní teplotě. Hodnoty absorbancí byly změřeny při vlnových délkách 260 a 280 nm. Čistota DNA byla určena z poměru absorbancí při 260 a 280 nm, která by měla v případě čisté DNA odpovídat hodnotě 1,7–1,9. Hodnota nižší než 1,7 ukazuje na DNA znečištěnou proteiny nebo organickými látkami, hodnota vyšší než 1,9 pak značí DNA znečištěnou RNA nebo organickými látkami.

4.2.1.9 Restrikční analýza

Izolovaná plazmidová DNA byla následně podrobena restrikční analýze pomocí restrikčních endonukleáz ve vhodném pufru (Tabulka 8, 9). Restrikční endonukleázy byly

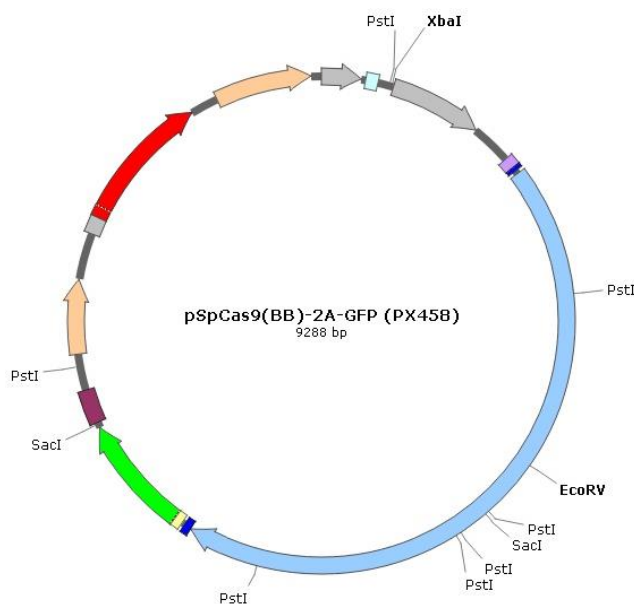
navrženy tak, aby bylo možné ověřit úspěšnost ligace DNA inzertu do vektoru pX458. Restriční místa zvolených endonukleáz ve vektoru pX458 ukazuje Obrázek 12. Připravená restriční směs byla inkubována při 37 °C po dobu 1 hodiny. Získané produkty restrikce byly smíchány s 2,5 µl 6x vzorkovacího pufru a analyzovány pomocí horizontální elektroforézy v 0,7% agarózovém gelu.

Tabulka 8 Obecné složení restriční směsi pro ověření přítomnosti DNA inzertu ve vektoru pX458.

| Složka reakce | Objem [µl] |
|--------------------------------------|------------|
| Pufr (10x) | 1,5 |
| Enzym | 0,5 |
| Plazmidová DNA | 0,5 |
| Doplněno ddH ₂ O do 15 µl | |

Tabulka 9 Přehled použitých restričních endonukleáz a pufrů pro restriční analýzu plazmidové DNA za účelem ověření přítomnosti DNA inzertu ve vektoru pX458.

| Enzym | Pufr (10x) | Velikosti fragmentů [bp] |
|----------------------------|--------------|---------------------------------------|
| <i>SacI</i> | NEBuffer 1.1 | 2712, 6576 |
| <i>EcoRV</i> + <i>XbaI</i> | NEBuffer 3.1 | 2792, 6496 |
| <i>PstI</i> | NEBuffer 3.1 | 30, 204, 1212, 1422, 1661, 1743, 3016 |



Obrázek 12 Restriční místa endonukleáz (*SacI*, *PstI*, *EcoRV*, *XbaI*) ve vektoru pX458.

4.2.1.10 Horizontální agarózová elektroforéza

Produkty kontrolní PCR amplifikace a restrikční analýzy byly vyhodnoceny pomocí horizontální elektroforézy v 2% a 0,7% agarózovém gelu připraveného podle Tabulky 10. Do připravené elektroforetické aparatury s hřebínkem byl nalit rozvařený roztok agarózy. Po zatuhnutí gelu byla elektroforetická komůrka naplněna 1x TAE pufrem tak, aby se převrstvil celý gel, a poté byl z gelu vyjmut hřebínek. Do jamek gelu bylo nanášeno 15 µl připravených vzorků a 4 µl markeru molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA ladder. Elektroforetická komůrka byla uzavřena a připojena ke zdroji napětí. Elektroforéza produktů kontrolní PCR amplifikace probíhala 30 minut při 130 V a elektroforéza produktů restrikční analýzy 60 minut při 130 V. Po proběhnutí elektroforézy byl gel obarven v GelRedu a vizualizován pomocí UV transiluminátoru.

Tabulka 10 Složení 2% a 0,7% agarózového gelu pro horizontální elektroforézu.

| Složka | 2% agarózový gel | 0,7% agarózový gel |
|-------------------------|------------------|--------------------|
| Agaróza [g] | 2,4 | 0,7 |
| 50x TAE pufř [ml] | 2,4 | 1,4 |
| ddH ₂ O [ml] | 120 | 100 |

4.2.2 Příprava rekombinantního proteinu RBDS

4.2.2.1 Exprese a purifikace proteinu

Vektor kódující RBD doménu spike proteinu (dále jen RBDS) přítomného na povrchu viru SARS-CoV-2 byl připraven v plazmidu, který umožnil rekombinantní expresi v savčím systému Free style 293F buněk.

Rekombinantní protein obsahoval na svém konci histidinovou značku. Díky této značce byl protein ze supernatantu transfekovaných buněk purifikován pomocí chelatační afinitní chromatografie. Jako pevný nosič byla použita agaróza s imobilizovanou kyselinou nitriotrioctovou (NTA), která chelatuje nikelnaté ionty (Ni²⁺). Purifikace probíhala za nativních podmínek při teplotě 5 °C. Supernatant obsahující proteiny byl přenesen do nové zkumavky a byla k němu přidána Ni-NTA agaróza. Směs byla inkubována přes noc při 4 °C za neustálého pomalého rotování. Druhý den byla zkumavka se supernatantem umístěna do svislé polohy po dobu 15 minut, aby došlo k usazení Ni-NTA agarózy. Následně byl supernatant s usazenou agarózou postupně nanášen na kolonu. Kolona byla poté promyta 15 ml promývacího pufřu a navázané proteiny byly eluovány z kolony 600 µl elučního pufřu. Dílčí frakce byly sbírány.

Ze všech jednotlivých frakcí bylo vždy odebráno 30 μl pro následnou analýzu pomocí vertikální elektroforézy v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE).

4.2.2.2 Zakoncentrování proteinu

Zbývající eluční frakce purifikovaného proteinu byly slity do jedné společné zkumavky. Celkový objem eluátů byl 3490 μl . K zakoncentrování proteinu byla použita speciální koncentrační zkumavka s ultrafiltrační membránou (10 kDa MWCO), která byla nejdříve naplněna vychlazeným fosfátovým pufrům (PBS, z angl. phosphate buffered saline) a centrifugována při 4000 g a 4 °C po dobu 5 minut. Po centrifugaci byl všechnen PBS pufr vylit do odpadu. Do zkumavky bylo postupně pipetováno maximální množství vzorku. Následovala centrifugace při 4000 g a 4 °C do doby zakoncentrování na objem 150 μl . Zakoncentrovaný protein byl přepipetován do čisté mikrozkušavky a k němu bylo přidáno 150 μl PBS. Celkový objem zakoncentrovaného proteinu byl 300 μl .

4.2.2.3 SDS-PAGE

Pro SDS-PAGE byla použita skla o průměru 0,75 mm, která byla nejprve očištěna 96% ethanolem a poté upevněna do elektroforetického stojanu pro nalévání gelu. Purifikovaný protein byl separován v 10 % separačním gelu a v 4 % zaostřovacím gelu. Příprava separačního a zaostřovacího gelu je uvedena v Tabulce 11. Nejdříve byl připraven separační gel, který byl po přidavku persíranu amonného a TEMEDu rychle nanesen do prostoru mezi skly a ihned převrstven n-butanolem. Polymerace gelu probíhala 20 minut. Po zatuhnutí separačního gelu byl n-butanol odstraněn a povrch gelu byl několikrát opláchnut destilovanou vodou a zbytek vody byl vysušený filtračním papírem. Následně byl separační gel převrstven zaostřovacím gelem a do gelu byl zasazen hřebínek. Po zatuhnutí zaostřovacího gelu (20 minut) byla skla s připraveným gelem vložena do elektroforetické komůrky, která byla naplněna 1x SDS elektrodoým pufrům. Z gelu byl poté vyjmut hřebínek.

Vzorky byly připraveny smícháním s 2x SDS vzorkovacím pufrům v poměru 1 : 1 a inkubovány 5 minut při teplotě 95 °C. Po uplynutí stanovené doby byly vzorky nanesený do jamek gelu. Do první jamky gelu bylo pipetováno 5 μl markeru molekulové hmotnosti PageRuler Plus Prestained Protein Ladder a do ostatních jamek 9,5 μl připravených vzorků. Po nanesení vzorků a markeru na gel byla elektroforetická komůrka uzavřena a připojena ke zdroji napětí. Elektroforéza probíhala nejprve při napětí 100 V a po doputování zóny bromfenolové modři na rozhraní zaostřovacího a separačního gelu (20 minut) bylo napětí nastaveno na 120 V. Po doputování zóny bromfenolové modři ke spodnímu okraji gelu (45 minut) byl zdroj napětí vypnut. Po ukončení elektroforézy byl gel vyjmut z elektroforetické

komůrky a přenesen do nádoby obsahující fixační roztok. Nádoba byla umístěna na třepačku. Po 5 minutách byl fixační roztok vyměněn za barvicí roztok Coomassie Brilliant Blue R-250, který byl po 30 minutách vyměněn za roztok odbarvovací. Odbarvování gelu probíhalo do druhého dne, kdy byl gel následně vizualizován pomocí skeneru. Očekávaná molekulová hmotnost proteinu RBDS byla 30 kDa.

Tabulka 11 Složení 10% separačního a 4% zaostřovacího gelu pro SDS-PAGE.

| Složka | Separační gel (10 %) | Zaostřovací gel (4 %) |
|---------------------------------------|----------------------|-----------------------|
| 30% A/B [ml] | 5 | 1,3 |
| Pufr pro separační gel, pH 8,8 [ml] | 3,75 | - |
| Pufr pro zaostřovací gel, pH 6,8 [ml] | - | 2,5 |
| ddH ₂ O [ml] | 6,25 | 6,2 |
| 10% persíran amonný [μl] | 75 | 50 |
| TEMED [μl] | 15 | 10 |

4.2.2.4 Stanovení koncentrace proteinu metodou BCA

Koncentrace zakoncentrovaného proteinu RBDS byla stanovena podle protokolu Pierce BCA Protein Assay Kit využívající kyselinu bicinchoninovou (BCA, z angl. bicinchoninic acid). Jako standardy byly použity roztoky hovězího sérového albuminu (BSA; z angl. bovine serum albumine) o koncentraci v rozmezí 25–2000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Tabulka 12). Vzorky zakoncentrovaného proteinu byly naředěny PBS pufrem podle Tabulky 13. Do jamek mikrotitrační destičky bylo napipetováno 10 μl standardu a 10 μl vzorku proteinu. Standardy byly pipetovány ve dvou opakováních (dubletech). Následně bylo přidáno 200 μl pracovního činidla BCA, které bylo připraveno smícháním činidla A (uhličitan sodný, hydrogenuhličitan sodný, kyselina bicinchoninová, vinan sodný v 0,1mol·l⁻¹ hydroxidu sodném) a činidla B (4% síran měďnatý) v poměru 50 : 1, tj. 5 ml činidla A a 100 μl činidla B. Destička byla promíchána a inkubována při 37 °C po dobu 30 minut. Po inkubaci byla pomocí spektrofotometru změřena absorbance při vlnové délce 562 nm. Z naměřených hodnot byla sestrojena kalibrační křivka standardních roztoků BSA. Koncentrace proteinu RBDS byla poté odečtena z rovnice lineární regrese.

Tabulka 12 Příprava standardních roztoků BSA.

| Mikrozkumavka | Objem destilované vody [μl] | Objem [μl] a zdroj roztoku BSA | Finální koncentrace BSA [μg·ml ⁻¹] |
|---------------|-----------------------------|--------------------------------|--|
| A | 0 | 300 ZR | 2000 |
| B | 125 | 375 ZR | 1500 |
| C | 325 | 325 ZR | 1000 |
| D | 175 | 175 B | 750 |
| E | 325 | 325 C | 500 |
| F | 325 | 325 E | 250 |
| G | 325 | 325 F | 125 |
| H | 400 | 100 G | 25 |
| I | 400 | 0 | 0 = slepý vzorek |

Standardy A–C byly připraveny pomocí zásobního roztoku BSA (ZR). Standardy D–I byly připraveny ředěním standardů A–C.

Tabulka 13 Příprava vzorků zakoncentrovaného proteinu RBDS pro jeho kvantifikaci BCA metodou.

| Mikrozkumavka | Ředění | Objem proteinu [μl] | Objem PBS pufru [μl] |
|---------------|--------|---------------------|----------------------|
| 1 | 10x | 1 | 9 |
| 2 | 2x | 5 | 5 |
| 3 | 1x | 10 | 0 |

4.2.2.5 Stanovení koncentrace metodou denzitometrie proužků na gelu pro SDS-PAGE

Denzitometrická kvantifikace nezakoncentrovaného a zakoncentrovaného proteinu RBDS byla provedena pomocí kalibrační řady BSA (2; 1; 0,5; 0,25; 0,125 μg/jamku), která byla připravena postupným ředěním zásobního roztoku BSA o koncentraci 1 mg·ml⁻¹. Pro SDS-PAGE analýzu bylo vždy odebráno 4 μl vzorku standardu BSA. Dále byly připraveny jednotlivé vzorky proteinu. Vzorek nezakoncentrovaného proteinu byl připraven smícháním s PBS v poměru 1 : 3, tj. 1 μl proteinu a 3 μl PBS. Vzorek zakoncentrovaného proteinu byl nejprve 10x naředěn v PBS pufru (1 μl proteinu a 9 μl PBS) a poté bylo odebráno 4, 2, 1, 0,5 μl vzorku a objem byl vždy doplněn PBS pufrem do 4 μl. Takto připravené vzorky proteinu a standardu byly smíchány s 4 μl 2x SDS vzorkovacího pufru a inkubovány 5 minut při teplotě 95 °C. Po inkubaci byly všechny připravené vzorky nanесeny do jamek gelu pro SDS-PAGE. Do první jamky gelu bylo pipetováno 5 μl markeru molekulové hmotnosti PageRuler Plus Prestained Protein Ladder a do ostatních jamek 8 μl připravených vzorků. Elektroforéza probíhala za stejných podmínek jako je popsáno v kapitole 4.2.2.3. Následně byla provedena denzitometrická analýza výsledného gelu v programu ImageJ. Koncentrace proteinu byla stanovena podle intenzity příslušných proužků v porovnání s proužky standardních roztoků

BSA o známé koncentraci. V závislosti na výsledné koncentraci proteinu bylo určeno, jaký objem proteinu použít pro následnou pulzaci buněk rekombinantním proteinem RBDS a sadou inhibitorů buněčného zpracování antigenu viz kapitola 4.2.4.1.

4.2.3 Práce se savčími liniemi

Pro kultivaci byla použita adherentní buněčná linie cDC1 MutuDC. Jakákoli manipulace s buňkami probíhala za sterilních podmínek v laminárním boxu. Buňky byly nejdříve kultivovány v kultivačním panelu a poté v plastových kultivačních lahvích v inkubátoru při 37 °C a 5% CO₂ v kompletním Iscove's Modified Dulbecco's médiu (IMDM), které obsahovalo 8% fetální bovinní sérum (FBS, z angl. fetal bovine serum), 1% směs antibiotik streptomycin/penicilin, 50 μmol·l⁻¹ 2-merkaptoethanol.

4.2.3.1 Rozmražení buněčné linie

Kryozkumavka s 1 ml zmražené buněčné suspenze byla samovolně rozmrazena a přenesena do čisté 15ml zkumavky. K buněčné suspenzi byl přidán PBS pufr a buňky byly centrifugovány při 250 g a laboratorní teplotě po dobu 5 minut. Supernatant byl odsát a pelet buněk byl resuspendován v čerstvém IMDM médiu. Buňky byly poté přeneseny do 6 jamkového kultivačního panelu a vloženy do inkubátoru.

4.2.3.2 Pasážování buněčné linie

Buňky byly pasážovány 2–3x za týden podle konfluence. Optimální zaplnění dna kultivační nádoby je 50–80 %. Médium bylo odsáto a buňky byly dvakrát promyty PBS pufrém. Poté bylo přidáno 350 μl trypsinu a buňky byly uloženy přibližně na 1 minutu do inkubátoru, aby došlo k jejich uvolnění ze dna kultivační lahve a od sebe navzájem. Po uplynutí doby byly buňky kontrolovány světelným mikroskopem, a pokud byly uvolněné, bylo přidáno nahřáté čerstvé kompletní IMDM médium. Následně byla třetina buněk přenesena do nové kultivační lahve. K buňkám bylo přidáno čerstvé IMDM médium a buňky byly vloženy do inkubátoru.

4.2.3.3 Počítání buněk

Pro počítání buněk byla použita Bürkerova komůrka, která je tvořena dvěma počítacími stěnami. Počítací síť jsou trojitou linií rozděleny na 9 velkých čtverců o ploše 1 mm². Každý čtverec je pak dvojitými liniemi rozdělen do 16 menších čtverců s plochou 0,04 mm². Buněčná suspenze byla přenesena do plastové zkumavky. K těmto buňkám byl přidán PBS pufr a buňky byly centrifugovány při 250 g a laboratorní teplotě po dobu 5 minut. Supernatant byl odstát a buněčný pelet byl resuspendován v 1 ml čerstvého IMDM média. Do nové mikrozkuavky bylo napipetováno 10 μl vzniklé buněčné suspenze a 10 μl trypanové

modře. Na hranu krycího sklíčka Bürkerovy komůrky bylo napipetováno 15 μ l připravené směsi. Pomocí světelného mikroskopu byl spočítán počet živých buněk v jednom velkém čtverci ohraničeném trojitou linií. Živé buňky zůstávají bezbarvé, mrtvé buňky se v roztoku barví modře. Při počítání buněk byly započítány pouze živé buňky nacházející se uvnitř čtverce a buňky, které leží nebo se dotýkají dvou stanovených hran (např. horní a levá). Počet živých buněk v 1 ml buněčné suspenze byl vypočítán ze vzorce:

Počet živých buněk/ml = stanovený počet živých buněk ve velkém čtverci $\times 2 \times 10^4$

4.2.3.4 Transfekce buněk cDC1 MutuDC

Nástroj CRISPR/Cas9 byl využit k přípravě *TAP1* a *B2M* knock-outovaných linií. Pro tyto účely byly MutuDC buňky transfekovány vektorem pX458 nesoucí sekvenci kódující sgRNA, která navádí protein Cas9 k cílové sekvenci a indukuje tak změnu v genech *TAP1* a *B2M*. Transfekce byla provedena metodou nukleofekce podle protokolu Amaxa Cell line Nucleofector Kit V. Nukleofekce funguje na principu elektroporace, kdy krátký elektrický impuls vytvoří v buněčné membráně pór, přes který může DNA vstoupit do buňky. V elektroporačním přístroji jsou přednastavené programy, které se volí v závislosti na studované buněčné linii. Transfekce metodou nukleofekce nebyla pro buněčnou linii cDC1 MutuDC doposud optimalizována a prozatím neexistují doporučení pro vyhovující elektroporační program. Z tohoto důvodu byl program vybrán na základě podobnosti s buněčnými liniemi, u nichž byla metoda nukleofekce již optimalizována a publikována. Pro transfekci MutuDC buněk byl zvolen program D-032 a U-001. Celkem bylo provedeno šest transfekčních reakcí, a to tři reakce s programem D-032 a tři reakce s programem U-001.

Den před transfekcí bylo do 6 jamkového panelu nasazeno 2×10^5 buněk/jamku v 1 ml IMDM média. Buňky byly inkubovány při 37 °C a 5% CO₂. V den transfekce byly buňky trypsinizovány a přeneseny do sterilní plastové zkumavky. Buňky byly centrifugovány při 250 g a laboratorní teplotě po dobu 5 minut. Supernatant byl odsát a vzniklý pelet buněk byl resuspendován v 50 μ l transfekčního roztoku (Nucleofector Solution V), který byl připraven smícháním 41 μ l Nucleofector Solution V s 9 μ l Nucleofector Supplement. K buněčné suspenzi byla přidána příslušná plazmidová DNA. Jako pozitivní kontrola byla použita buněčná suspenze s přídatkem plazmidu pMax-GFP. Suspenze byla přenesena do kyvety. Kyveta byla posléze vložena do přístroje a byl spuštěn příslušný program. Následně bylo k buněčné suspenzi přidáno 0,5 ml čerstvého IMDM média a buněčná suspenze byla opatrně přenesena do 24 jamkového panelu. Transfekované buňky byly inkubovány 48 hodin při 37 °C a 5% CO₂.

Po uplynulé době inkubace byla vyhodnocena účinnost transfekce. Složení transfekční směsi pro transfekci MutuDC buněk ukazuje Tabulka 14 a 15.

Tabulka 14 Složení transfekční směsi pro transfekci buněčné linie cDC1 MutuDC s elektroporačním programem D-032.

| Složka | Transfekční reakce | | |
|--|--------------------|-----------------|-----------------|
| | 1 | 2 | 3 |
| Počet buněk | 5×10^5 | 5×10^5 | 5×10^5 |
| Objem transfekčního činidla [μl] | 50 | 50 | 50 |
| Objem pX458-TAP1 ($800 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) [μl] | 1,25 | - | - |
| Objem pX458-B2M ($1285 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) [μl] | - | 0,19 | - |
| Objem pMax-GFP [μl] | - | - | 1 |

Tabulka 15 Složení transfekční směsi pro transfekci buněčné linie cDC1 MutuDC s elektroporačním programem U-001.

| Složka | Transfekční reakce | | |
|--|--------------------|-----------------|-----------------|
| | 1 | 2 | 3 |
| Počet buněk | 5×10^5 | 5×10^5 | 5×10^5 |
| Objem transfekčního činidla [μl] | 50 | 50 | 50 |
| Objem pX458-TAP1 ($800 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) [μl] | 0,31 | - | - |
| Objem pX458-B2M ($1285 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) [μl] | - | 0,19 | - |
| Objem pMax-GFP [μl] | - | - | 0,25 |

4.2.3.5 Barvení transfekovaných buněk

Transfekované buňky byly trypsinizovány, přeneseny do mikrozkušavek a centrifugovány při 250 g a laboratorní teplotě po dobu 5 minut. Po odstranění supernatantu k nim bylo přidáno 50 μl barvicího roztoku (FBS v 5% PBS) obsahujícího 5 μl monoklonální protilátky konjugovanou s fluorochromem (anti-MHCI-eFluor450) a 0,5 μl barviva Fixable Viability Dye (FVD)-eFluor506 zaručující analýzu pouze živých buněk. Buňky byly inkubovány ve tmě při pokojové teplotě po dobu 30 minut. Po inkubaci byly buňky promyty PBS pufrem a centrifugovány při 250 g a laboratorní teplotě po dobu 5 minut. Supernatant byl odstraněn a buněčné pelety byly resuspendovány v 250 μl PBS. Takto připravené buňky byly posléze analyzovány pomocí průtokového cytometru. Před samotnou analýzou byla ještě nastavena knihovna s fluorochromy dle kapitoly 4.2.4.3.

4.2.4 Analýza imunitní odpovědi buněčné linie cDC1 MutuDC

4.2.4.1 Pulzace buněk sadou inhibitorů buněčného zpracování antigenu a rekombinantním proteinem RBDS

Pulzace MutuDC buněk byla provedena v duplikátech. Buňky byly vysety do 24 jamkového panelu o hustotě 2×10^4 buněk/jamku v 1 ml IMDM média a inkubovány přes noc při 37 °C a 5% CO₂. Následující den bylo médium vyměněno za čerstvé a k jednotlivým buňkám byly přidány inhibitory buněčného zpracování antigenu (2-APB, BfA, ExoA, MG-132, leupeptin a DMA). Po třicetiminutové inkubaci byl přidán protein RBDS. Jako pozitivní kontrola byl použit lipopolysacharid (LPS) a jako negativní kontrola sloužily nepulzované buňky. Buňky byly inkubovány přes noc při 37 °C a 5% CO₂. Aplikované množství jednotlivých inhibitorů, proteinu RBDS a LPS je shrnuto v Tabulce 16.

Tabulka 16 Množství inhibitorů buněčného zpracování antigenu, rekombinantního proteinu RBDS a LPS použitých k pulzaci buněk cDC1 MutuDC.

| Složka | Množství [ng/ml média] |
|-----------|------------------------|
| 2-APB | 0,56 |
| BfA | 5 |
| ExoA | 10 |
| MG-132 | 0,6 |
| Leupeptin | 15,2 |
| DMA | 7,55 |
| RBDS | 10 |
| LPS | 200 |

4.2.4.2 Průtoková cytometrie

Po inkubaci byly pulzované buňky trypsinizovány, přeneseny do mikrozkušavek a centrifugovány při 250 g a laboratorní teplotě po dobu 5 minut. Supernatant byl odstraněn a buněčné pelety byly resuspendovány v 50 µl barvicího roztoku (FBS v 5% PBS) obsahujícího 5 µl monoklonálních protilátek konjugovaných s různými fluorochromy (anti- CD40-PE, CD80-PE-cy5, CD86-PE-cy7, CD11c-eFluor506, MHCI-eFluor450, MHCII-PE-eFluor610). Buňky byly inkubovány ve tmě při pokojové teplotě po dobu 30 minut. Po uplynutí stanovené doby byly buňky promyty PBS pufrem a centrifugovány při stejných podmínkách. Po odstranění supernatantu byly pelety buněk resuspendovány v 200 µl PBS. Buňky byly posléze analyzovány pomocí průtokového cytometru.

4.2.4.3 Nastavení knihovny s fluorochromy

Před samotnou analýzou vzorků na průtokovém cytometru byla nejdříve nastavena knihovna s fluorochromy. K tomuto účelu byla použita sada kompenzačních kuliček UltraComp eBeads™ Compensation, které lze obarvit monoklonálními protilátkami konjugovaných s různými fluorochromy. Kapka kuličky obsahuje dvě populace: pozitivní a negativní. Zatímco pozitivní populace reaguje s myší protilátkou konjugovanou fluorochromem, negativní populace danou protilátku neváže a slouží jako negativní kontrola. Celkem bylo nastaveno šest fluorochromů, kdy do šesti označených mikrozkušavek byla přidána jedna kapka (50 µl) kompenzačních kuliček a poté 5 µl specifické myší monoklonální protilátky konjugované s různými fluorochromy (anti- CD40-PE, CD80-PE-cy5, CD86-PE-cy7, CD11c-eFluor506, MHCI-eFluor450, MHCII-PE-eFluor610). Mikrozkušavky byly promíchány a inkubovány v lednici při teplotě 2–8 °C po dobu 15 minut. Poté byl přidán 1 ml PBS pufru a mikrozkušavky byly centrifugovány při 600 g a laboratorní teplotě po dobu 5 minut. Supernatant byl odstraněn a buněčné pelety byly resuspendovány v 500 µl PBS pufru. Takto připravené vzorky byly analyzovány pomocí průtokového cytometru, jejich profil pozitivní křivky společně s negativní kontrolou byly vloženy do knihovny softwaru pro následné měření povrchové exprese studovaných markerů na pulzovaných MutuDC buňkách.

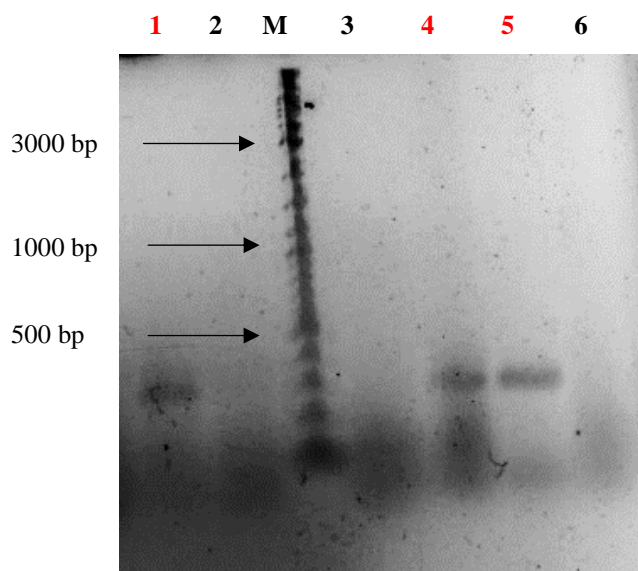
4.2.4.4 Analýza dat

Získaná data z průtokového cytometru byla analyzována v programu FlowJo. Statistické vyhodnocení bylo provedeno buď metodou one-way ANOVA s následným použitím Tukey-post-hoc testu, nebo pomocí dvouvýběrového Studentova t-testu se zvolenou hladinou významnosti 0,05 a 0,01 za použití programu GraphPad. P-hodnoty < 0,05 jsou označeny jednou hvězdičkou *, < 0,01 dvěma hvězdičkami **.

5 VÝSLEDKY

5.1 Příprava CRISPR/Cas9 vektoru pro knock-out manózoový receptor

Na základě cílové sekvence genu *MRC1* byly navrženy a objednány DNA oligonukleotidy kódující navádějící sgRNA pro endonukleázu Cas9. Oligonukleotidy byly hybridizovány do dvouřetězcové formy a poté ligovány do pX458 vektoru. Po ligaci byl vektor pX458 s DNA inzertem transformován do kompetentních buněk *E. coli* kmene DH5 α pomocí metody teplotního šoku. Transformované bakterie byly vyselektovány na povrch pevného LB média s ampicilinem. Následující den bylo možno pozorovat nárůst bílých kolonií, tedy kolonií nesoucí vektor pX458 s inzertem. Přítomnost inzertu ve vektoru byla ověřena PCR reakcí, kdy vybrané kolonie byly odebrány do PCR reakční směsi a vyhodnoceny 2% agarózovou elektroforézou (Obrázek 13).



Obrázek 13 Ověření přítomnosti DNA inzertu ve vektoru pX458 pomocí PCR reakce. (M) marker molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA ladder; (1–6) bakteriální kolonie *E. coli*. Pozitivní kolonie nesoucí vektor pX458 s inzertem jsou označeny červeně.

Tři (klony č. 1, 4 a 5) ze šesti testovaných klonů bylo pozitivních na přítomnost ligovaného inzertu očekávané velikosti 317 bp. Pro další práci byly vybrány klony č. 1 a 5, které byly přeneseny do tekutého LB média s ampicilinem. Z těchto bakteriálních kultur byla izolována plazmidová DNA. Koncentrace a čistota plazmidové DNA byla stanovena spektrofotometricky. Průměrná koncentrace plazmidové DNA byla 1628,45 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a průměrná čistota DNA činila 1,96 (Tabulka 17).

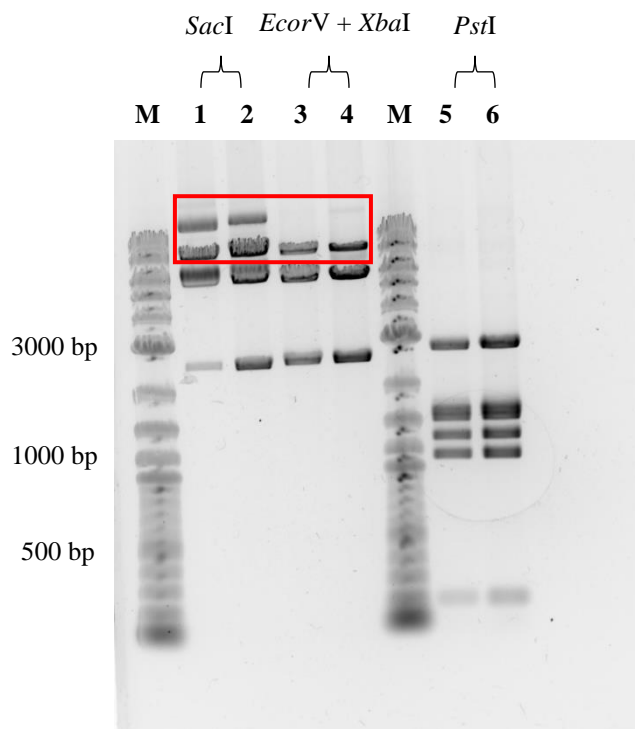
Izolovaná plazmidová DNA byla následně podrobena restriční analýze enzymy *SacI*, *PstI* a *EcorV* + *XbaI* (Obrázek 14). Produkty restrikce byly separovány 0,7% agarózovou elektroforézou. Velikost získaných fragmentů odpovídala očekávaným hodnotám (Tabulka 18). V drahách 1–4 lze také vidět proužky ve výšce přibližně 7 a 10 kb, které pravděpodobně odpovídají nenaštěpené plazmidové DNA.

Tabulka 17 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty plazmidové DNA izolované z bakteriální suspenze *E. coli*.

| Vzorek | Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$] | Čistota (A_{260}/A_{280}) |
|---------------|--|-------------------------------|
| 1 | 1676,75 | 1,964 |
| 2 | 1667,95 | 1,962 |
| 3 | 1520,95 | 1,961 |
| 4 | 1648,15 | 1,965 |
| Průměr | 1628,45 | 1,96 |

Tabulka 18 Velikost očekávaných fragmentů plazmidové DNA po štěpení restričními enzymy.

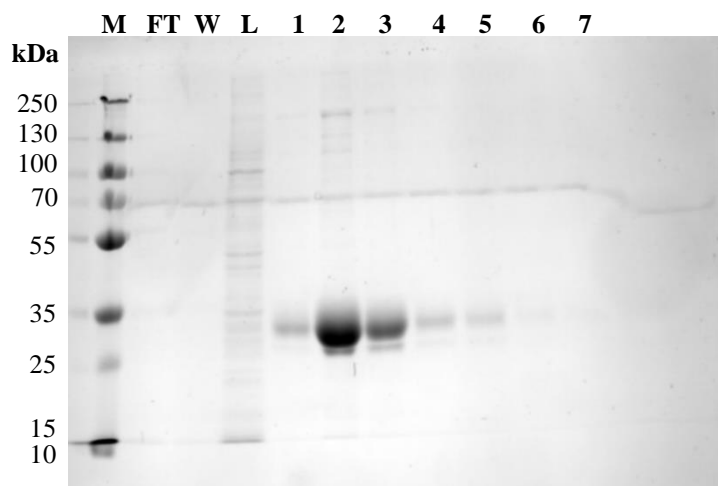
| Enzym | Velikosti očekávaných fragmentů [bp] |
|----------------------------|---------------------------------------|
| <i>SacI</i> | 2712, 6576 |
| <i>EcorV</i> + <i>XbaI</i> | 2792, 6496 |
| <i>PstI</i> | 30, 204, 1212, 1422, 1661, 1743, 3016 |



Obrázek 14 Elektroforetogram restrikční analýzy plazmidové DNA. (M) marker molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA ladder; (1) klon č. 1 štěpený enzymem *SacI*; (2) klon č. 5 štěpený enzymem *SacI*; (3) klon č. 1 štěpený enzymem *EcorV* + *XbaI*; (4) klon č. 5 štěpený enzymem *EcorV* + *XbaI*; (5) klon č. 1 štěpený enzymem *PstI*; (6) klon č. 5 štěpený enzymem *PstI*. Proužky ve výšce 7 a 10 kb, které se nacházejí v drahách 1–4, značí nedostatečně naštěpenou plazmidovou DNA (vyznačeno červeným obdélníkem).

5.2 Purifikace proteinu RBDS

Rekombinantní protein RBDS exprimovaný v savčím systému byl purifikován pomocí afinitní chromatografie na Ni-NTA agarózové koloně. Po promytí kolony byly navázané proteiny eluovány imidazolovým pufrem. Dílčí frakce byly sbírány a analyzovány pomocí SDS-PAGE. Po následném barvení proteinů za použití Coomassie Brilliant Blue R-250 bylo patrné, že protein byl úspěšně exprimován a purifikován. Molekulová hmotnost proteinu byla 32 kDa (Obrázek 15). Z výsledků je také zřejmé, že největší podíl proteinu byl v eluční frakci č. 2 a 3. Naopak ve zbylých elučních frakcích byl podíl proteinu minimální. Eluční frakce byly následně zakoncentrovány na objem 300 μ l.



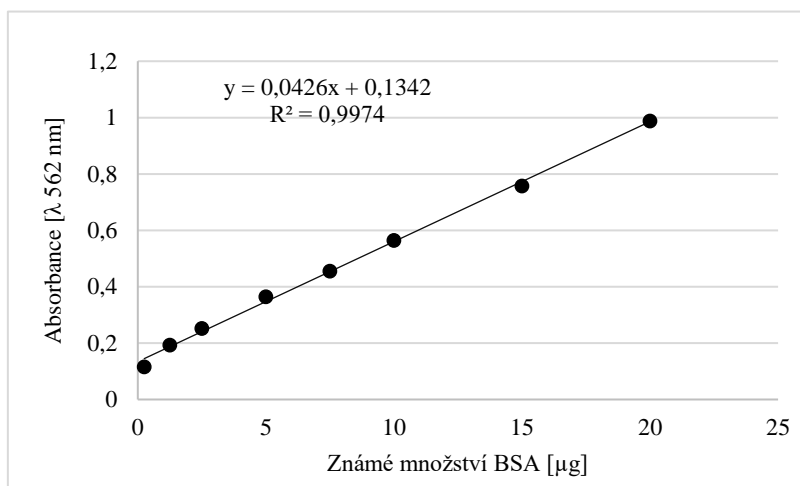
Obrázek 15 Purifikace proteinu RBDS pomocí Ni-NTA afinitní chromatografie. (M) marker molekulové hmotnosti PageRuler Plus Prestained Protein Ladder; (FT) flow-through - frakce lyzátu nenavázaná na Ni-NTA agarózu; (W) wash - promývací frakce; (L) buněčný lyzáat před navázáním na Ni-NTA agarózu; (1–7) eluční frakce.

5.2.1 Stanovení koncentrace proteinu

Pro stanovení co nejpřesnější koncentrace proteinu RBDS byly aplikovány dvě metody. Nejprve byla použita BCA metoda, kdy po sestrojení kalibrační křivky standardu BSA byla z rovnice lineární regrese vypočítána koncentrace zakoncentrovaného proteinu v jednotlivých vzorcích (Výpočet 1). Naměřené hodnoty absorbancí standardu BSA jsou uvedeny v Tabulce 19. Kalibrační křivka BSA s rovnicí lineární regrese je zaznamenána na Obrázku 16.

Tabulka 19 Naměřené absorbance standardu BSA při vlnové délce 562 nm.

| Koncentrace BSA [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$] | Absorbance (λ 562 nm) | Absorbance (λ 562 nm) | Průměrná absorbance |
|--|--------------------------------|--------------------------------|---------------------|
| 2000 | 0,976 | 1,001 | 0,9885 |
| 1500 | 0,771 | 0,744 | 0,7575 |
| 1000 | 0,560 | 0,569 | 0,5645 |
| 750 | 0,454 | 0,457 | 0,4555 |
| 500 | 0,404 | 0,326 | 0,3650 |
| 250 | 0,257 | 0,248 | 0,2525 |
| 125 | 0,199 | 0,187 | 0,1930 |
| 25 | 0,118 | 0,114 | 0,1160 |
| 0 | 0 | 0 | 0 |



Obrázek 16 Kalibrační křivka BSA s rovnicí lineární regrese pro výpočet koncentrace proteinu RBDS metodou BCA.

Výpočet 1 Stanovení koncentrace proteinu RBDS metodou BCA.

Rovnice lineární regrese: $y = 0,0426x + 0,1342$

Vzorky zakoncentrovaného proteinu

Vzorek č. 1: 10x ředěný (1 μl proteinu + 9 μl PBS)

absorbance: $y = 0,337$

dosazení do rovnice: $x = 4,76$

přepočet koncentrace proteinu: $4,76 / 1 = 4,76 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$

Vzorek č. 2: 2x ředěný (5 μl proteinu + 5 μl PBS)

absorbance: $y = 0,958$

dosazení do rovnice: $x = 19,34$

přepočet koncentrace proteinu: $19,34 / 5 = 3,87 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$

Vzorek č. 3: 1x ředěný (10 μl proteinu)

absorbance: $y = 1,642$

dosazení do rovnice: $x = 35,39$

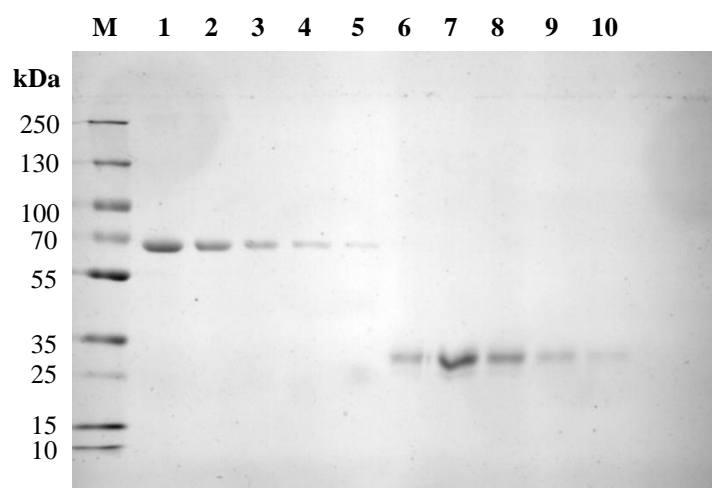
přepočet koncentrace proteinu: $35,39 / 10 = 3,54 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$

Průměrná koncentrace proteinu: $(4,76 + 3,87) / 2 = 4,32 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$

Průměrná koncentrace proteinu RBDS byla $4,32 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Vzhledem k tomu, že naměřená absorbance vzorku č. 3 nespádala do rozmezí kalibrační křivky BSA, nebyl tento vzorek do výpočtu průměrné koncentrace proteinu zahrnutý.

Následně byla ke kvantifikaci proteinu RBDS použita denzitometrie proužků na gelu po SDS-PAGE separaci. Výsledný gel obarvený Coomassie Brilliant Blue R-250 byl nafocen

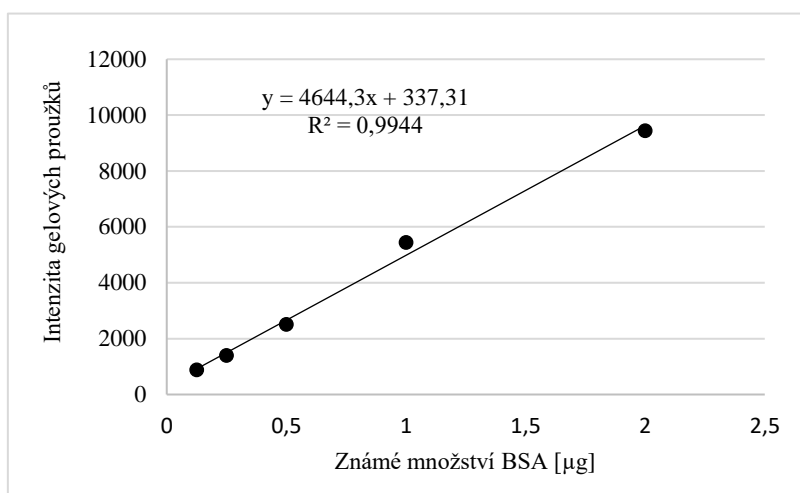
a posléze byla provedena kvantifikace intenzit jednotlivých proužků pomocí programu ImageJ (Obrázek 17). Po sestavení kalibrační křivky standardu BSA byla z rovnice lineární regrese vypočítána koncentrace nezakoncentrovaného a zakoncentrovaného proteinu v jednotlivých vzorcích (Výpočet 2). Získané hodnoty intenzit proužků standardu BSA jsou shrnuty v Tabulce 20. Kalibrační křivka BSA s rovnicí lineární regrese je zobrazena na Obrázku 18.



Obrázek 17 Denzitometrické stanovení koncentrace proteinu RBDS po SDS-PAGE separaci. (M) marker molekulové hmotnosti PageRuler Plus Prestained Protein Ladder; (1–5) koncentrační řada BSA (2; 1; 0,5; 0,25; 0,125 μg /jamku), (6) vzorek obsahující 1 μl nezakoncentrovaného proteinu RBDS, (7–10) vzorek obsahující 4; 2; 1; 0,5 μl zakoncentrovaného proteinu RBDS.

Tabulka 20 Intenzita gelových proužků standardu BSA.

| Množství BSA [μg] | Intenzita proužků |
|--------------------------------|-------------------|
| 2 | 9446,832 |
| 1 | 5444,669 |
| 0,5 | 2507,719 |
| 0,25 | 1397,698 |
| 0,125 | 886,234 |



Obrázek 18 Kalibrační křivka BSA s rovnicí lineární regrese pro stanovení koncentrace proteinu RBDS v závislosti na intenzitě gelových proužků.

Výpočet 2 Stanovení koncentrace proteinu RBDS v závislosti na intenzitě.

Rovnice lineární regrese: $y = 4644,3x + 337,31$

Vzorek nezakonzentrovaného proteinu

Vzorek č. 1: 1 μl proteinu

intenzita gelového proužku: $y = 4717,439$

dosazení do rovnice: $x = 0,94$

přepočítání koncentrace proteinu: $0,94 / 1 = \mathbf{0,94 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}}$

Vzorky zakonzentrovaného proteinu

Vzorek č. 1: 4 μl proteinu

intenzita gelového proužku: $y = 14681,820$

dosazení do rovnice: $x = 3,089$

přepočítání koncentrace proteinu: $3,089 / 4 = 0,772 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$

přepočítání koncentrace na původní vzorek s ohledem na ředění (10x): $0,772 \times 10 = 7,72 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$

Vzorek č. 2: 2 μl proteinu

intenzita gelového proužku: $y = 7136,681$

dosazení do rovnice: $x = 1,464$

přepočítání koncentrace proteinu: $1,464 / 2 = 0,732 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$

přepočítání koncentrace na původní vzorek s ohledem na ředění (10x): $0,732 \times 10 = 7,32 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$

Vzorek č. 3: 1 μl proteinu

intenzita gelového proužku: $y = 2844,811$

dosazení do rovnice: $x = 0,54$

přepočítání koncentrace proteinu: $0,54 / 1 = 0,54 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$

přepočítání koncentrace na původní vzorek s ohledem na ředění (10x): $0,54 \times 10 = 5,40 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$

Vzorek č. 4: 0,5 μl proteinu

intenzita gelového proužku: $y = 1043,305$

dosazení do rovnice: $x = 0,152$

přepočítání koncentrace proteinu: $0,152 / 0,5 = 0,304 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$

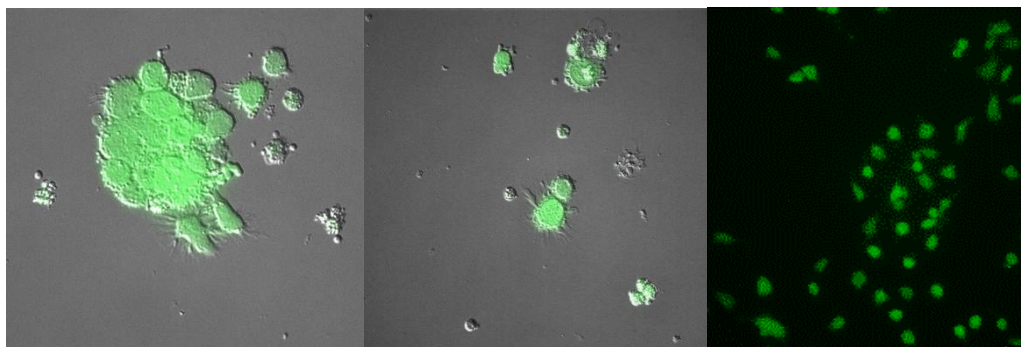
přepočítání koncentrace na původní vzorek s ohledem na ředění (10x): $0,304 \times 10 = 3,04 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$

Průměrná koncentrace proteinu: $(7,72 + 7,32 + 5,40 + 3,04) / 4 = \mathbf{5,87 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}}$

Koncentrace nezakonzentrovaného proteinu RBDS byla $0,94 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Průměrná koncentrace zakonzentrovaného proteinu činila $5,87 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Denzitometrie potvrdila, že protein byl úspěšně zakonzentrován na objem $300 \mu\text{l}$. Výsledky také poukazují na skutečnost, že koncentrace zakonzentrovaného proteinu pomocí BCA byla téměř dvakrát nižší oproti kvantifikaci proteinu denzitometrií proužků na gelu po SDS-PAGE separaci. Tyto hodnoty naznačují, že u metody BCA pravděpodobně došlo k interferenci složek vzorku s použitými činidly. Tato interference pak mohla vést ke zkresleným výsledkům, a proto v dalších experimentech bylo pracováno s koncentrací $5,87 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

5.3 Práce se savčími liniemi

Pro všechny experimenty této diplomové práce byla použita myší adherentní buněčná linie cDC1 MutuDC izolovaná ze splenocytů inbredního kmene C57BL/6. Buňky se vyznačují konstitutivní expresí genu pro GFP (Obrázek 19). Buňky byly kultivovány v kompletním IMDM médiu při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ a $5\% \text{ CO}_2$.



Obrázek 19 Fluorescenční mikroskopie adherentní buněčné linie cDC1 MutuDC konstitutivně exprimující GFP.

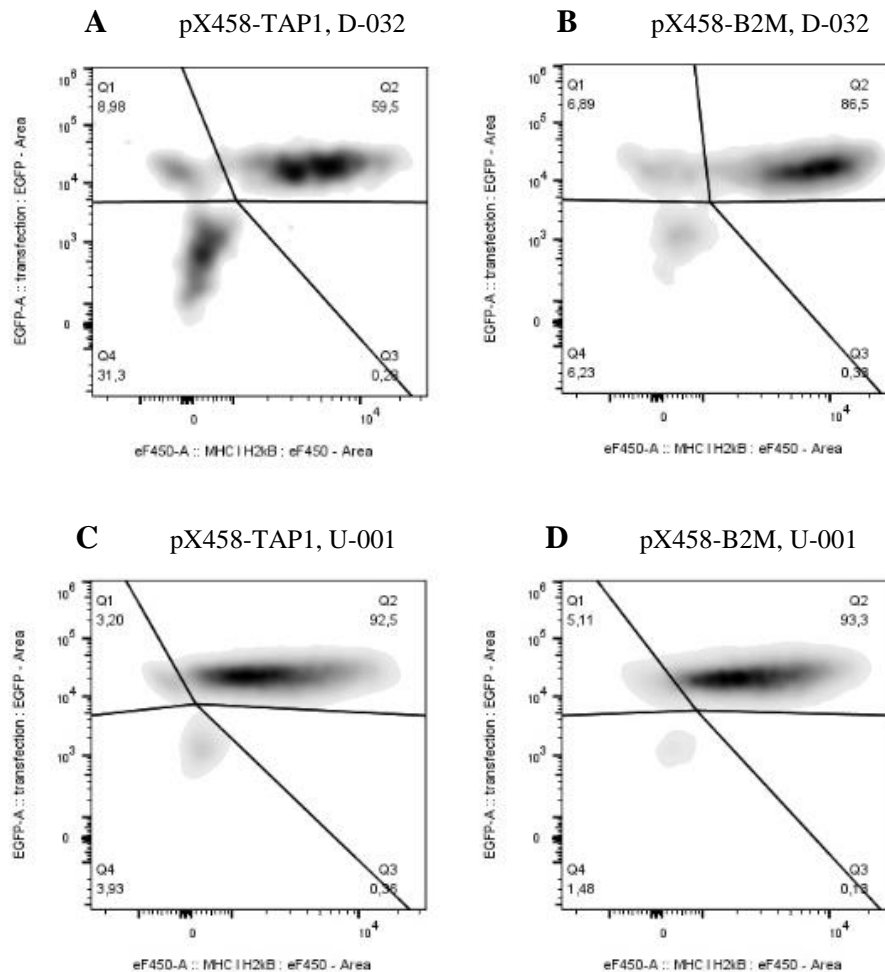
5.3.1 Transfekce buněk cDC1 MutuDC

Transfekce MutuDC buněk pomocí nukleofekce byla provedena na základě podobnosti s buněčnými liniemi, u nichž byla metoda nukleofekce již optimalizována. Nukleofekce byla provedena pomocí elektroporačního programu D-032 a U-001. Buňky byly transfekovány dvěma různými plazmidovými DNA, a to konkrétně pX458-TAP1 a pX458-B2M. Jako pozitivní kontrola sloužily buňky transfekované plazmidem pMax-GFP. Povrchová exprese MHCI na transfekovaných MutuDC buňkách byla vyhodnocena průtokovou cytometrií. Získaná data byla zpracována do grafů pomocí programu FlowJo. Plocha každého grafu byla rozdělena do čtyř kvadrantů označených Q1–Q4, které ohraničují populace buněk vykazující rozdílnou pozitivitu exprese sledovaných znaků. V našem případě byly buňky vytrženy do tří populací (Q1, Q3, Q4). Kvadrant Q1 označuje populaci GFP pozitivních a MHCI negativních buněk, Q2 ohraničuje populaci GFP a MHCI pozitivních buněk a Q4 označuje populaci GFP a MHCI negativních buněk. Procentuální zastoupení populace GFP⁺ MHCI⁻, GFP⁺ MHCI⁺ a GFP⁻ MHCI⁻ buněk je zaznamenáno na Obrázku 20.

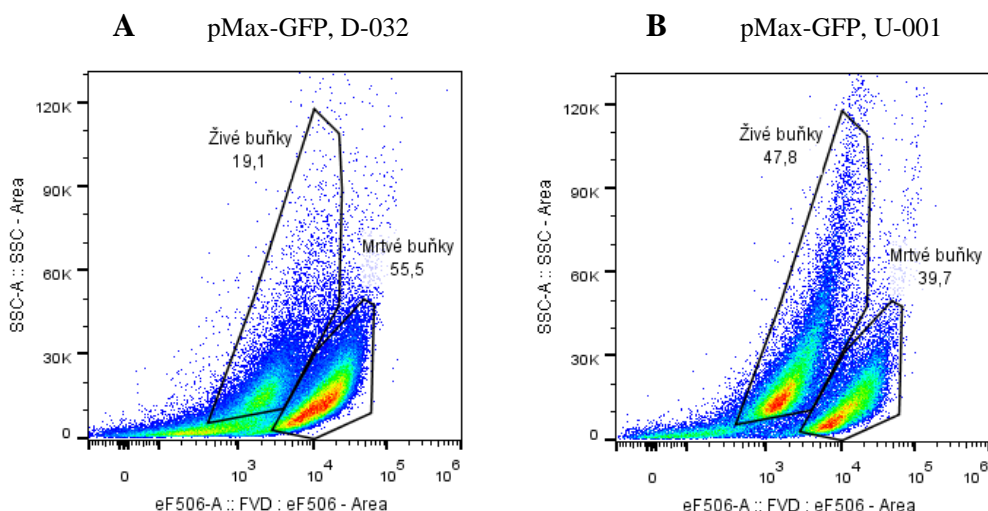
Výsledky ukazují, že s použitím programu D-032 bylo vyšší účinnosti transfekce dosaženo u pX458-TAP1 konstruktů, kdy bylo získáno 40 % transfekovaných buněk (Obrázek 20A). Účinnost transfekce pX458-B2M byla pak 13 % (Obrázek 20B). Naproti tomu účinnost transfekce buněk konstruktem pX458-B2M a pX458-TAP1 v kombinaci s programem U-001 byla téměř srovnatelná. Zatímco transfekce pX458-B2M vykazovala 6% účinnost, v případě transfekce pX458-TAP1 bylo získáno 7 % transfekovaných buněk (Obrázek 20C, 20D). Tyto hodnoty potvrzují, že vyšší účinnosti transfekce MutuDC buněk bylo docíleno s programem D-032. Účinnost transfekce buněk v kombinaci s programem U-001 byla nižší, ale oproti transfekce s programem D-032 bylo zachováno vyšší procento živých buněk. Obrázek 21 znázorňuje procentuální zastoupení živých a mrtvých buněk po transfekci buněk plazmidem pMax-GFP v kombinaci s programem D-032 a U-001. Transfekované buňky byly roztrženy na živé a mrtvé pomocí barviva FVD-eF506. Živé buňky jsou definovány jako buňky FVD negativní a mrtvé buňky jsou definovány jako buňky FVD pozitivní.

Procentuální zastoupení živých buněk po transfekci pX458-B2M, pX458-TAP1 a pMax-GFP v kombinaci s elektroporačním programem D-032 a U-001 je zaznamenáno na Obrázku 22. Z výsledných dat je patrné, že při transfekci buněk plazmidem pMax-GFP s programem D-032 bylo zachováno 19 % živých buněk a s programem U-001 téměř 48 % živých buněk. Naopak transfekce buněk konstruktem pX458-TAP1 v kombinaci s programem D-032 zachovala 7% životnost buněk a v kombinaci s programem U-001 až 31% životnost

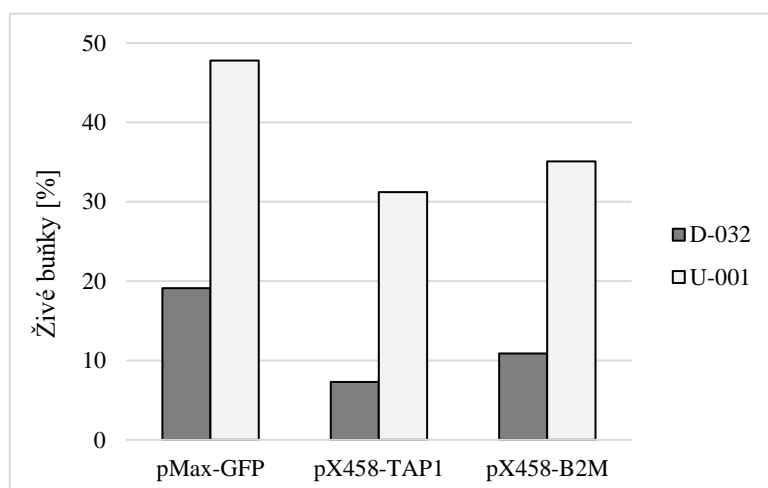
buněk. Při transfekci buněk konstruktem pX458-B2M s programem D-032 bylo pak zachováno 11 % viabilních buněk a s programem U-001 35 % viabilních buněk.



Obrázek 20 Analýza účinnosti transfekce buněk cDC1 MutuDC pomocí průtokové cytometrie. A) MutuDC transfekované pX458-TAP1 s programem D-032, B) MutuDC transfekované pX458-B2M s programem D-032, C) MutuDC transfekované pX458-TAP1 s programem U-001, D) MutuDC transfekované pX458-B2M s programem U-001. Kvadrant Q1 označuje subpopulaci GFP pozitivních a MHC I negativních buněk, Q2 označuje subpopulaci GFP a MHC I pozitivních buněk a Q4 označuje subpopulaci GFP a MHC I negativních buněk.



Obrázek 21 Stanovení živých a mrtvých buněk cDC1 MutuDC pomocí průtokové cytometrie. A) MutuDC transfekované pMax-GFP s programem D-032, B) MutuDC transfekované pMax-GFP s programem U-001. Živé a mrtvé buňky byly rozlišeny pomocí barviva FVD-eF506. Živé buňky jsou definovány jako buňky FVD negativní.



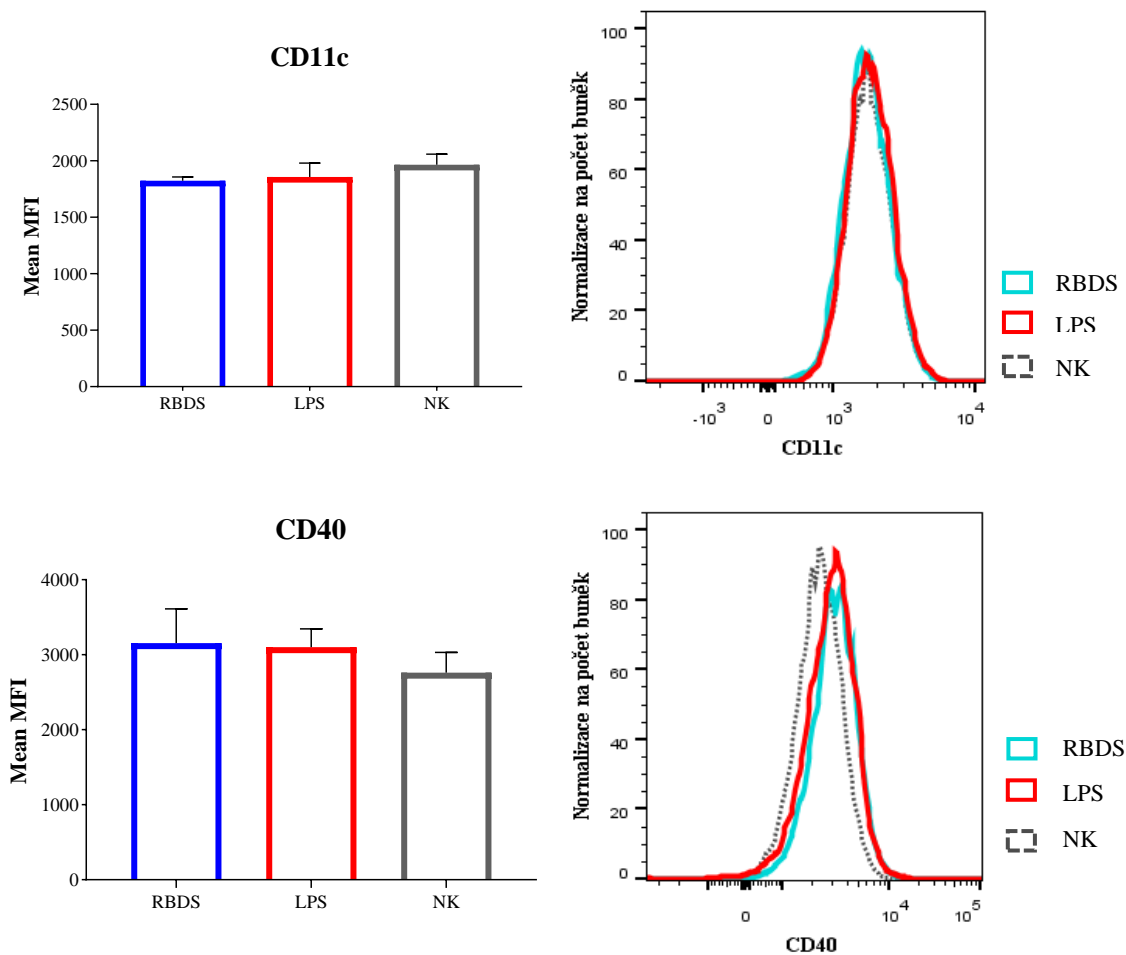
Obrázek 22 Analýza viability buněk cDC1 MutuDC po transfekci pMax-GFP, pX458-TAP1 a pX458-B2M s programem D-032 a U-001.

5.4 Analýza imunitní odpovědi buněk cDC1 MutuDC

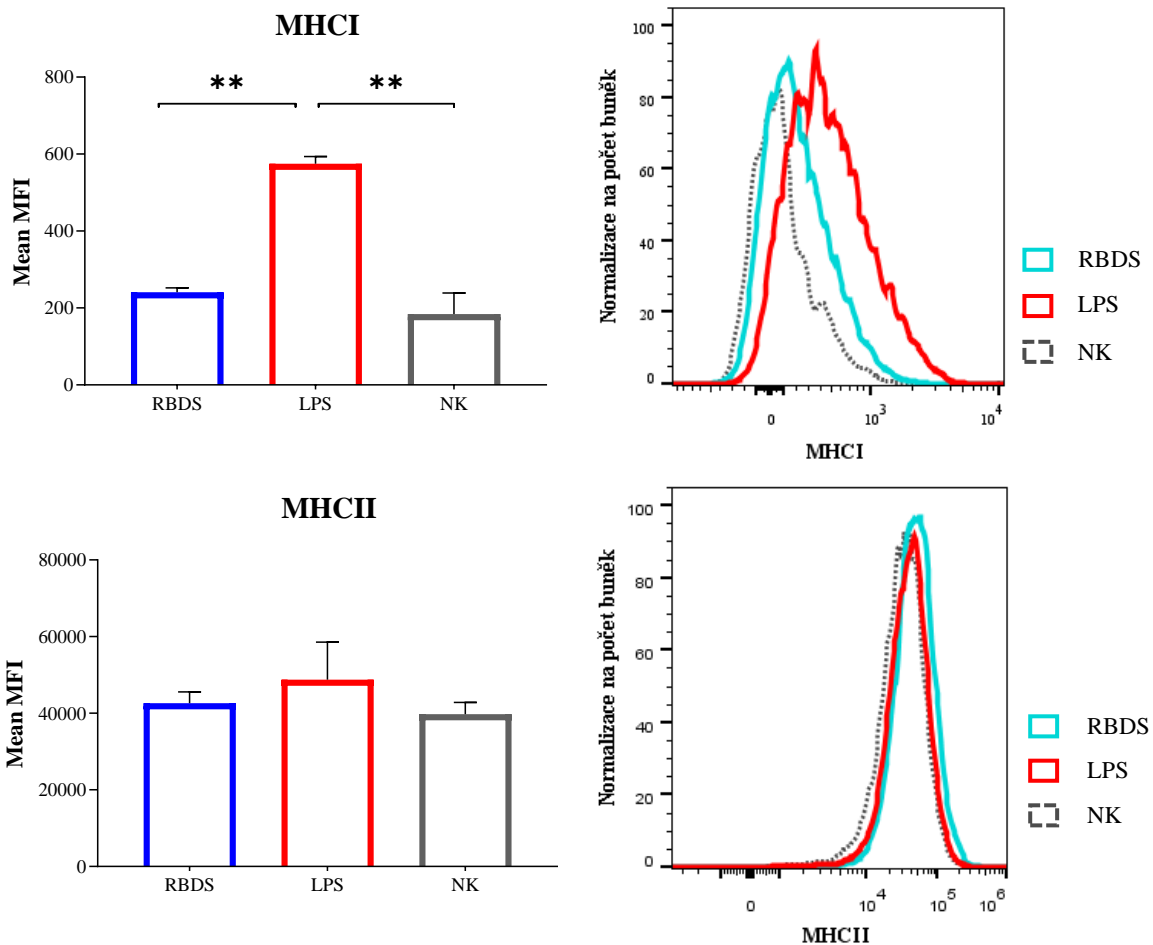
5.4.1 Stanovení aktivace MutuDC pulzovaných proteinem RBDS

Metodou průtokové cytometrie byla stanovena exprese aktivačních a diferenciačních markerů (CD40, CD80, CD86, CD11c, MHCI, MHCII) u dendritických buněk, které byly pulzovány rekombinantním proteinem RBDS. Jako pozitivní kontrola byl použit LPS a jako negativní kontrola sloužily nepulzované buňky. Exprese studovaných markerů byla porovnávána s expresí u nepulzovaných buněk (Obrázek 23–25). Signifikantní rozdíly byly

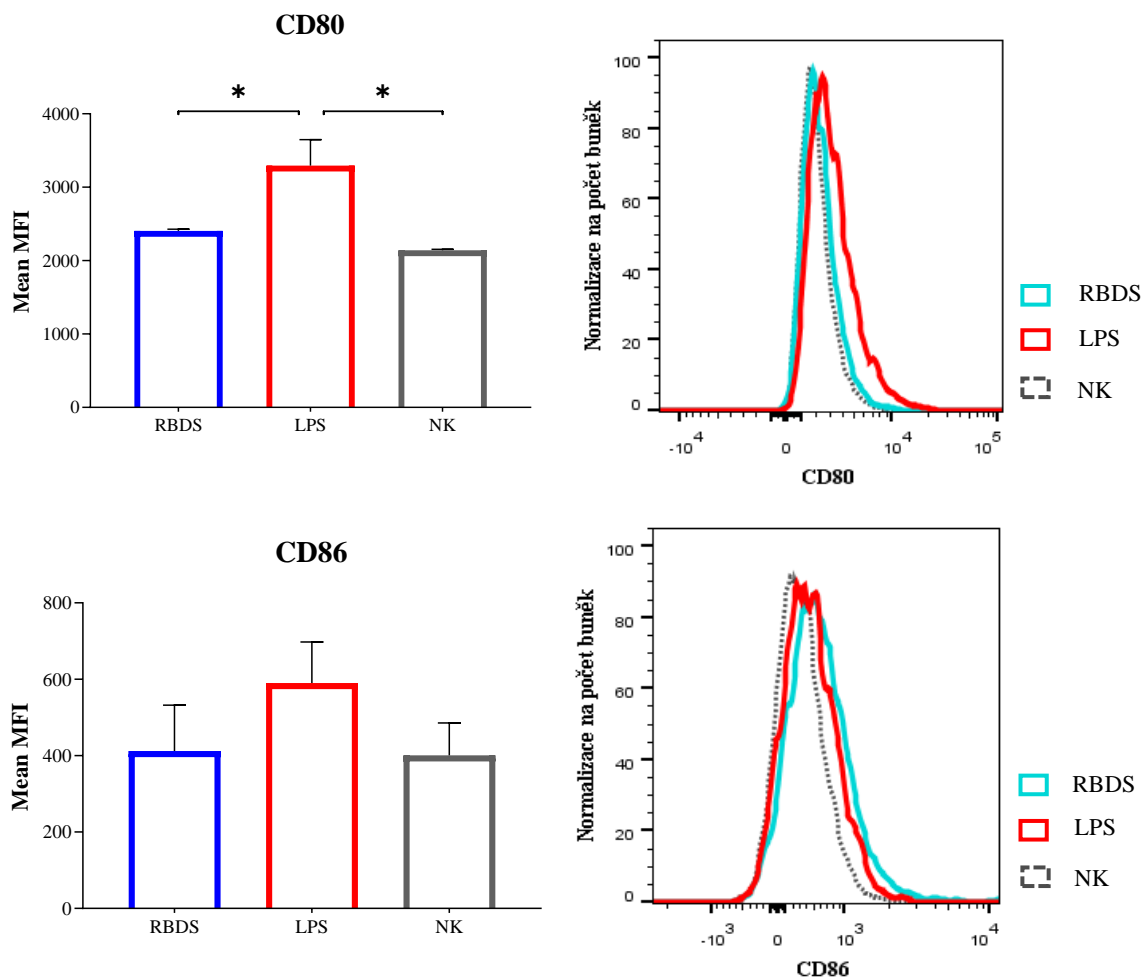
zaznamenány pouze pro marker MHC I a CD80. Expze obou těchto markerů byla signifikantně vyšší u buněk pulzovaných LPS oproti buňkám pulzovaným proteinem RBDS, a také oproti nepulzovaným buňkám. Stanovení expze MHC I tedy dokazuje skutečnost, že LPS jako pozitivní kontrola fungovala správně a opravdu stimulovala expzi MHC I, ale zároveň také dokazuje, že protein RBDS měl velmi slabý imunogenní účinek, a proto nebylo možné pozorovat signifikantní nárůst expze tohoto markeru oproti negativní kontrole. Expze ostatních buněčných markerů nebyly signifikantně významné. Nicméně je nutné zmínit, že u buněk pulzovaných LPS byl pozorován trend nárůstu expze markerů MHC II a CD86, ale v důsledku výrazných odchylek nebyl rozdíl statisticky významný.



Obrázek 23 Expze markerů CD11c a CD40 při pulzaci buněk cDC1 MutuDC rekombinantním proteinem RBDS. LPS - pozitivní kontrola, NK - negativní kontrola. Chybové úsečky představují SD hodnoty (standard derivation). Signifikanční rozdíl mezi pulzovanými a nepulzovanými buňkami byl vyhodnocen metodou one-way ANOVA s použitím Tukey-post-hoc testu. P-hodnoty < 0,05 jsou označeny jednou hvězdičkou *, < 0,01 dvěma hvězdičkami **.



Obrázek 24 Expres markerů MHC I a MHC II při pulzaci buněk cDC1 MutuDC rekombinantním proteinem RBDS. LPS - pozitivní kontrola, NK - negativní kontrola. Chybové úsečky představují SD hodnoty (standard derivation). Signifikantní rozdíl mezi pulzovanými a nepulzovanými buňkami byl vyhodnocen metodou one-way ANOVA s použitím Tukey-post-hoc testu. P-hodnoty < 0,05 jsou označeny jednou hvězdičkou *, < 0,01 dvěma hvězdičkami **.



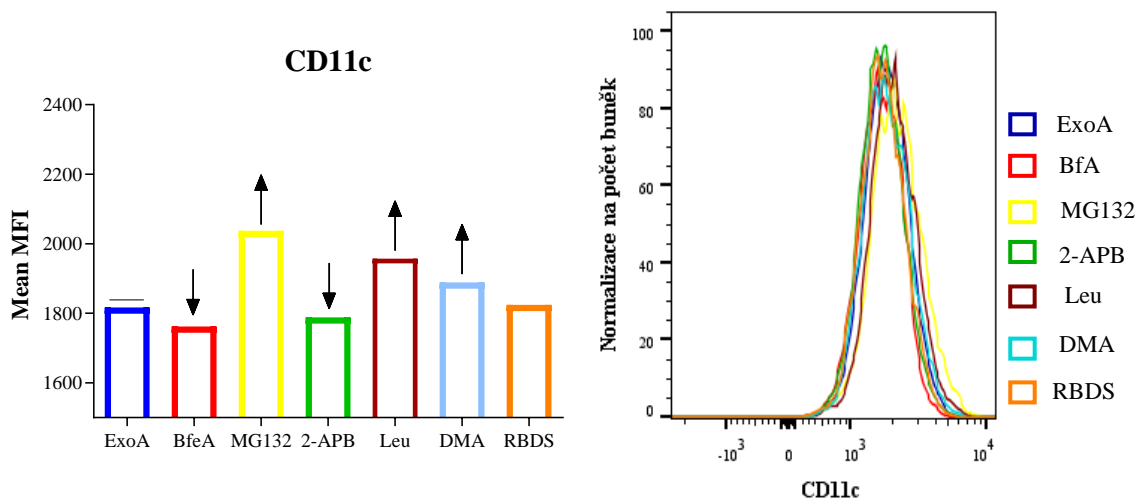
Obrázek 25 Expres markerů CD80 a CD86 při pulzaci buněk cDC1 MutuDC rekombinantním proteinem RBDS. LPS - pozitivní kontrola, NK - negativní kontrola. Chybové úsečky představují SD hodnoty (standard derivation). Signifikantní rozdíl mezi pulzovanými a nepulzovanými buňkami byl vyhodnocen metodou one-way ANOVA s použitím Tukey-post-hoc testu. P-hodnoty < 0,05 jsou označeny jednou hvězdičkou *, < 0,01 dvěma hvězdičkami **.

5.4.2 Analýza cesty zkřížené prezentace proteinu RBDS

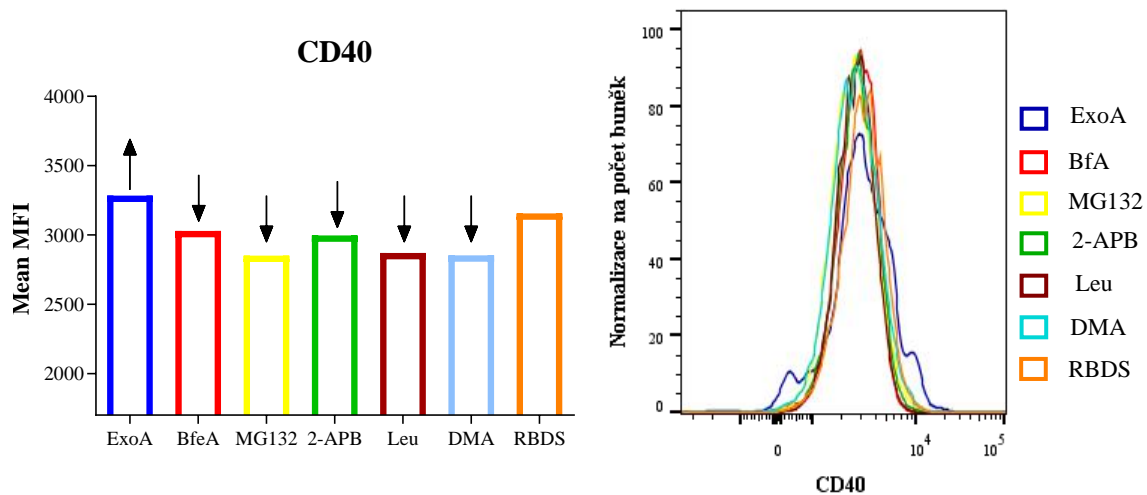
Expres aktivačních a diferenciačních markerů byla stanovena také u dendritických buněk, které byly pulzovány rekombinantním proteinem RBDS a sadou inhibitorů buněčného zpracování antigenu. Cílem bylo sledovat, jakou cestu internalizace protein RBDS využívá pro své zpracování v buňce, aby mohl být následně prezentován na buněčném povrchu. Pozornost byla věnována především porovnání změn v expresi studovaných markerů mezi buňkami pulzovanými inhibitory a buňkami pulzovanými samotným proteinem RBDS (Obrázek 26–31).

Snížení exprese markeru CD11c bylo indukováno pulzací BfA a 2-APB. Naproti tomu buňky pulzované ostatními inhibitory nesnížily expresi CD11c, ba naopak jeho expresi zvýšily. Výjimkou byly pouze buňky pulzované ExoA, které expresi daného markeru patrně neovlivnily (Obrázek 26). V případě markeru CD40 byla exprese zvýšena po pulzaci ExoA, ostatní

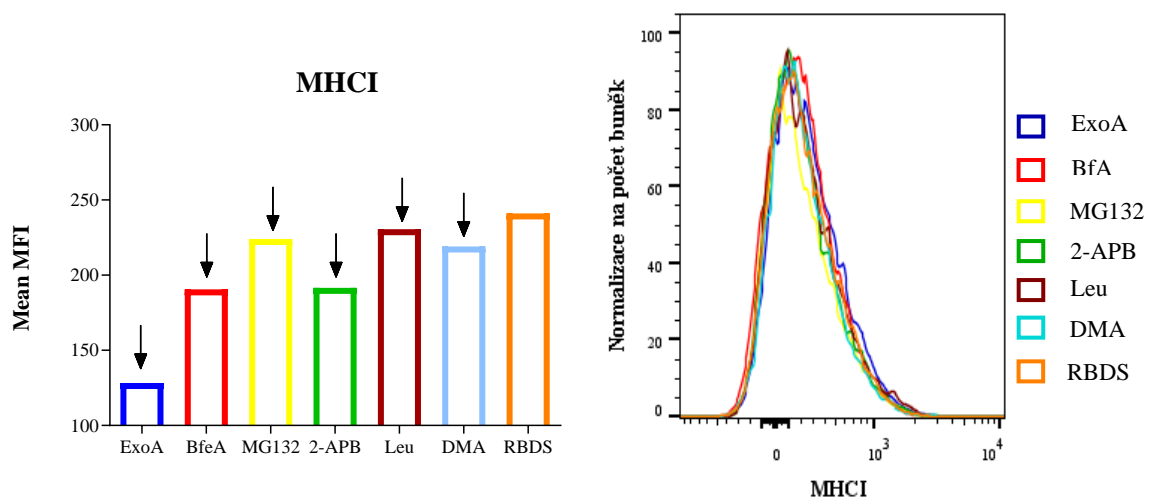
pulzované buňky pak vyvolaly snížení exprese (Obrázek 27). U markeru MHC I byl zaznamenán pokles exprese u všech pulzovaných buněk. Nicméně k velmi prudkému snížení exprese došlo pouze po pulzaci ExoA (Obrázek 28). Na druhé straně buňky pulzované ExoA výrazně stimulovaly zvýšení exprese markeru MHC II. Mírné zvýšení exprese MHC II bylo zaznamenáno i po pulzaci DMA. Ostatní pulzované buňky expresi tohoto markeru snížily, přičemž nejsilnější inhibiční účinek vykazoval BfA (Obrázek 29). U markerů CD80 a CD86 byl pozorován nárůst exprese u buněk pulzovaných ExoA a BfA. Ostatní pulzované buňky expresi obou markerů snížily. V případě znaku CD80 byla jeho exprese nejvíce potlačena po pulzaci leupeptinem a 2-APB (Obrázek 30). Naproti tomu buňky pulzované MG-132 a 2-APB vyvolaly prudký pokles exprese CD86 (Obrázek 31).



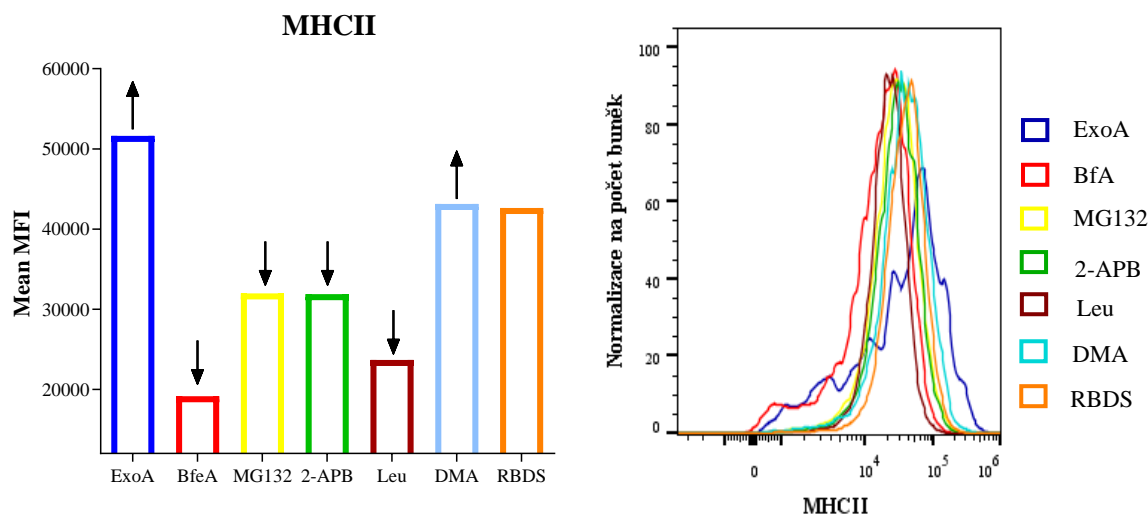
Obrázek 26 Expres markeru CD11c při pulzaci buněk cDC1 MutuDC sadou inhibitorů buněčného zpracování antigenu a rekombinantním proteinem RBDS. Šipka směrem dolů (↓)/šipka směrem nahoru (↑)/horizontální příčka (–) značí pokles/nárůst/žádnou změnu exprese markeru při pulzaci buněk sadou inhibitorů oproti buňkám pulzovaných proteinem RBDS.



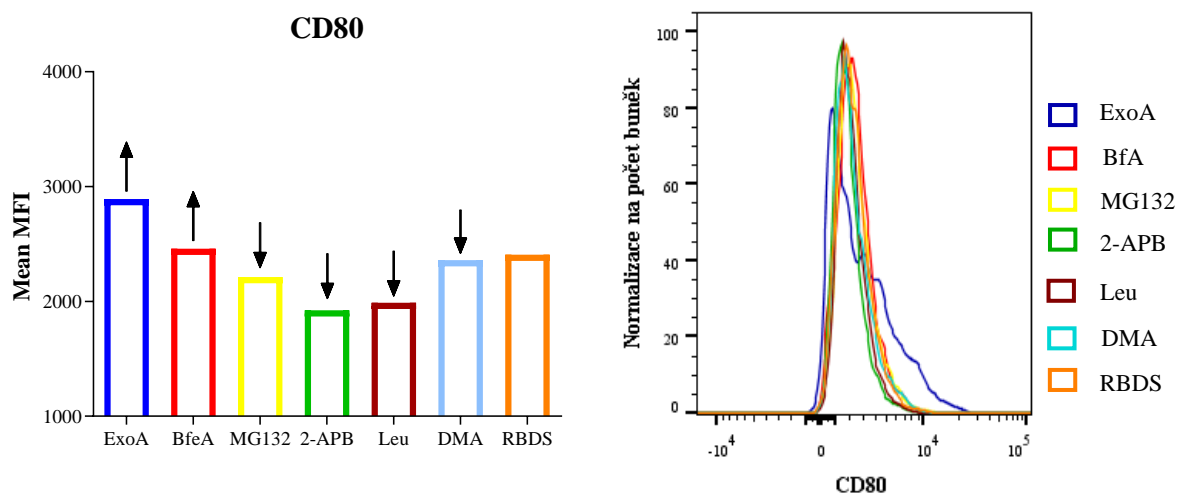
Obrázek 27 Expresa markeru CD40 při pulzaci buněk cDC1 MutuDC sadou inhibitorů buněčného zpracování antigenu a rekombinantním proteinem RBDS. Šipka směrem dolů (↓)/šipka směrem nahoru (↑)/horizontální příčka (–) značí pokles/nárůst/žádnou změnu exprese markeru při pulzaci buněk sadou inhibitorů oproti buňkám pulzovaným proteinem RBDS.



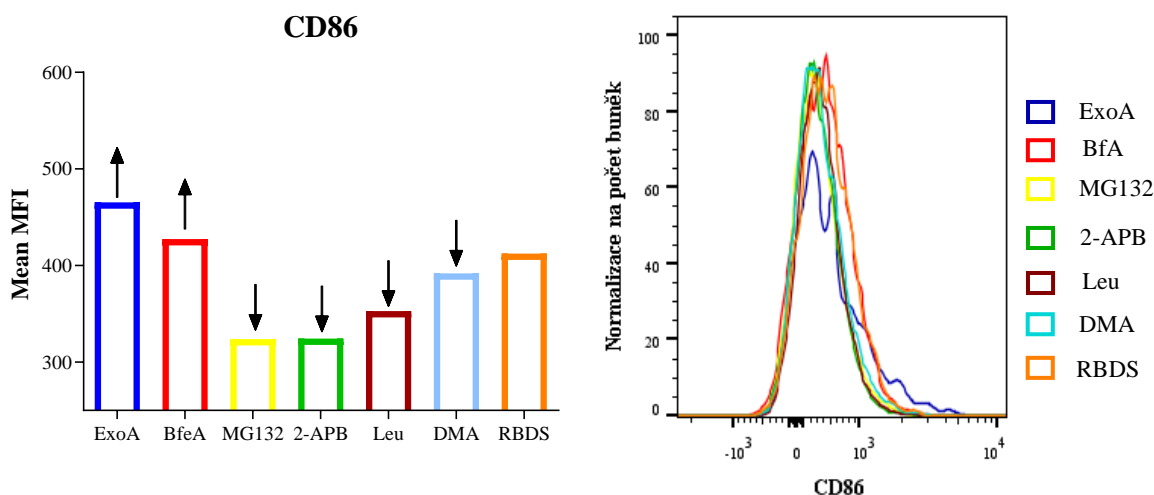
Obrázek 28 Expresa markeru MHC1 při pulzaci buněk cDC1 MutuDC sadou inhibitorů buněčného zpracování antigenu a rekombinantním proteinem RBDS. Šipka směrem dolů (↓)/šipka směrem nahoru (↑)/horizontální příčka (–) značí pokles/nárůst/žádnou změnu exprese markeru při pulzaci buněk sadou inhibitorů oproti buňkám pulzovaným proteinem RBDS.



Obrázek 29 Expresa markeru MHCII při pulzaci buněk cDC1 MutuDC sadou inhibitorů buněčného zpracování antigenu a rekombinantním proteinem RBDS. Šipka směrem dolů (↓)/šipka směrem nahoru (↑)/horizontální příčka (-) značí pokles/nárůst/žádnou změnu exprese markeru při pulzaci buněk sadou inhibitorů oproti buňkám pulzovaným proteinem RBDS.



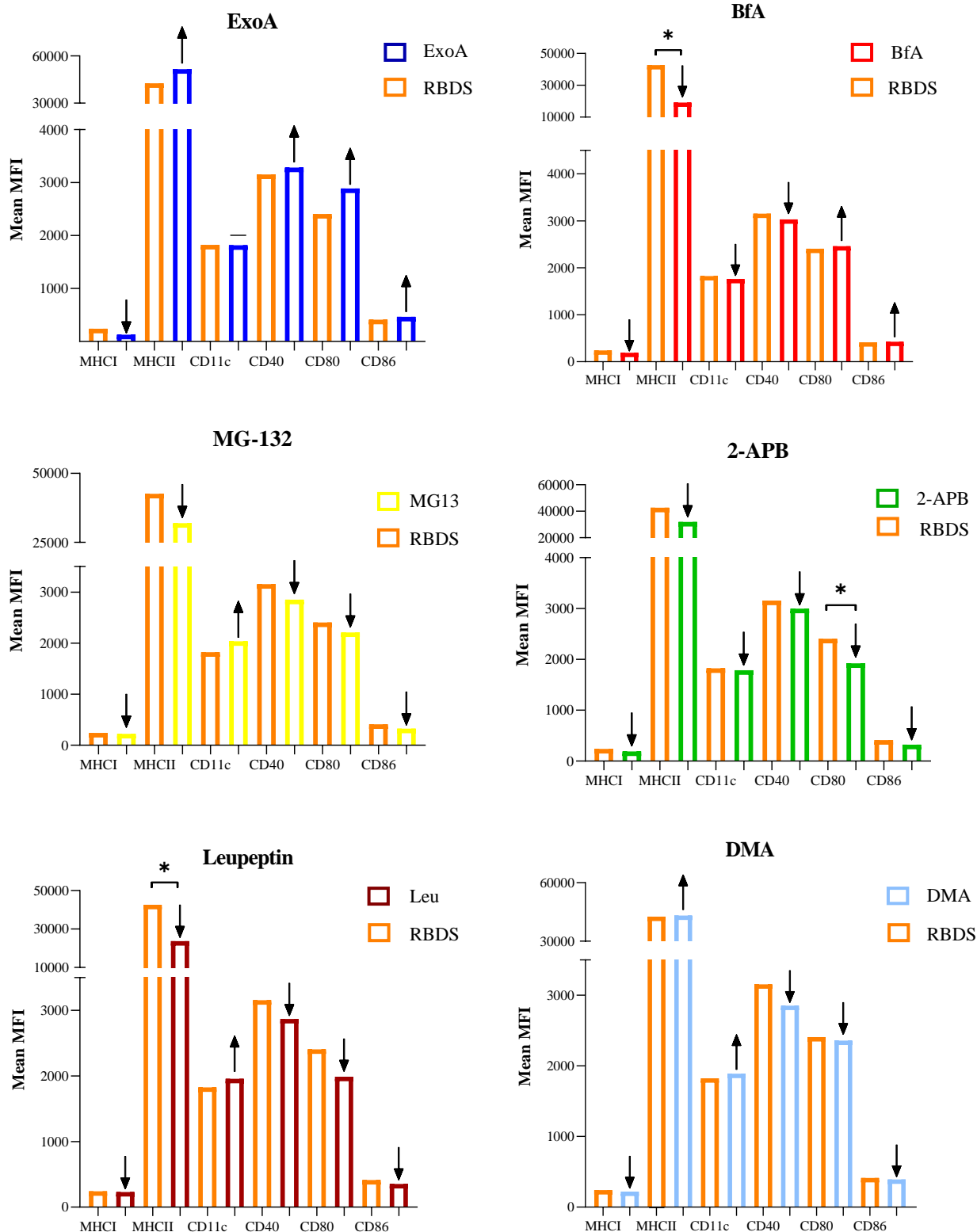
Obrázek 30 Expresa markeru CD80 při pulzaci buněk cDC1 MutuDC sadou inhibitorů buněčného zpracování antigenu a rekombinantním proteinem RBDS. Šipka směrem dolů (↓)/šipka směrem nahoru (↑)/horizontální příčka (-) značí pokles/nárůst/žádnou změnu exprese markeru při pulzaci buněk sadou inhibitorů oproti buňkám pulzovaným proteinem RBDS.



Obrázek 31 Expresa markeru CD86 při pulzaci buněk cDC1 MutuDC sadou inhibitorů buněčného zpracování antigenu a rekombinantním proteinem RBDS. Šipka směrem dolů (↓)/šipka směrem nahoru (↑)/horizontální příčka (–) značí pokles/nárůst/žádnou změnu exprese markeru při pulzaci buněk sadou inhibitorů oproti buňkám pulzovaným proteinem RBDS.

Závěrem byl vytvořen celkový přehled ukazující vliv inhibitorů buněčného zpracování antigenu na expresi markerů u pulzovaných buněk MutuDC (Obrázek 32). Změny v expresi buněčných markerů byly opět porovnávány mezi buňkami pulzovanými inhibitory a buňkami pulzovanými samotným proteinem RBDS.

Buňky pulzované ExoA sice vykazovaly zvýšenou expresi markerů MHCII, CD40 CD80 a CD86, ale nevykazovaly zvýšenou expresi MHCI. Naopak působení ExoA evidentně neovlivnilo expresi CD11c. Na druhé straně BfA potlačil expresi většiny buněčných markerů s výjimkou CD80 a CD86. V tomto případě byla jejich exprese zvýšena. U buněk pulzovaných MG-132 byl pozorován nárůst exprese pouze u markeru CD11c. Expresa ostatních buněčných markerů (MHCI, MHCII, CD40, CD80, CD86) byla po pulzaci MG-132 snížena. Stejně tak buňky pulzované leupeptinem vykazovaly zvýšenou expresi markeru CD11c a sníženou expresi ostatních buněčných markerů. V případě 2-APB nedošlo ke zvýšení exprese žádného buněčného markeru, ba naopak došlo ke snížení. Buňky pulzované DMA zvýšily expresi markerů MHCII a CD11c. V případě ostatních markerů došlo po pulzaci DMA ke snížení exprese. Signifikantní rozdíly byly potvrzeny pouze pro expresi markeru MHCII po pulzaci buněk BfA a leupeptinem, a pro expresi markeru CD80 po pulzaci buněk 2-APB.



Obrázek 32 Souhrnný přehled působení inhibitorů buněčného zpracování antigenu na expresi markerů u buněk cDC1 MutuDC. Šipka směrem dolů (↓)/šipka směrem nahoru (↑)/horizontální příčka (-) značí pokles/nárůst/žádnou změnu exprese markeru při pulzaci buněk sadou inhibitorů oproti buňkám pulzovaným proteinem RBDS. Signifikantní rozdíl mezi buňkami pulzovanými inhibitorem a buňkami pulzovanými proteinem RBDS byl vyhodnocen pomocí dvouvýběrového Studentova t-testu. P-hodnoty < 0,05 jsou označeny jednou hvězdičkou *.

6 DISKUZE

Nemoc Covid-19: pro některé obyčejná chřipka, pro jiné zákeřná nemoc a možné riziko hospitalizace. Jak ukazují statistiky, počet lidí nakažených virem SARS-CoV-2 stále roste a předpoklad poklesu není zatím optimistický (WHO, ©2021). Bohužel celou situaci ohledně onemocnění komplikují nové mutace viru SARS-CoV-2, které mohou být podle vědců o 40–80 % nakažlivější oproti původní variantě (Davies *et al.*, 2021). Dnešní společnost se proto upíná na očkování jako na naději překonat koronavirovou krizi a vrátit se do relativně běžného života. Většina dnešních vyvíjených vakcín proti Covid-19 cílí na RBD doménu koronavirového spike proteinu (RBDS), prostřednictvím níž virus proniká do hostitelské buňky a infikuje ji.

V posledních desetiletích éra molekulární biologie a genového inženýrství zaznamenala pokrok ve vývoji vakcín s využitím rekombinantních proteinů, které mohou poskytovat mnohem bezpečnější variantu k očkování. Navzdory tomu není v současné době žádná rekombinantní vakcína proti Covid-19 schválena. Jedním z důvodů se zdá být relativně vyšší výrobní cena než v případě dostupné adenovirové a mRNA vakcíně. Domnívám se však, že hlavním důvodem je slabý imunogenní účinek RBDS proteinu. Pro zvýšení jeho imunogenicity je nezbytné protein navázat na jistý nosič, nejčastěji v podobě nanočástic, a zároveň přidat vhodná adjuvans, která mohou významně posílit aktivitu dendritických buněk (DC) potřebných pro stimulaci T-lymfocytů a vytvoření dlouhodobé buněčné imunity (Ho *et al.*, 2018). Ve většině zemí je stále jediným adjuvans hydroxid hlinitý známý jako kamenec, který však vykazuje omezenou možnost stimulace T-lymfocytární imunitní odpovědi. Z tohoto důvodu čínští vědci zabalili kamenec do mezifázového rozhraní olej/voda a tím vytvořili kamencem stabilizovanou Pickeringovou emulzi schopnou zvýšit účinnost vakcíny. Výsledky experimentu ukázaly, že kamencem stabilizovaná Pickeringova emulze adsorbovala nejen velké množství antigenů koronaviru SARS-CoV-2, ale také vykazovala vyšší afinitu k vychytávání DC. Tímto se efektivně aktivovaly prezentace pohlcených antigenů s následnou stimulací humorální i buněčné odpovědi. Předpokládá se tedy, že kamencem stabilizované Pickeringovy emulze mohou sloužit jako bezpečné, dostupné a účinné adjuvans pro vylepšení vakcíny proti Covid-19 (Peng *et al.*, 2020).

V rámci experimentální práce byla provedena purifikace rekombinantního proteinu RBDS na Ni-NTA agarózové koloně, jeho zakoncentrování a následné stanovení jeho koncentrace. Molekulová hmotnost proteinu RBDS byla 32 kDa, očekávaná velikost proteinu (30 kDa) je

navýšena histidinovou značkou připojenou na konec studovaného proteinu umožňující jeho efektivní a snadnou purifikaci.

V této práci byla ke stanovení koncentrace proteinu použita metoda denzitometrie proteinových proužků na gelu po SDS-PAGE separaci a také spektrofotometrická metoda BCA. Zatímco v prvním případě byla koncentrace proteinu $5,87 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, koncentrace proteinu pomocí BCA byla nižší ($4,32 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). I když denzitometrie patří spíše mezi hrubší metody, její předností je možnost zaměřit se pouze na proužek proteinu našeho zájmu a určit tak jeho koncentraci v porovnání se standardem bez dalších možných interferujících složek ve vzorku. Naopak BCA metoda je sice přesnější, ale zároveň méně specifická. Při kvantifikaci proteinů pomocí BCA dochází často k nežádoucím interakcím složek vzorku s použitými činidly. V důsledku toho pak nemusí být změřen výhradně protein, který nás zajímá, ale také ostatní složky ve vzorku. A právě to může být důvod, proč výsledná koncentrace RBDS proteinu byla nižší než v případě použité druhé metody. Denzitometrická analýza se tedy ukázala jako spolehlivější, a proto v dalších experimentech bylo pracováno s koncentrací $5,87 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Již v roce 1976 bylo prokázáno, že DC zkříženě prezentují exogenní antigeny na MHC I molekulách a tím aktivují cytotoxické CD8^+ T-lymfocyty zajišťující eliminaci infikovaných buněk (Bevan, 1976). V rámci našeho experimentu byla sledována cesta internalizace, kterou studovaný protein RBDS využívá pro své zpracování v buňce, aby mohl být poté prezentován na buněčném povrchu. Z dostupných informací týkajících se prezentace exogenních antigenů se dá předpokládat, že peptidy pocházejících z RBDS proteinu budou převážně prezentovány na MHC II molekulách. Naopak molekuly MHC I budou z velké části na svém povrchu prezentovat somatické peptidy pocházejících z proteinů produkovaných buňkou. Přesto se předpokládá, že minoritní část RBDS proteinu bude prezentována i na povrchu MHC I molekul. Aby bylo možné potvrdit předpokládanou možnost zkřížené prezentace proteinu RBDS, byly DC pulzovány tímto proteinem a sadou inhibitorů blokujících MHC I prezentaci. Pomocí průtokové cytometrie byla u pulzovaných buněk měřena a vyhodnocena povrchová exprese aktivačních a diferenciačních buněčných markerů (MHC I, MHC II, CD40, CD11c, CD80, CD86).

V případě markeru MHC I byl podle očekávání pozorován pokles exprese u všech pulzovaných buněk. Nicméně velmi prudký pokles exprese byl zaznamenán po pulzaci ExoA, který naopak výrazně zvýšil expresi markeru MHC II. To může poukazovat na skutečnost, že ExoA zablokoval transport všech proteinů včetně RBDS proteinu z endozomu do cytoplazmy. Tím nedošlo k navázání proteinů na MHC I molekuly. Prezentace exogenního antigenu byla uskutečněna pouze klasicky za účasti molekul MHC II. S největší pravděpodobností lze také

řici, že ExoA při MHCII prezentaci tohoto proteinu aktivoval expresi důležitých aktivačních markerů CD40, CD80 a CD86.

V rámci experimentu byla rovněž zjištěna snížená exprese markerů MHCI, MHCII a CD40 po pulzaci BfA, který patrně zablokoval přenos všech somatických peptidů včetně těch pocházejících z RBDS proteinu z ER směrem do GA a tím znemožnil vystavení nově sestavených komplexů MHC-peptid na buněčném povrchu. I studie z roku 2012 uvádí, že u APC ovlivněných BfA byla inhibována zkřížená prezentace proteinu na molekulách MHCI (Mant *et al.*, 2012). Tyto výsledky poukazují na nezastupitelnou úlohu GA při klasické MHCI prezentaci i při zkřížené prezentaci RBDS proteinu.

Pozoruhodné je rovněž snížení exprese všech aktivačních markerů (MHCI, MHCII, CD40, CD80, CD86) u buněk pulzovaných leupeptinem a MG-132. Lze předpokládat, že zkřížená prezentace RBDS proteinu preferuje nejen cestu závislou na proteazomu, ale také vyžaduje přítomnost cysteinových proteáz v endolysosomech. Je možno se domnívat, že reakce buněk na narušení MHCI prezentace důsledkem inhibice proteazomu a cysteinových proteáz se projevila sníženou expresí markerů CD40, CD80 a CD86. Takové snížení exprese pravděpodobně způsobilo setrvání všech peptidů včetně těch pocházejících z RBDS proteinu v buňce. Následkem toho nebylo umožněno navázání peptidů na MHCII molekuly a tím i jejich vystavení na buněčném povrchu.

Velmi zajímavý je případ 2-APB, kdy po jeho působení byla naměřena snížená exprese všech markerů. Ačkoli byl 2-APB popsán jako inhibitor zkřížené prezentace prostřednictvím mezibuněčného spojení, lze předpokládat, že tak silná reakce na účinek 2-APB nebyla vyvolána zablokováním těchto mezerových spojovacích kanálů. Bylo totiž zjištěno, že 2-APB mimo jiné inhibuje i další klíčové buněčné pochody, jako je např. uvolňování vápenatých iontů, jejichž intracelulární koncentrace může zásadně ovlivnit funkci a maturaci DC (Koski *et al.*, 1999; Bootman *et al.*, 2002). A takové synergické působení více inhibičních účinků 2-APB v našem případě nejspíše způsobilo sníženou expresi všech buněčných markerů.

Pro všechny experimenty byla použita buněčná linie cDC1 MutuDC. Z našich zkušeností bylo nutno buňky zpočátku kultivovat v 6 jamkovém kultivačním panelu a až později v kultivačních lahvích. Podle našeho pozorování bylo totiž zjištěno, že při počáteční kultivaci MutuDC pro ně nejsou v kultivačních lahvích ideální růstové podmínky. Publikace zabývající se proliferací MutuDC buněk navrhuje mnoho doporučení pro jejich snadnou kultivaci (Fuertes Marraco *et al.*, 2012; Pigni *et al.*, 2018; Koga *et al.*, 2021). Jedna z mnoha studií uvádí, že do kultivačního média pro MutuDC je dobré přidat hydrogenuhličitan sodný (Fuertes Marraco *et al.*, 2012). V našem případě však absence hydrogenuhličitanu sodného nijak neovlivnila růst

MutuDC. Naopak bylo vyzorováno, že proliferace MutuDC vyžaduje přítomnost 2-merkapt ethanolu v kultivačním médiu.

Technologie CRISPR/Cas9 je mocným nástrojem pro editaci genomu, umožňuje indukovat cílovou mutaci a sledovat funkci genů (Ratan *et al.*, 2018). Jedním z cílů této předložené práce bylo připravit *TAP1* a *B2M* knock-outované linie s využitím CRISPR/Cas9 systému. Pro tyto účely byla provedena transfekce MutuDC buněk již připraveným vektorem pX458 nesoucí sekvenci kódující sgRNA, která navádí endonukleázu Cas9 k cílové sekvenci. Štěpení proteinem Cas9 by mělo v dané cílové sekvenci vytvořit dvouvláknový zlom a tím vyvolat vypnutí (knock-out) genů *TAP1* a *B2M*. Buňky byly transfekovány konstrukty pX458-TAP1, pX458-B2M a plazmidem pMax-GFP. Vzhledem ke schopnosti buněčné linie MutuDC konstitutivně exprimovat gen pro GFP lze pravděpodobně předpokládat, že tato schopnost bude zachována i po transfekci plazmidem pMax-GFP. Z toho důvodu nebylo možné transfekované buňky vytrždit na základě exprese GFP. Pozornost byla tedy věnována expresi MHCI znaku na povrchu transfekovaných MutuDC buněk. Při vyhodnocení účinnosti transfekce však nastal problém v detekci pozitivně transfekovaných buněk. V analýze průtokovou cytometrií byly detekovány dvě různé populace, které neexprimují na svém povrchu MHCI molekuly po transfekci. První populace byla MHCI negativní, ale GFP pozitivní a druhá byla negativní na oba měřené znaky. Z dostupných informací týkajících se MutuDC linie není možné předpovědět, zda transfekované buňky přestávají tento gen samovolně exprimovat nebo ne. Pro nás byla především důležitá ztráta exprese MHCI znaku. Otázkou však zůstává, která ze dvou vytržiděných populací buněk byla správně transfekovaná. Existuje možnost, že zatímco buňky GFP⁺ a MHCI⁻ byly správně transfekované, buňky GFP⁻ a MHCI⁻ postihl jistý diskomfort, a proto neexprimovaly žádný ze sledovaných znaků. Za této situace by byla naše pozornost věnována populaci GFP⁺ a MHCI⁻ buněk. Nicméně v úvahu připadá také možnost, že buňky po transfekci svou schopnost GFP exprese ztrácí. V takovém případě by nás zajímala populace GFP⁻ a MHCI⁻ buněk. Z tohoto důvodu bylo nutné rozčlenit MHCI populaci do dalších dvou subpopulací.

Pro transfekci byla vyzkoušena metoda nukleofekce pomocí kitu Amaxa Cell line Nucleofector Kit V. Transfekci nukleofekcí pro MutuDC buňky bylo nutno optimalizovat. Cílem optimalizace nukleofekce bylo zvolit takový elektroporační program, který by vykazoval co nejvyšší transfekční účinnost a zároveň nejnižší toxicitu pro buňky. Nami použitý elektroporační program D-032 sice vykazoval vyšší transfekční účinnost oproti elektroporačnímu programu U-001, ale převážná část transfekovaných buněk zahynula. Z experimentu vyplývá, že výběr vhodného elektroporačního programu se odvíjí na základě

toho, k jakému účelu budou knock-outované buňky potřeba. Pokud je cílem využít knock-outované buňky ihned, v řádu hodin, není problém zvolit program transfekce, který bude pro buňky sice více toxický, ale poskytne vyšší účinnost. Naopak elektroporační program, který sice vykazuje nižší transfekční účinnost, ale zachovává vysoký počet životaschopných buněk, může být vhodnější při použití knock-outovaných buněk dlouhodobějšího charakteru.

Experimentální část předložené diplomové práce byla také věnována přípravě CRISPR/Cas9 vektoru pro knock-out manózového receptoru na povrchu dendritických buněk, který rozpoznává polysacharidy obsahující manózu na povrchu mikroorganismů a tím hraje klíčovou roli při prezentaci antigenu adaptivnímu imunitnímu systému (Gazi *et* Martinez-Pomares, 2009). Pro tyto účely byly na základě vybrané sekvence genu *MRC1* navrženy oligonukleotidy kódující navádějící sgRNA pro protein Cas9. Úspěšnost ligace a transformace byla ověřena PCR reakcí. Za účelem dalšího ověření přítomnosti DNA inzertu ve vektoru pX458 byla provedena restriční analýza izolované plazmidové DNA. Jelikož velikost fragmentů štěpené DNA odpovídala očekávaným hodnotám, lze s nejvyšší pravděpodobností poukázat na úspěšné vložení inzertu do vektoru. Nicméně restriční analýza plazmidové DNA však nebývá pro ověření správného začlenění sgRNA do vektoru pX458 příliš dostačující. Z tohoto důvodu by měla být sekvence zaklonovaného úseku ještě osekvenována a následně transfekována do buněk ke generaci *MRC1* knock-outovaných linií, ale to již nebylo záměrem této diplomové práce.

7 ZÁVĚR

V teoretické části předložené diplomové práce byla vypracována literární rešerše zaměřená na charakterizaci dendritických buněk a jejich schopnosti se účastnit klasické a zkřížené prezentace antigenu. Pozornost byla také věnována RBD doméně spike proteinu (RBDS) izolovaného z nového koronaviru SARS-CoV-2 vyvolávajícího onemocnění Covid-19. Tato práce rovněž popisuje technologii CRISPR/Cas9 jako mocného nástroje pro editaci genomu.

V experimentální části diplomové práce byla provedena purifikace rekombinantního proteinu RBDS exprimovaného v savčím systému pomocí afinitní chromatografie. Protein byl poté analyzován a charakterizován metodou SDS-PAGE. Koncentrace proteinu byla stanovena jak pomocí BCA, tak denzitometrií proteinových proužků na gelu po SDS-PAGE separaci. Na základě hodnot koncentrace proteinu získaných z obou analýz se jako spolehlivější metoda ukázala denzitometrická analýza.

Rekombinantní protein RBDS byl spolu s inhibitory zkřížené prezentace použit pro pulzaci dendritických buněk. Stanovením povrchové exprese aktivačních a diferenciačních markerů MHCI, MHCII, CD80, CD86, CD40 a CD11c pomocí spektrální průtokové cytometrie byla sledována možná cesta prezentace RBDS proteinu. Většina RBDS proteinu je prezentována na buněčném povrchu v komplexu s molekulami MHCII. Pulzace dendritických buněk dokázala, že minoritní část studovaného proteinu může být prezentována i na povrchu MHCI molekul pomocí zkřížené prezentace. Rovněž bylo zjištěno, že zkřížená prezentace RBDS proteinu vyžaduje cestu závislou na proteazomu a endoplazmatickém retikulu.

Na základě exprese buněčných markerů byla také stanovena aktivace dendritických buněk po jejich pulzaci RBDS proteinem a LPS. Exprese jednotlivých markerů byla statisticky vyhodnocena v programu GraphPad, kdy signifikantní rozdíl mezi pulzovanými a nepulzovanými buňkami byl zaznamenán pouze u markerů MHCI a CD80. Získaná data potvrdila, že protein RBDS má velmi slabý imunogenní účinek, a proto je důležité při navození imunitní odpovědi doplnit protein o vhodné a dostatečně silné adjuvans.

Další část experimentální práce byla věnována kultivaci savčích buněk. U buněčné linie MutuDC byla provedena optimalizace transfekce metodou nukleofekce pomocí elektroporačního programu D-032 a U-001. Vyšší transfekční účinnost, ale i vyšší toxicita pro buňky byla dosažena za použití programu D-032 oproti programu U-001.

Byl připraven CRISPR/Cas9 vektor pro knock-out manózoového receptoru na povrchu dendritických buněk. Jednovláknové DNA oligonukleotidy kódující navádějící sgRNA pro

protein Cas9 byly navrženy pomocí online softwaru ChopChop a úspěšně vloženy do vektoru pX458. Přítomnost DNA inzertu ve vektoru byla ověřena PCR z bakteriálních kolonií a restrikční analýzou plazmidové DNA. Pro úplné potvrzení správného začlenění sgRNA do vektoru pX458 by bylo potřeba sekvenci zaklonovaného úseku podrobit komerčnímu sekvenování.

8 LITERATURA

- Abele R., Tamp  R. (1999): Function of the transport complex TAP in cellular immune recognition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1461(2), 405-419.
- Ackerman A. L., Giodini A., Cresswell P. (2006): A role for the endoplasmic reticulum protein retrotranslocation machinery during crosspresentation by dendritic cells. *Immunity*, 25(4), 607-617.
- Adli M. (2018): The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nature communications*, 9(1), 1-13.
- Alexandropoulos K., Danzl N. M. (2012): Thymic epithelial cells: antigen presenting cells that regulate T cell repertoire and tolerance development. *Immunologic research*, 54(1-3), 177-190.
- Apostolopoulos V., Yuriev E., Lazoura E., Yu M., Ramsland P. A. (2008): MHC and MHC-like molecules: Structural perspectives on the design of molecular vaccines. *Human vaccines*, 4(6), 400-409
- Arase H. (2016): Rheumatoid rescue of misfolded cellular proteins by MHC class II molecules: a new hypothesis for autoimmune diseases. In *Advances in immunology* (Vol. 129, pp. 1-23). Academic Press.
- Baden L. R., El Sahly H. M., Essink B., Kotloff K., Frey S., Novak R., Zaks T. (2020): Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *New England Journal of Medicine*.
- Bai D., Del Corso C., Srinivas M., Spray D. C. (2006): Block of specific gap junction channel subtypes by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 319(3), 1452-1458.
- Banerjee G., Damodaran A., Devi N., Dharmalingam K., Raman G. (2004): Role of keratinocytes in antigen presentation and polarization of human T lymphocytes. *Scandinavian journal of immunology*, 59(4), 385-394.
- Barrangou R., Doudna J. A. (2016): Applications of CRISPR technologies in research and beyond. *Nature biotechnology*, 34(9), 933.
- Beloglazova N., Brown G., Zimmerman M. D., Proudfoot M., Makarova K. S., Kudritska M., Koonin E. V. (2008): A novel family of sequence-specific endoribonucleases associated with the clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Journal of Biological Chemistry*, 283(29), 20361-20371.
- Benke D., Kr ger T., Lang A., Hamilton-Williams E. E., Kurts C. (2006): Inclusion of Brefeldin A during dendritic cell isolation allows in vitro detection of cross-presented self-antigens. *Journal of immunological methods*, 310(1-2), 12-19.
- Bevan M. J. (1976): Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *The Journal of experimental medicine*, 143(5), 1283-1288.
- Biorender. COVID-19 Vaccine and Therapeutics Tracker. [online]  2021 [10.2.2021] Dostupné z <https://biorender.com/Covid-vaccine-tracker>
- Boettcher M., McManus M. T. (2015): Choosing the right tool for the job: RNAi, TALEN, or CRISPR. *Molecular cell*, 58(4), 575-585.
- Bootman M. D., Collins T. J., Mackenzie L., Roderick H. L., Berridge M. J., Peppiatt C. M. (2002): 2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca²⁺ entry but an inconsistent inhibitor of InsP₃-induced Ca²⁺ release. *The FASEB Journal*, 16(10), 1145-1150.
- Brown M., Wittwer C. (2000): Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology.
- Br ne B. (2003): Nitric oxide: NO apoptosis or turning it ON?. *Cell Death & Differentiation*, 10(8), 864-869.
- Caminschi I., Proietto A. I., Ahmet F., Kitsoulis S., Shin Teh J., Lo J. C., Campbell I. K. (2008): The dendritic cell subtype-restricted C-type lectin Clec9A is a target for vaccine enhancement. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 112(8), 3264-3273.
- Cella M., Sallusto F., Lanzavecchia A. (1997): Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Current opinion in immunology*, 9(1), 10-16.
- Cong L., Ran F. A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Zhang F. (2013): Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339(6121), 819-823.

- Corbière V., Dirix V., Norrenberg S., Cappello M., Rimmelink M., Mascart F. (2011): Phenotypic characteristics of human type II alveolar epithelial cells suitable for antigen presentation to T lymphocytes. *Respiratory research*, 12(1), 15.
- Cresswell P. (1996): Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell*, 84(4), 505-507.
- Cresswell P., Ackerman A. L., Giodini A., Peaper D. R., Wearsch P. A. (2005): Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation. *Immunological reviews*, 207(1), 145-157.
- Davies N. G., Abbott S., Barnard R. C., Jarvis C. I., Kucharski A. J., Munday J., CMMID COVID-19 Working Group. (2021): Estimated transmissibility and severity of novel SARS-CoV-2 Variant of Concern 202012/01 in England. *medRxiv*, 2020-12.
- Delamarre L., Pack M., Chang H., Mellman I., Trombetta E. S. (2005): Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science*, 307(5715), 1630-1634.
- den Haan J. M., Lehar S. M., Bevan M. J. (2000): CD8⁺ but not CD8⁻ dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *The Journal of experimental medicine*, 192(12), 1685-1696.
- Deng S. Q., Peng H. J. (2020): Characteristics of and public health responses to the coronavirus disease 2019 outbreak in China. *Journal of clinical medicine*, 9(2), 575.
- Dudziak D., Kamphorst A. O., Heidkamp G. F., Buchholz V. R., Trumpfheller C., Yamazaki S., Steinman R. M. (2007): Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science*, 315(5808), 107-111.
- Edwards A. D., Diebold S. S., Slack E. M., Tomizawa H., Hemmi H., Kaisho T., Sousa C. R. E. (2003): Toll-like receptor expression in murine DC subsets: lack of TLR7 expression by CD8 α ⁺ DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines. *European journal of immunology*, 33(4), 827-833.
- Einhauer A., Jungbauer A. (2001): The FLAGTM peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 49(1-3), 455-465.
- Elmore S. (2007): Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516.
- Fonteneau J. F., Kavanagh D. G., Lirvall M., Sanders C., Cover T. L., Bhardwaj N., Larsson M. (2003): Characterization of the MHC class I cross-presentation pathway for cell-associated antigens by human dendritic cells. *Blood*, 102(13), 4448-4455.
- Fu Y., Sander J. D., Reyon D., Cascio V. M., Joung J. K. (2014): Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nature biotechnology*, 32(3), 279-284.
- Fuertes Marraco S. A., Grosjean F., Duval A., Rosa M., Lavanchy C., Ashok D., Acha-Orbea H. (2012): Novel murine dendritic cell lines: a powerful auxiliary tool for dendritic cell research. *Frontiers in immunology*, 3, 331.
- Galibert L., Diemer G. S., Liu Z., Johnson R. S., Smith J. L., Walzer T., Branstetter D. G. (2005): Nectin-like protein 2 defines a subset of T-cell zone dendritic cells and is a ligand for class-I-restricted T-cell-associated molecule. *Journal of Biological Chemistry*, 280(23), 21955-21964.
- Gazi U., Martinez-Pomares L. (2009): Influence of the mannose receptor in host immune responses. *Immunobiology*, 214(7), 554-561.
- Gilbert L. A., Larson M. H., Morsut L., Liu Z., Brar G. A., Torres S. E., Lim W. A. (2013): CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*, 154(2), 442-451.
- Grant B. D., Donaldson J. G. (2009): Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nature reviews Molecular cell biology*, 10(9), 597-608.
- Grommé M., Uytdehaag F. G., Janssen H., Calafat J., Van Binnendijk R. S., Kenter M. J., Neefjes J. (1999): Recycling MHC class I molecules and endosomal peptide loading. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(18), 10326-10331.
- Hamming I., Timens W., Bulthuis M. L. C., Lely A. T., Navis G. V., van Goor H. (2004): Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 203(2), 631-637.
- Handel A., Yates A., Pilyugin S. S., Antia R. (2007): Gap junction-mediated antigen transport in immune responses. *TRENDS in Immunology*, 28(11), 463-466.

- Haque A., Hajiaghamseni L. M., Li P., Toomy K., Blum J. S. (2007): Invariant chain modulates HLA class II protein recycling and peptide presentation in nonprofessional antigen presenting cells. *Cellular immunology*,
- Ho N. I., Raaijmakers T. K., Adema G. J. (2018): Adjuvants enhancing cross-presentation by dendritic cells: the key to more effective vaccines? *Frontiers in immunology*, 9, 2874.
- Horvath P., Barrangou R. (2010): CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*, 327(5962), 167-170.
- Hořejší V., Barůňková J. (1998): *Základy imunologie*. 1. vydání. Triton, Praha. ISBN 80-85875-73-X
- Hořejší V., Barůňková J. (2009): *Základy imunologie*. 4. vydání. Triton, Praha. ISBN 978-80-7387-280-9.
- Huang C., Wang Y., Li X., Ren L., Zhao J., Hu Y., Cao B. (2020): Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The lancet*, 395(10223), 497-506.
- Hughes E. A., Hammond C., Cresswell P. (1997): Misfolded major histocompatibility complex class I heavy chains are translocated into the cytoplasm and degraded by the proteasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(5), 1896-1901.
- Huysamen C., Willment J. A., Dennehy K. M., Brown G. D. (2008): CLEC9A is a novel activation C-type lectin-like receptor expressed on BDCA3+ dendritic cells and a subset of monocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 283(24), 16693-16701.
- Chavez A., Scheiman J., Vora S., Pruitt B. W., Tuttle M., Iyer E. P., Ter-Ovanesyan D. (2015): Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. *Nature methods*, 12(4), 326-328.
- Chelkar M., Panda S. (2020): Flow cytometry: Principle and applications. *The Pharma Innovation Journal*; 9(10), 6-9.
- Cho S. W., Kim S., Kim Y., Kweon J., Kim H. S., Bae S., Kim J. S. (2014): Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome research*, 24(1), 132-141.
- Jahan-Tigh R. R., Ryan C., Obermoser G., Schwarzenberger K. (2012): Flow cytometry. *The Journal of investigative dermatology*, 132(10), e1.
- Jansen R., Embden J. D. V., Gaastra W., Schouls L. M. (2002): Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular microbiology*, 43(6), 1565-1575.
- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J. A., Charpentier E. (2012): A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *science*, 337(6096), 816-821.
- Jinek M., Jiang F., Taylor D. W., Sternberg S. H., Kaya E., Ma E., Kaplan M. (2014): Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science*, 343(6176), 1247997.
- Johnson & Johnson. Announces Single-Shot Janssen COVID-19 Vaccine Candidate Met Primary Endpoints in Interim Analysis of its Phase 3 ENSEMBLE Trial. [online] ©2021 [cit. 12.2.2021] Dostupné z https://www.jnj.com/johnson-johnson-announces-single-shot-janssen-Covid-19-vaccine-candidate-met-primary-endpoints-in-interim-analysis-of-its-phase-3-ensemble-trial#_ednref2
- Jongbloed S. L., Kassianos A. J., McDonald K. J., Clark G. J., Ju X., Angel C. E., Vulink A. J. (2010): Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *Journal of Experimental Medicine*, 207(6), 1247-1260.
- Klika J. Přehledně: Čtyři typy vakcín proti nemoci Covid-19. *Akademie věd České republiky*. [online] 2021 [cit. 12.2.2021] Dostupné z <http://www.avcr.cz/cs/veda-a-vyzkum/chemicke-vedy/Prehledne-Ctyri-typy-vakcin-proti-nemoci-Covid-19/>
- Koga M. M., Engel A., Pigni M., Lavanchy C., Stevanin M., Laversenne V., Acha-Orbea H. (2021): IL10-and IL35-Secreting MutuDC Lines Act in Cooperation to Inhibit Memory T Cell Activation Through LAG-3 Expression. *Frontiers in Immunology*, 12, 334.
- Komaroff A. Why are mRNA vaccines so exciting? *Harvard Medical School*. [online] 2020 [cit. 12.2.2021] Dostupné z <https://www.health.harvard.edu/blog/why-are-mrna-vaccines-so-exciting-2020121021599>
- Koski G. K., Schwartz G. N., Weng D. E., Czerniecki B. J., Carter C., Gress R. E., Cohen P. A. (1999): Calcium mobilization in human myeloid cells results in acquisition of individual dendritic cell-like characteristics through discrete signaling pathways. *The Journal of Immunology*, 163(1), 82-92.
- Kuscu C., Arslan S., Singh R., Thorpe J., Adli M. (2014): Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease. *Nature biotechnology*, 32(7), 677-683.

- Larson M. H., Gilbert L. A., Wang X., Lim W. A., Weissman J. S., Qi L. S. (2013): CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression. *Nature protocols*, 8(11), 2180.
- Li G., Chen X., Xu A. (2003): Profile of specific antibodies to the SARS-associated coronavirus. *New England Journal of Medicine*, 349(5), 508-509.
- Li S., Yuan L., Dai G., Chen R. A., Liu D. X., Fung T. S. (2020): Regulation of the ER stress response by the ion channel activity of the infectious bronchitis coronavirus envelope protein modulates virion release, apoptosis, viral fitness, and pathogenesis. *Frontiers in Microbiology*, 10, 3022.
- Limmer A., Ohl J., Kurts C., Ljunggren H. G., Reiss Y., Groettrup M., Knolle P. A. (2000): Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nature medicine*, 6(12), 1348-1354.
- Liu P., Jiang J. Z., Wan X. F., Hua Y., Li L., Zhou J., Chen J. (2020): Are pangolins the intermediate host of the 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2)? *PLoS Pathogens*, 16(5), e1008421.
- Logunov D. Y., Dolzhikova I. V., Shcheblyakov D. V., Tukhvatulin A. I., Zubkova O. V., Dzharullaeva A. S., Gam-COVID-Vac Vaccine Trial Group. (2021): Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *The Lancet*.
- Los M., Wesselborg S., Schulze-Osthoff K. (1999): The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice. *Immunity*, 10(6), 629-639.
- Lu R., Zhao X., Li J., Niu P., Yang B., Wu H., Tan W. (2020): Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The lancet*, 395(10224), 565-574.
- Madu I. G., Roth S. L., Belouzard S., Whittaker G. R. (2009): Characterization of a highly conserved domain within the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein S2 domain with characteristics of a viral fusion peptide. *Journal of virology*, 83(15), 7411-7421.
- Mahase E. (2021): Covid-19: Novavax vaccine efficacy is 86% against UK variant and 60% against South African variant. *British Medical Journal*, 372:n296.
- Makarova K. S., Aravind L., Wolf Y. I., Koonin E. V. (2011b): Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR-Cas systems. *Biology direct*, 6(1), 38.
- Makarova K. S., Grishin N. V., Shabalina S. A., Wolf Y. I., Koonin E. V. (2006): A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biology direct*, 1(1), 7.
- Makarova K. S., Haft D. H., Barrangou R., Brouns S. J., Charpentier E., Horvath P., Van Der Oost J. (2011a): Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 9(6), 467-477.
- Mali P., Aach J., Stranges P. B., Esvelt K. M., Moosburner M., Kosuri S., Church G. M. (2013): CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nature biotechnology*, 31(9), 833-838.
- Mant A., Chinnery F., Elliott T., Williams A. P. (2012): The pathway of cross-presentation is influenced by the particle size of phagocytosed antigen. *Immunology*, 136(2), 163-175.
- Mantegazza A. R., Savina A., Vermeulen M., Pérez L., Geffner J., Hermine O., Amigorena S. (2008): NADPH oxidase controls phagosomal pH and antigen cross-presentation in human dendritic cells. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 112(12), 4712-4722.
- Matsue H., Yao J., Matsue K., Nagasaka A., Sugiyama H., Aoki R., Shimada S. (2006): Gap junction-mediated intercellular communication between dendritic cells (DCs) is required for effective activation of DCs. *The Journal of Immunology*, 176(1), 181-190.
- Mattson M. P., Chan S. L. (2003): Calcium orchestrates apoptosis. *Nature cell biology*, 5(12), 1041-1043.
- McKinnon K. M. (2018): Flow cytometry: An overview. *Current protocols in immunology*, 120(1), 5-1.
- Mendoza-Naranjo A., Saéz P. J., Johansson C. C., Ramírez M., Mandaković D., Pereda C., Salazar-Onfray F. (2007): Functional gap junctions facilitate melanoma antigen transfer and cross-presentation between human dendritic cells. *The Journal of Immunology*, 178(11), 6949-6957.
- Mojica F. J., Díez-Villaseñor C., García-Martínez J., Almendros C. (2009): Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*, 155(3), 733-740.

- Mojica F. J., Díez-Villaseñor C., Soria E., Juez G. (2000): Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular microbiology*, 36(1), 244-246.
- Moravec T. (2017): Editace genomů rostlin pomocí CRISPR/Cas9. *Vesmír*, 96(576).
- Mulder D. J., Pooni A., Mak N., Hurlbut D. J., Basta S., Justinich C. J. (2011): Antigen presentation and MHC class II expression by human esophageal epithelial cells: role in eosinophilic esophagitis. *The American journal of pathology*, 178(2), 744-753.
- Murray P. R., Rosenthal K. S., Pfaller M. A. (2015): Cellular immune responses. *Medical microbiology*. 13th ed. pp. 121-134, Elsevier Health Sciences, Mosby.
- Nakagawa T. Y., Brisette W. H., Lira P. D., Griffiths R. J., Petrushova N., Stock J., Rosloniec E. F. (1999): Impaired invariant chain degradation and antigen presentation and diminished collagen-induced arthritis in cathepsin S null mice. *Immunity*, 10(2), 207-217.
- Naqvi A. A. T., Fatima K., Mohammad T., Fatima U., Singh I. K., Singh A., Hassan M. I. (2020): Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 165878.
- Neijssen J., Herberts C., Drijfhout J. W., Reits E., Janssen L., Neefjes J. (2005): Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions. *Nature*, 434(7029), 83-88.
- Ng O. W., Chia A., Tan A. T., Jadi R. S., Leong H. N., Bertolotti A., Tan Y. J. (2016): Memory T cell responses targeting the SARS coronavirus persist up to 11 years post-infection. *Vaccine*, 34(17), 2008-2014.
- Nielsen M., Lundegaard C., Wornig P., Hvid C. S., Lamberth K., Buus S., Lund O. (2004): Improved prediction of MHC class I and class II epitopes using a novel Gibbs sampling approach. *Bioinformatics*, 20(9), 1388-1397.
- Núñez J. K., Kranzusch P. J., Noeske J., Wright A. V., Davies C. W., Doudna J. A. (2014): Cas1–Cas2 complex formation mediates spacer acquisition during CRISPR–Cas adaptive immunity. *Nature structural & molecular biology*, 21(6), 528.
- Oviedo-Orta E., Evans W. H. (2004): Gap junctions and connexin-mediated communication in the immune system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1662(1-2), 102-112.
- Papa G., Mallery D. L., Albecka A., Welch L. G., Cattin-Ortolá J., Luptak J., James L. C. (2021): Furin cleavage of SARS-CoV-2 Spike promotes but is not essential for infection and cell-cell fusion. *PLoS pathogens*, 17(1), e1009246.
- Peng S., Cao F., Xia Y., Gao X. D., Dai L., Yan J., Ma G. (2020): Particulate Alum via Pickering Emulsion for an Enhanced COVID-19 Vaccine Adjuvant. *Advanced Materials*, 32(40), 2004210.
- Pigni M., Ashok D., Stevanin M., Acha-Orbea H. (2018): Establishment and characterization of a functionally competent type 2 conventional dendritic cell line. *Frontiers in immunology*, 9, 1912.
- Polack F. P., Thomas S. J., Kitchin N., Absalon J., Gurtman A., Lockhart S., Gruber W. C. (2020): Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine. *New England Journal of Medicine*, 383(27), 2603-2615.
- Popov S. G., Villasmil R., Bernardi J., Grene E., Cardwell J., Wu A., Alibek K. (2002): Lethal toxin of Bacillus anthracis causes apoptosis of macrophages. *Biochemical and biophysical research communications*, 293(1), 349-355.
- Ratan Z. A., Son Y. J., Haidere M. F., Uddin B. M. M., Yusuf M. A., Zaman S. B., Cho J. Y. (2018): CRISPR-Cas9: a promising genetic engineering approach in cancer research. *Therapeutic advances in medical oncology*, 10, 1758834018755089.
- Reche P. A., Reinherz E. L. (2003): Sequence variability analysis of human class I and class II MHC molecules: functional and structural correlates of amino acid polymorphisms. *Journal of molecular biology*, 331(3), 623-641.
- Riese R. J., Wolf P. R., Brömme D., Natkin L. R., Villadangos J. A., Ploegh H. L., Chapman H. A. (1996): Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity*, 4(4), 357-366.
- Rizzuto R., Pinton P., Ferrari D., Chami M., Szabadkai G., Magalhaes P. J., Pozzan T. (2003): Calcium and apoptosis: facts and hypotheses. *Oncogene*, 22(53), 8619-8627.
- Robbins S. H., Walzer T., Dembélé D., Thibault C., Defays A., Bessou G., Sharp F. R. (2008): Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling. *Genome biology*, 9(1), R17.

- Roubalová. Průtoková cytometrie. *FONS Bulletin*. [online] 2012 [cit. 10.1.2021] Dostupné z <http://www.bulletinfons.cz/22012/lab01.pdf>
- Sampson T. R., Saroj S. D., Llewellyn A. C., Tzeng Y. L., Weiss D. S. (2013): A CRISPR/Cas system mediates bacterial innate immune evasion and virulence. *Nature*, 497(7448), 254-257.
- Sancho D., Joffre O. P., Keller A. M., Rogers N. C., Martinez D., Hernanz-Falcón P., e Sousa C. R. (2009): Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. *Nature*, 458(7240), 899-903.
- Saveanu L., Fruci D., Van Endert P. M. (2002): Beyond the proteasome: trimming, degradation and generation of MHC class I ligands by auxiliary proteases. *Molecular immunology*, 39(3-4), 203-215.
- Savina A., Peres A., Cebrian I., Carmo N., Moita C., Hacohen N., Amigorena S. (2009): The small GTPase Rac2 controls phagosomal alkalization and antigen crosspresentation selectively in CD8+ dendritic cells. *Immunity*, 30(4), 544-555.
- Segura E., Albiston A. L., Wicks I. P., Chai S. Y., Villadangos J. A. (2009): Different cross-presentation pathways in steady-state and inflammatory dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(48), 20377-20381.
- Serwold T., Gaw S., Shastri N. (2001): ER aminopeptidases generate a unique pool of peptides for MHC class I molecules. *Nature immunology*, 2(7), 644-651.
- Serwold T., Gonzalez F., Kim J., Jacob R., Shastri N. (2002): ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature*, 419(6906), 480-483.
- Shen L., Sigal L. J., Boes M., Rock K. L. (2004): Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crosspresentation in vivo. *Immunity*, 21(2), 155-165.
- Shi G. P., Munger J. S., Meara J. P., Rich D. H., Chapman H. A. (1992): Molecular cloning and expression of human alveolar macrophage cathepsin S, an elastinolytic cysteine protease. *Journal of Biological Chemistry*, 267(11), 7258-7262.
- Schreibelt G., Klinkenberg L. J., Cruz L. J., Tacke P. J., Tel J., Kreutz M., de Vries I. J. M. (2012): The C-type lectin receptor CLEC9A mediates antigen uptake and (cross-) presentation by human blood BDCA3+ myeloid dendritic cells. *Blood*, 119(10), 2284-2292.
- Schubert U., Anton L. C., Gibbs J., Norbury C. C., Yewdell J. W., Bennink J. R. (2000): Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature*, 404(6779), 770-774.
- Schuster A., Erasmus H., Fritah S., Nazarov P. V., van Dyck E., Niclou S. P., Golebiewska A. (2019): RNAi/CRISPR screens: from a pool to a valid hit. *Trends in biotechnology*, 37(1), 38-55.
- Siomi H., Siomi M. C. (2009): On the road to reading the RNA-interference code. *Nature*, 457(7228), 396-404.
- Slee E. A., Adrain C., Martin S. J. (2001): Executioner caspase-3,-6, and-7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *Journal of biological Chemistry*, 276(10), 7320-7326.
- Spiliotis E. T., Osorio M., Zúñiga M. C., Edidin M. (2000): Selective export of MHC class I molecules from the ER after their dissociation from TAP. *Immunity*, 13(6), 841-851.
- Spinato G., Fabbris C., Polesel J., Cazzador D., Borsetto D., Hopkins C., Boscolo-Rizzo P. (2020): Alterations in smell or taste in mildly symptomatic outpatients with SARS-CoV-2 infection. *Jama*, 323(20), 2089-2090.
- Sternberg A., Naujokat C. (2020): Structural features of coronavirus SARS-CoV-2 spike protein: Targets for vaccination. *Life sciences*, 118056.
- Suda J. (2005): Co se skrývá za rostlinnou průtokovou cytometrií. *Živa*, 53(1), 46-48.
- Sun F., Anantharam V., Zhang D., Latchoumycandane C., Kanthasamy A., Kanthasamy A. G. (2006): Proteasome inhibitor MG-132 induces dopaminergic degeneration in cell culture and animal models. *Neurotoxicology*, 27(5), 807-815.
- Šinkorová Z., Zárbynická L. (2008): Průtoková cytometrie jako analytická a selekční metoda. I. část. *MMSL*, 77(3), 98-103.
- Tai W., He L., Zhang X., Pu J., Voronin D., Jiang S., Du L. (2020): Characterization of the receptor-binding domain (RBD) of 2019 novel coronavirus: implication for development of RBD protein as a viral attachment inhibitor and vaccine. *Cellular & molecular immunology*, 17(6), 613-620.
- Tregoning J. S., Brown E. S., Cheeseman H. M., Flight K. E., Higham S. L., Lemm N. M., Pollock K. M. (2020): Vaccines for COVID-19. *Clinical & Experimental Immunology*, 202(2), 162-192.

- Trombetta E. S., Ebersold M., Garrett W., Pypaert M., Mellman I. (2003): Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation. *Science*, 299(5611), 1400-1403.
- Tsunawaki S., Nakamura S., Ohyama Y., Sasaki M., Ikebe-Hiroki A., Hiraki A., Shirasuna K. (2002): Possible function of salivary gland epithelial cells as nonprofessional antigen-presenting cells in the development of Sjögren's syndrome. *The Journal of rheumatology*, 29(9), 1884-1896.
- Wang M. Y., Zhao R., Gao L. J., Gao X. F., Wang D. P., Cao J. M. (2020): SARS-CoV-2: structure, biology, and structure-based therapeutics development. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10.
- Wearsch P. A., Peaper D. R., Cresswell P. (2011): Essential glycan-dependent interactions optimize MHC class I peptide loading. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(12), 4950-4955.
- Wieczorek M., Abualrous E. T., Sticht J., Alvaro-Benito M., Stolzenberg S., Noé F., Freund C. (2017): Major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II proteins: conformational plasticity in antigen presentation. *Frontiers in immunology*, 8, 292.
- Wiedenheft B., Sternberg S. H., Doudna J. A. (2012): RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature*, 482(7385), 331-338.
- Wiedenheft B., Zhou K., Jinek M., Coyle S. M., Ma W., Doudna J. A. (2009): Structural basis for DNase activity of a conserved protein implicated in CRISPR-mediated genome defense. *Structure*, 17(6), 904-912.
- Wiertz E. J., Tortorella D., Bogyo M., Yu J., Mothes W., Jones T. R., Ploegh H. L. (1996): Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature*, 384(6608), 432-438.
- World Health Organization. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. [online] ©2021 [cit. 10.2.2021] Dostupné z <https://Covid19.who.int/>
- Wu X., Scott D. A., Kriz A. J., Chiu A. C., Hsu P. D., Dadon D. B., Jaenisch R. (2014): Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells. *Nature biotechnology*, 32(7), 670-676.
- Xu Z., Shi L., Wang Y., Zhang J., Huang L., Zhang C., Wang F. S. (2020): Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *The Lancet respiratory medicine*, 8(4), 420-422.
- Zachová K., Křupka M., Raška M. (2016): Antigen cross-presentation and heat shock protein-based vaccines. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis*, 64(1), 1-18.
- Zatloukalová P., Krejčíř R., Valík D., Vojtěšek B. (2019): CRISPR-Cas9 jako nástroj v terapii nádorových onemocnění. *Klinická onkologie*, 32(5).
- Zhou P., Yang X. L., Wang X. G., Hu B., Zhang L., Zhang W., Shi Z. L. (2020): A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *nature*, 579(7798), 270-273.
- Zhu N., Zhang D., Wang W., Li X., Yang B., Song J., Tan W. (2020): A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England journal of medicine*.
- Zou L., Ruan F., Huang M., Liang L., Huang H., Hong Z., Wu J. (2020): SARS-CoV-2 viral load in upper respiratory specimens of infected patients. *New England Journal of Medicine*, 382(12), 1177-1179.