

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Molekulární mechanismy aktivace dendritických buněk jako iniciátorů specifické imunitní odpovědi

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Lubomír Machalla
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Kateřina Zachová, Ph.D.
Rok:	: 2020

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl/a jsem seznámen/a s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

Chtěl bych zde poděkovat mé vedoucí bakalářské práce Mgr. Kateřině Zachové, Ph.D. za trpělivost, ochotu, cenné rady a odborné vedení při vypracování předkládané bakalářské práce. Poděkování rovněž náleží pracovišti Ústavu imunologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého, kde mi bylo umožněno práci zrealizovat.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Lubomír Machalla
Název práce	Molekulární mechanismy aktivace dendritických buněk jako iniciátorů specifické imunitní odpovědi
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Ústav imunologie, Lékařská fakulta Univerzity Palackého, Olomouc
Vedoucí práce	Mgr. Kateřina Zachová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020

Abstrakt

Dendritické buňky jsou důležitá součást imunitního systému. Jedním z jejich hlavních úkolů je pohlcovat a zpracovávat antigeny. Následně fragmenty zpracovaného antigenu dendritické buňky vystavují na svém povrchu. Na takto vystavené antigenní fragmenty poté zareagují buňky specifické části imunitního systému. Jak velká specifická imunitní odpověď na antigen se vytvoří, proto také záleží, jak moc budou dendritické buňky stimulovány antigenem.

V rámci teoretické části bakalářské práce byla vypracována rešerše na téma dendritické buňky a jejich prezentace antigenu na MHC I, MHC II molekulách a také prezentace antigenu pomocí zkřížené prezentace. Dále je poté teoretická část věnována charakterizaci liposomů jako nanočástic, popisu vlastností mananu jako buněčného imunomodulátoru a stručnému popisu proteinu viru HIV s označením p24. Praktická část obsahuje porovnání imunomodulační aktivity antigenních konstruktů p24, p24 navázaným na liposomu a p24 navázaným na liposomu společně s mananem.

Naměřené výsledky byly získány pomocí metody spektrální průtokové cytometrie s pomocí konfokální mikroskopie. U všech pulzovaných buněk došlo ke zvýšení exprese většiny pozorovaných imunomodulačních markerů. Ne vždy měl liposom a manan vliv na zvýšení imunomodulační aktivity p24 proteinu. U markerů CD40 a MHCI byla nejvyšší exprese způsobena pouze p24 proteinem. U markeru MHCII byl liposom účinný a způsobil nejvyšší expresi. Markery CD86 a CD80 byly nejvíce exprimovány buňkami, které byly pulzovány p24 navázaným na liposomu společně s mananem. Jen u markeru CD11c došlo ke snížení exprese u pulzovaných buněk oproti buňkám, které nebyly pulzovány žádným antigenním konstruktem.

Klíčová slova	Dendritické buňky, protein s označením p24, hlavní histokompatibilní komplex, spektrální průtoková
---------------	--

cytometrie

Počet stran

58

Počet příloh

0

Jazyk

Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Lubomír Machalla
Title	Molecular mechanisms of dendritic cells activation as an initiator of specific immune cell response
Type of thesis	Bachelor
Department	Palacky University, Faculty of Medicine and Dentistry, Department of Immunology, Olomouc
Supervisor	Mgr. Kateřina Zachová, Ph.D.
The year of presentation	2020

Abstract

Dendritic cells are an important part of the immune system. One of their main function is to absorb and process antigens. After that, modified antigen fragments are exposed on surface of dendritic cells . Then a specific immune response is initiated against those antigen fragments. It depends also on the stimulation of dendritic cells how strong the specific immune response will be.

The theoretical part of the bachelor thesis is focused on denritic cells and their presentation of antigen on MHC I, MHC II molecules and also their presentation of antigen by cross-presentation. Furthermore, the theoretical part is devoted to the characterization of liposomes as nanoparticles, description of the properties of the HIV protein labelled p24. The practical part contains a comparison of immunomodulatory activity of antigen constructs p24, liposome-bound p24 and liposome-bound p24 together with mannan.

The measured results were obtained by means of spectral flow cytometry and confocal microscopy. The obtained results were then evaluated in FlowJo and GraphPad Prism software. All pulsed cells increased expression of most of the observed immunomodulatory markers. Liposome and mannan did not always have the effect of increasing the immunomodulatory activity of the p24 protein. The strongest expression of CD40 and MHC I markers was caused only by p24. For the MHC II marker, the liposome was effective and caused the strongest expression. The CD86 and CD80 markers were expressed the most by cells that were pulsed with liposome-bound p24 together with mannan. Only the expression of CD11c marker was decreased in pulsed cells compared to cells that were not pulse with any antigen construct.

Keywords	Dendritic cells, p24 protein, major histocompatibility complex, spectral flow cytometry
Number of pages	58
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	Úvod.....	11
2	Současný stav řešené problematiky	12
2.1	Imunitní systém	12
2.1.1	Vrozené mechanismy	12
2.1.2	Adaptivní mechanismy.....	12
2.1.3	Buňky imunitního systému (imunocyty).....	13
2.2	Antigen	14
2.3	Vakcinace	14
2.4	Antigen prezentující buňky a funkce MHC molekuly	15
2.5	Cesta klasické prezentace antigenu	16
2.5.1	Prezentace pomocí MHC II.....	16
2.5.2	Prezentace pomocí MHC I.....	17
2.5.3	Zkřížená prezentace (antigen cross presentation)	19
2.5.4	Základní princip zkřížené prezentace.....	19
2.5.5	Cesta zkřížené antigen prezentace (Cytosolová cesta).....	19
2.5.5.1	Cesta z endosomu do cytosolu.....	19
2.5.5.2	Cesta z endosomu do cytosolu a následně zpátky do endosomu..	21
2.5.5.3	Cesta zkřížené prezentace (Vakuolární cesta)	22
2.5.5.4	Zkřížená antigenní prezentace pomocí mezibuněčné komunikace 23	
2.6	P24.....	24
2.7	Manan	24
2.8	Virus HIV	26
2.8.1	Struktura viru HIV	26
2.8.2	Přirozená imunita vůči některým kmenům viru HIV.....	27
2.8.3	Původ a rozšíření mutace genu pro chemokinový receptor CCR5	28
2.9	Liposomy	29
2.10	Metalochelatační liposomy.....	29
2.11	Spektrální průtoková cytometrie	30
3	Experimentální část.....	31
3.1	Materiál	31
3.1.1	Použité chemikálie	31

3.1.2	Použité roztoky.....	31
3.1.3	Přístroje a pomůcky.....	32
3.2	Použité metody	32
3.2.1	Příprava a kultivace adherentních buněk	32
3.2.2	Počítání buněk.....	33
3.2.3	Pulzace buněk antigeny pro konfokální mikroskopii.....	34
3.2.4	Pulzace buněk antigeny pro spektrální průtokovou cytometrii.....	35
3.2.5	Postup barvení a příprava komůrek na konfokální mikroskopii	36
3.2.6	Postup barvení na cytometrii.....	36
3.2.7	Vytvoření knihovny s fluorochromy	36
3.2.7.1	Nastavení knihovny pomocí kuliček.....	36
3.2.8	Nastavení experimentu.....	37
4	Výsledky	38
4.1	Stanovení exprese buněčných markerů	38
4.2	Pozorování buněk pomocí konfokální mikroskopie.....	42
4.3	Porovnání hodnot exprese markerů získaných pomocí SPC.....	44
5	Diskuze	46
6	Závěr	48
7	Seznam použité literatury	50
8	Seznam použitých zkratk	58

Cíle práce

1. Vypracování literární rešerše na téma možnosti prezentace antigenu - MHC I, MHC II, zkřížená – prezentace, charakterizace liposomů jako nanočástic, popis vlastností mananu jako buněčného imunomodulátoru, stručný popis p24 (HIV) proteinu
2. Porovnání imunomodulační aktivity antigenu p24, p24-liposom, p24-liposom-manan na buněčné linii dendritických buněk
3. Vyhodnocení internalizace jednotlivých antigenních konstruktů pomocí fluorescenční (konfokální) mikroskopie a spektrální průtokové cytometrie
4. Zpracování jednotlivých dat v programech FlowJo, GraphPad

1 ÚVOD

Imunitní systém je nepostradatelná část mnohobuněčných organismů, a proto spadá k základním homeostatickým mechanismům organismu. Funkce takového systému je nezastupitelná, protože chrání organismus před vnějšími a vnitřními vlivy prostředí. Dělí se zpravidla na dvě části, a to na část vrozenou a získanou. Obě části imunitního systému obsahují složky humorální a buněčné. Humorální složka se skládá z různých sérových proteinů a sekretovaných molekul. Buněčná složka je pak tvořena různými typy buněk.

Tato složka skládající se z buněk je v dnešní době velmi pečlivě studovaná část imunitního systému, hlavně část získané imunity, a to z důvodu její schopnosti pamatovat si daný antigen a při pozdějším setkání s antigenem rychle na něj zareagovat. Důležitou součástí a tzv. propojením mezi imunitou vrozenou a získanou jsou buňky nazývané se antigen prezentující buňky (APC) a jejich nedílnou součástí jsou dendritické buňky (DC). Tyto buňky mají schopnost fagocytovat daný antigen, rozložit jej a spojit s molekulou hlavního histokompatibilního komplexu (MHC). Takto upravený antigen následně prezentují na svém povrchu a tímto aktivují T lymfocyty. Při této prezentaci používají antigen prezentující buňky 2 typy MHC molekul (MHC I a MHC II molekuly). Rozdíl mezi těmito molekulami a jejich využití je v antigenu. Exogenní antigeny, původem např. z bakterií, jsou vystavovány antigenně prezentujícími buňkami pomocí MHC II molekuly a aktivují tak pomocné CD4+ T lymfocyty. Zatímco antigeny původem z intercelulárních patogenů (např. virů) jsou prezentovány pomocí MHC I molekul, tak jako v jiných virem napadených buňkách.

Zjistilo se však, že někdy APC prezentují exogenní antigeny nikoli na MHC II molekule, ale na MHC I molekule, čímž se aktivují CD8+ T lymfocyty. Tomuto jevu se říká zkřížená prezentace. Dnešní vakcíny v klinickém použití obsahují různá adjuvantia, které hlavně stimulují typ imunitní odpovědi založený na tvorbě protilátek. Nicméně tento druh imunitní odpovědi je účinný pouze proti některým druhům patogenů a má velmi omezené účinky proti nádorovým buňkám a některým virovým infekcím. Proto je hlavním tématem dnešních výzkumů vývoj vakcín, které by vyvolaly antigenně specifickou imunitní odpověď v podobě CD8+ T lymfocytů (Hořejší, 2017; Zachová 2016).

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Imunitní systém

Imunitní systém je jeden ze základních mechanismů organismu, který udržuje integritu a rovnováhu organismu tím, že rozeznává „škodlivé“ od „neškodného“ a chrání tak organismus před škodlivinami pocházejících ze zevního i vnitřního prostředí. Působení imunitního systému se projevuje jako obranyschopnost (rozpoznávání vnějších škodlivin a ochrana organismu před patogenními mikroorganismy a jejich toxiny, autotolerance (rozpoznávání a tolerance vlastních tkání organismu) a imunitní dohled (rozpoznání a likvidace starých, zmutovaných či poškozených buněk)). Imunitní mechanismy můžeme rozdělit na dvě hlavní části: vrozené (neadaptivní) a získané (adaptivní). Získané imunitní mechanismy bývají často označovány jako antigenně specifické. (Hořejší, 2017).

2.1.1 Vrozené mechanismy

Vrozené mechanismy jsou evolučně starší a nejsou tak účinné jako mechanismy specifické části imunitního systému. Základem účinku vrozených mechanismů jsou molekuly a buňky, které jsou účinné běžně proti různým patogenům, protože využívají společné strukturní nebo funkční vlastnosti. Hlavním zástupcem buněčně vrozeného systému jsou fagocytující buňky a přirozeně cytotoxické buňky s názvem natural killers - „přirození zabíječi“ (NK buňky). Humorální složka vrozené imunity je tvořena interferony, komplementovým systémem, lektiny a dalšími sérovými proteiny. Rychlost reakce vrozených mechanismů na přítomnost škodlivin je v řádu minut (Hořejší, 2017).

2.1.2 Adaptivní mechanismy

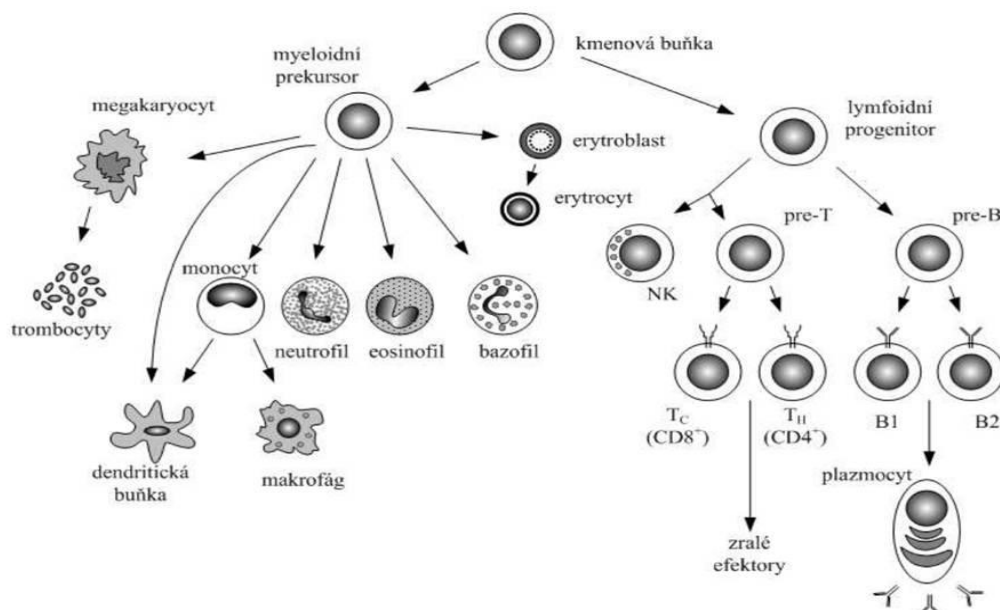
Adaptivní mechanismy, které jsou evolučně mladší (známé až u obratlovců) než vrozené mechanismy, potřebují k úplnému rozvoji imunitní reakce několik dnů až týdnů. Tyto mechanismy se spouštějí až po setkání s antigenem a pro jejich zahájení je nutná aktivita vrozené imunitní odpovědi. Tato část imunitního systému je daleko účinnější než vrozená část imunitního systému, protože na cizorodou strukturu působí pomocí specifických molekul s názvem protilátky a zároveň má imunologickou paměť (Hořejší, 2017). Imunologická paměť je výjimečná vlastnost

imunitního systému, poněvadž dokáže „ukládat“ informace o podnětu a následně při znovu objevení daného podnětu na něj účinně zareagovat. Tato druhotná odpověď imunitního systému při znovuoobjevení daného podnětu je rychlejší a silnější než v případě prvotní odpovědi. K sekundární odpovědi může docházet i po mnoha letech po prvotním setkání s daným podnětem. Imunologická paměť je důležitá při terapii pomocí vakcín a hraje také důležitou roli při úspěšné léčbě v transplantologii nebo při porozumění daným autoimunitním nemocem. Za imunologickou paměť jsou zodpovědné subpopulace T a B lymfocytů a NK (natural killers) buňky (Ratajczak, 2018).

2.1.3 Buňky imunitního systému (imunocyty)

Důležitou součástí imunitního systému představují různé druhy bílých krvinek (leukocyty). Tyto buňky imunitního systému se vyvíjejí z pluripotentních kmenových buněk. Z kmenových buněk vznikají dvě hlavní linie buněk, a to myeloidní a lymfoidní. Z myeloidní linie vznikají buňky vrozené části imunitního systému, kam patří: monocyty, makrofágy, granulocyty (neutrofil, eozinofil a bazofil), dendritické buňky a žírné buňky (mastocyty). Buněčné populace myeloidní linie tvoří základ vrozené části imunitního systému. Z lymfoidní linie se tvoří lymfocyty B a T a také tzv. ILC buňky (innate lymphoid cells - přirozené lymfoidní buňky), mezi které patří NK (natural killers) buňky a další typy lymfocytů.

Většinu buněčných populací z lymfoidní linie řadíme do adaptivní části imunitního systému. Důležité je však poznamenat, že součástí adaptivní části imunitního systému jsou také APC (antigen prezentující buňky) buňky, kam patří dendritické buňky, makrofágy a monocyty. APC buňky hrají důležitou roli při spolupráci s T lymfocyty, a proto jsou zařazeny rovněž do specifické části imunitního systému. Této spolupráce se využívá při zásahu do imunitního systému s pomocí aktivní imunizace (vakcinace) (Hořejší, 2017).



Obr. 1 Schéma diferenciacie různých druhů leukocytů z kmenové buňky Převzato a upraveno dle Hořejší, 2005; Slottá, 2007

2.2 Antigen

Antigeny jsou jakékoliv látky, které jsou organismu cizí, a proto imunitní systém takovéto látky rozpoznává a reaguje na ně. Antigeny mohou pocházet z vnějšího, tak také z vnitřního prostředí. Do skupiny antigenů, které pocházejí z vnějšího prostředí, tzv. exoantigeny, patří většinou různé patogenní mikroorganismy a jejich produkty. Antigeny, které pocházejí z vnitřního prostředí organismů, se nazývají autoantigeny (Hořejší, 2017).

2.3 Vakcinace

Při aktivní imunizaci (vakcinaci) se využívá konkrétního antigenu pro vyvolání specifické imunitní reakce, vedoucí k odolnosti organismu vůči patogenu, který nese stejný antigen, nebo antigen dosti podobný. Pro vytvoření kvalitní dlouhotrvající imunitní odpovědi je potřeba do očkovacích vakcín přidávat adjuvancia (látky, které napomáhají pohlcení antigenu APC). V humánní medicíně se používá nejčastěji jako adjuvancium hydroxid hlinitý. Velice důležité je, aby adjuvancia neměla velké vedlejší účinky. V případě hydroxidu hlinitého se neprokázaly žádné vedlejší účinky. Dalším důležitým faktorem pro dobrý výsledek aktivní imunizace je způsob podání, což znamená vyhnout se toleranci imunitního systému na antigen.

V současnosti máme 4 druhy vakcín, kde se používají mikroorganismy, případně jejich antigenní složky. Tyto čtyři druhy zahrnují atenuované (oslabené) živé mikroorganismy, izolované složky mikroorganismů (podjednotkové vakcíny), inaktivované (usmrčené) mikroorganismy a toxoidy (chemicky modifikované, inaktivované mikrobiální toxiny). Vakcinace zabraňují možnému vzniku budoucího onemocnění a tím se řadí k prosperujícím profylaktickým metodám. Teprve v poslední době se však začaly uplatňovat racionální postupy při tvorbě vakcín díky hlubšímu poznání imunitních mechanismů. Vakcíny v dnešní době v klinickém použití stimulují Th2 typ imunitní odpovědi. Tento typ imunitní odpovědi vyvolávající tvorbu specifických protilátek je efektivní při eliminaci bakterií a parazitů.

V případě virových infekcí a tumorů je třeba vyvolat CD8⁺ T lymfocytární odpověď vedoucí k cytotoxické eliminaci napadených buněk. Proto je jednou z hlavních perspektiv výzkumů anti-virálních a anti-tumorových vakcín vyvinout takovou vakcínu, která by vyvolala, jak CD4⁺ T lymfocytární odpověď, tak CD8⁺ T cytotoxickou odpověď. Ovšem zprostředkování CD8⁺ T lymfocytární odpovědi vyžaduje zkříženou prezentaci antigenu v antigen prezentujících buňkách především v buňkách dendritických (Hořejší, 2017).

2.4 Antigen prezentující buňky a funkce MHC molekuly

Prezentace antigenu na molekule MHC (hlavní histokompatibilní komplex) používají všechny jaderné buňky organismu. Je však velmi důležité poznamenat, že tyto buňky organismu využívají k prezentaci MHC I molekulu. Mezi APC buňky řadíme dendritické buňky, makrofágy, monocyty a B lymfocyty. APC využívají, jak MHCI molekuly, tak zároveň MHC II molekuly k antigenní prezentaci. MHC II molekuly vážou fragmenty exogenních peptidů, zatímco MHC I molekuly slouží k vazbě peptidů pocházejících z endogenních proteinů (antigenů). Podstatné je podotknout, že buňky, které prezentují antigeny, jsou právě dendritické buňky, které tvoří hlavní propojení mezi získanou a vrozenou imunitou.

V organismu se nacházejí dendritické buňky ve dvou formách, a to zralé a nezralé. Nezralé dendritické buňky v organismu pohlcují odumřelé buňky zdravých tkání a molekuly rozpuštěné v mezibuněčné tekutině. Poté fragmenty těchto molekul

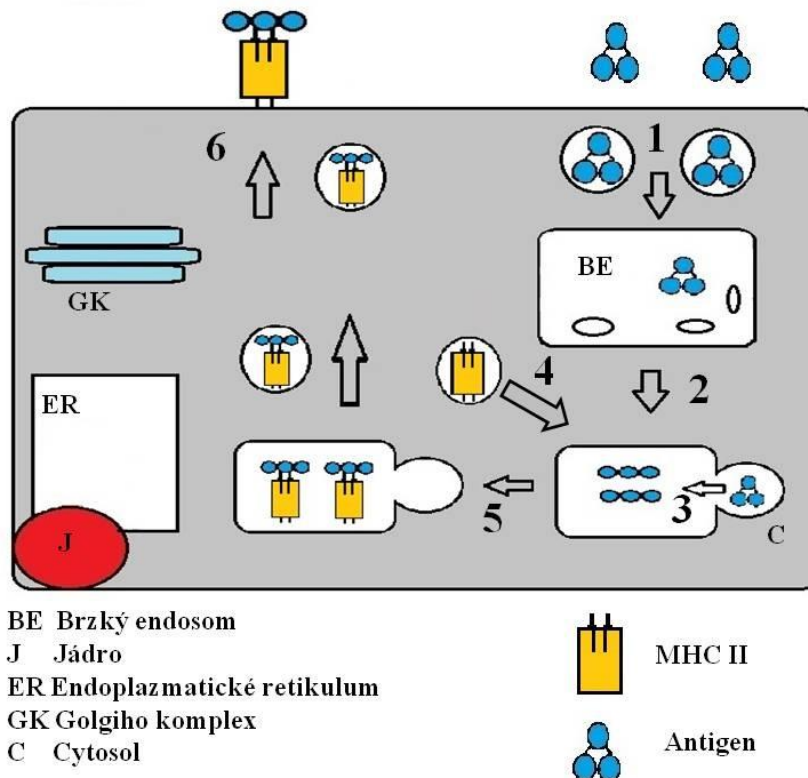
vystavují na svém povrchu. T lymfocyt při kontaktu s dendritickou buňkou (DC) takto vystavený autoantigen rozpozná a nevytváří žádnou reakci. Je tímto setkáním utlumen. Jakmile potká v organismu nezralá dendritická buňka antigen představující nebezpečí pro organismus (patogenní mikroorganismus či buňky, které zahynuly nekrotizací), tak se změní ve zralou dendritickou buňku. Tato buňka ztrácí schopnost pohlcovat částice z okolí, ale už má schopnost aktivovat T lymfocyty. Stává se z ní účinná APC. Ztráta schopnosti pohlcovat částice z okolí je zapříčiněna silným zvýšením exprese MHC proteinů. (Hořejší, 2017; Zachová, 2016).

2.5 Cesta klasické prezentace antigenu

2.5.1 Prezentace pomocí MHC II

Klasická MHC II prezentace je zahájena endocytózou exogenního antigenu pomocí APC do endocytických váčků za pomoci využití různých mechanismů zprostředkovaných častokrát díky receptorům např. na klathrin. Podle velikosti pohlceného materiálu se může jednat o pinocytózu či fagocytózu. Endocytické váčky jsou poté spojeny s brzkým endosomem a následně vzniká multivezikulární tělísko/endosom.

Multivezikulární tělísko/endosom poté putuje směrem k jádru buňky. Následné spojení s lysosomem vede ke vzniku fagolysosomu, který obsahuje díky lysosomu značné množství hydrolytických enzymů, jež díky poklesu pH rozloží antigen na jednotlivé krátké peptidové fragmenty skládající se z 15-35 aminokyselin a nakonec na dipeptidy a aminokyseliny. Následně se k fagolysosomu připojí váčky obsahující MHC II molekuly, jež způsobí napojení fragmentů antigenu na MHC II molekuly, které se následně transportují k buněčnému povrchu. Takto vystavené antigenní fragmenty interagují se CD4⁺ T lymfocyty (COFFEY, 1968; Desjardins, 1994; DONALDSON, 2009; Grant, 2009; Trombetta, 2003; Woodman; 2008; Zachová 2016).



Obr. 2: Schéma prezentace antigenu pomocí MHC II molekuly

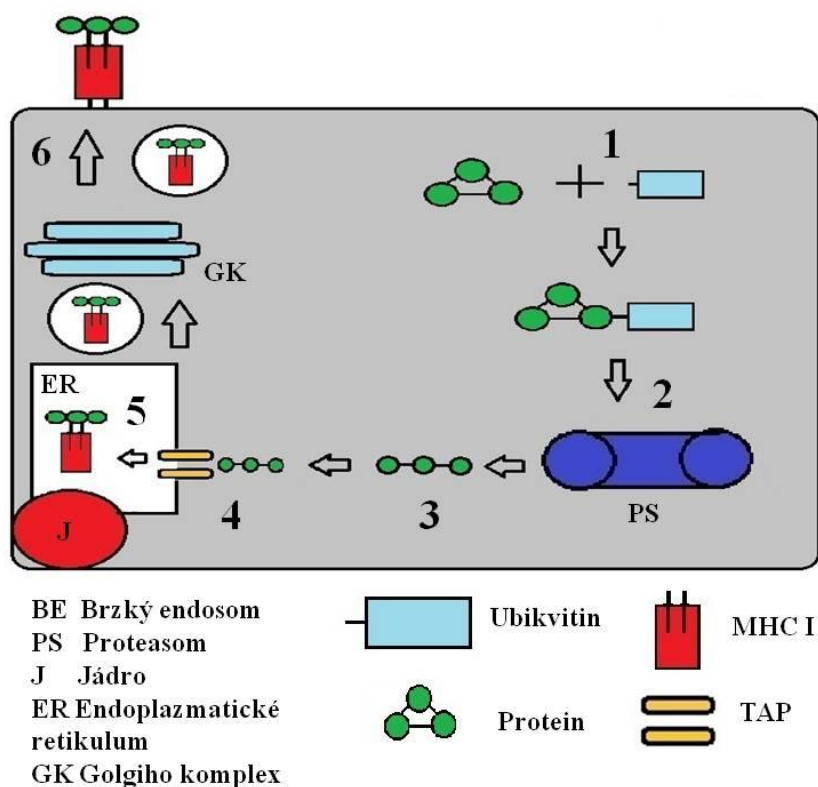
1. Vytvoření endocytických váčků s antigenem
2. Sloučení váčků s brzkým endosomem
3. Rozložení antigenu ve fagolysosomu
4. Spojení fagolysosomu s váčky obsahující MHC II molekuly
5. Spojení MHC II molekuly a antigenu
6. Vystavování komplexu MHC II/antigen na buněčném povrchu

2.5.2 Prezentace pomocí MHC I

Klasická MHC I prezentace probíhá kontinuálně. Na MHC I jsou navázány peptidy pocházející z endogenních proteinů. Tyto proteiny jsou syntetizovány v cytosolu nebo jsou do cytosolu dopraveny z endoplazmatického retikula (ER). Chybné, poškozené proteiny (tumorové antigeny, jsou dopravovány do cytosolu z endoplazmatického retikula pravděpodobně za pomoci proteinů s označením Sec61 a Derlin-1. V cytosolu následnou ubiquitinylací proteinů určených k MHC I prezentaci jsou tyto proteiny směřovány do proteasomu (PS), kde jsou štěpeny na peptidové fragmenty. Tyto peptidové fragmenty jsou následně přemístěny pomocí transportéru spojeného s antigenním zpracováváním (TAP1 a TAP2) do lumenu endoplazmatického retikula, kde se vážou na MHC I molekuly.

Důležité je zmínit, že před navázáním jsou fragmenty ještě upravené pomocí aminopeptidas 1 nebo 2 (ERAP 1, ERAP 2) na délku 8-10 aminokyselin, aby se

vešly ideálně do drážky MHC I molekuly. Dále je MHC I molekula s navázanými peptidovými fragmenty transportována pomocí vezikulárního transportu skrz Golgiho komplex na buněčný povrch. Tímto způsobem vystavené peptidové fragmenty jsou rozpoznávány receptory buněk T lymfocytů, konkrétně CD8+ T lymfocyty (Saveanu, 2002; Cresswell, 1999; Serwold, 2001; Serwold, 2002; Zachová, 2016).



Obr. 3: Schéma prezentace antigenu pomocí MHC I molekuly

1. Spojení proteinu s ubikvitinem 2. Vstup komplexu protein/ubikvitin do PS a jeho štěpení 3. Opuštění PS peptidovými fragmenty a směřování do ER 4. Vstup proteinu pomocí TAP do ER 5. Spojení MHC I molekuly s proteinem 6. Vystavování komplexu MHC I/protein na buněčném povrchu

2.5.3 Zkřížená prezentace (antigen cross presentation)

Zjistilo se, že některé exogenní antigeny nejsou rozpoznávány pouze CD4⁺ T lymfocyty, ale také CD8⁺ T lymfocyty (Bevan, 1976). K aktivaci CD8⁺ T lymfocytů je nicméně potřeba vystavit daný antigen dendritickými buňkami pomocí MHC I molekuly. Touto schopností disponují některé subpopulace dendritických buněk a pravděpodobně také makrofágů. Tomuto jevu, který popisuje mechanismus zodpovědný za proces prezentace exogenního antigenu na MHC I molekule, se říká zkřížená antigenní prezentace (Bevan, 1976, Zachová, 2016).

2.5.4 Základní princip zkřížené prezentace

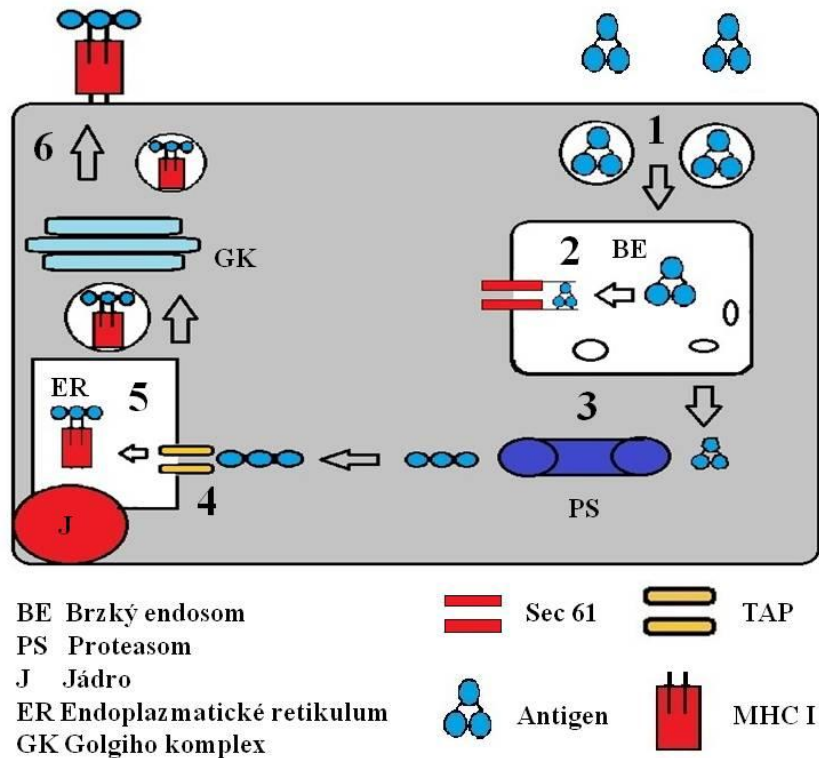
V zásadě má zkřížená prezentace 3 hlavní kroky. Prvním krokem je fragmentace antigenu na peptidy o velikosti odpovídající k navázání na MHC I molekulu. Druhým krokem je navázání peptidu fragmentovaného antigenu na MHC I molekulu a následuje transport komplexu MHC I/peptid na buněčný povrch. Existují dvě cesty, pomocí kterých může být antigen rozložen a následně spojen s MHC I molekulou. V první cestě je antigen přemístěn z endosomu do cytosolu a poté cílen do immunoproteasomu, kde následuje podobný mechanismus, jako je při MHC I prezentaci (cytosolová cesta). V druhé cestě je antigen rozložen uvnitř fagocytujících váček (převážně endosom), kde je následně spojen s MHC I molekulou a transportován na buněčný povrch, aniž by byl vystaven cytosolovému prostředí. Nicméně bylo pozorováno, že při křížové antigenní prezentaci, cytosolový antigen může být zpátky transportován do endosomu k MHC I prezentaci (Gromme, 1999). V následujících částech jsou popsány jednotlivé cesty zkřížené antigenní prezentace s použitím cytosolové a vakuolární cesty.

2.5.5 Cesta zkřížené antigen prezentace (Cytosolová cesta)

2.5.5.1 Cesta z endosomu do cytosolu

Nejprve je exogenní antigen pohlcen dendritickou buňkou, kde se vytvoří endocytické váčky obsahující antigen. Následně se tyto váčky sloučí s brzkým endosomem. V následující fázi opouští antigen brzký endosom pomocí transportního komplexu Sec61 a poté je štěpen proteasomem na krátké peptidy. Tyto peptidy

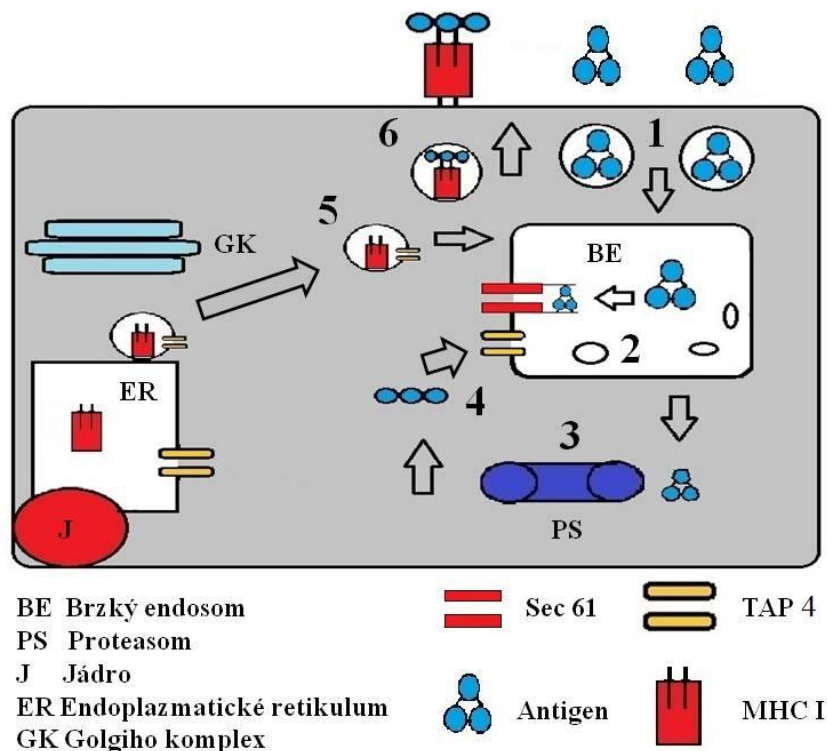
antigenu poté putují do endoplazmatického retikula (ER) pomocí transportéru TAP, jak v klasické MHC I prezentaci. Uvnitř ER se peptidy spojí s MHC I molekulou a jako komplex MHC I/peptid putují přes ER a Golgiho aparát na buněčný povrch (Guermontez, 2003; Kovacsovic-Bankowski, 1995; Ichiyanagi, 2010; Imai, 2011; Mukai, 2011; Singh, 2010; Zachová, 2016).



Obr. 4 Schéma zkřížené antigenní prezentace cestou z endosomu do cytosolu
 1. Vytvoření endocytických váčků s antigenem 2. Sloučení váčků s brzkým endosomem 3. Štěpení antigenu proteasomem 4. Přenos rozloženého antigenu do ER 5. Spojení MHC I molekuly a antigenu 6. Vystavování komplexu MHC I/antigen na buněčném povrchu

2.5.5.2 Cesta z endosomu do cytosolu a následně zpátky do endosomu

Tato cesta má začátek totožný s předchozí cestou, nicméně v průběhu se začne velmi lišit. Na začátku je antigen také pohlcen dendritickou buňkou, kde se vytvoří váčky, které obsahují antigen. Poté se tyto váčky spojí s brzkým endosomem (BE). Antigen následně opouští brzkým endosom pomocí transportéru Sec 61 a posléze je štěpen proteasomem. Zde přichází změna oproti předcházející cestě. Antigen je transportován směrem k brzkému endosomu pomocí přenašeče TAP4. Endosom má k dispozici všechny proteiny nutné k peptidovému transportu skrz jeho membránu, takže peptidy pocházející z antigenu se navrátí zpět dovnitř brzkého endosomu. Důležité je zmínit, že brzký endosom také obsahuje všechny proteiny potřebné k příjmu MHC I molekuly, která přicestuje z endoplasmatického retikula v podobě váčky. Uvnitř brzkého endosomu se peptidy spojí s MHC I molekulou a poté jsou transportovány na buněčný povrch (Ackerman, 2011; Guernonprez, 2003; Houde, 2003; Zachová, 2016).

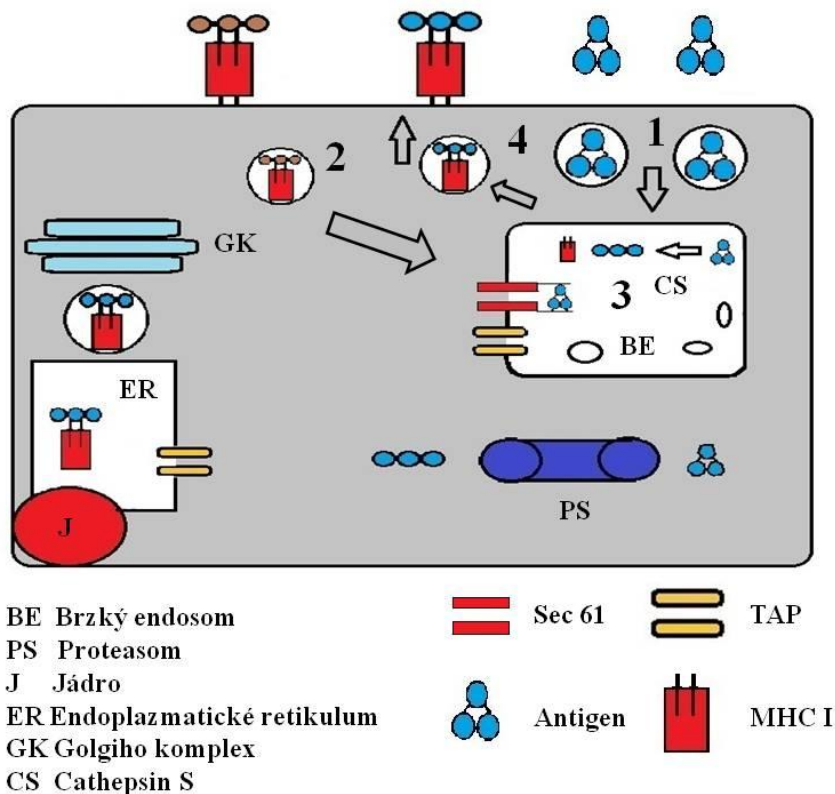


Obr. 5 Schéma zkřížené antigenní prezentace cestou z endosomu do cytosolu a zase zpátky do endosomu

1. Vytvoření endocytických váčků s antigenem 2. Sloučení váčků s brzkým endosomem 3. Štěpení antigenu proteasomem 4. Přenos rozloženého antigenu zpět do BE 5. Příchod váčku s MHC I molekulou do BE a následné spojení MHC I molekuly a antigenu 6. Vystavování komplexu MHC I/antigen na buněčném povrchu

2.5.5.3 Cesta zkřížené prezentace (Vakuolární cesta)

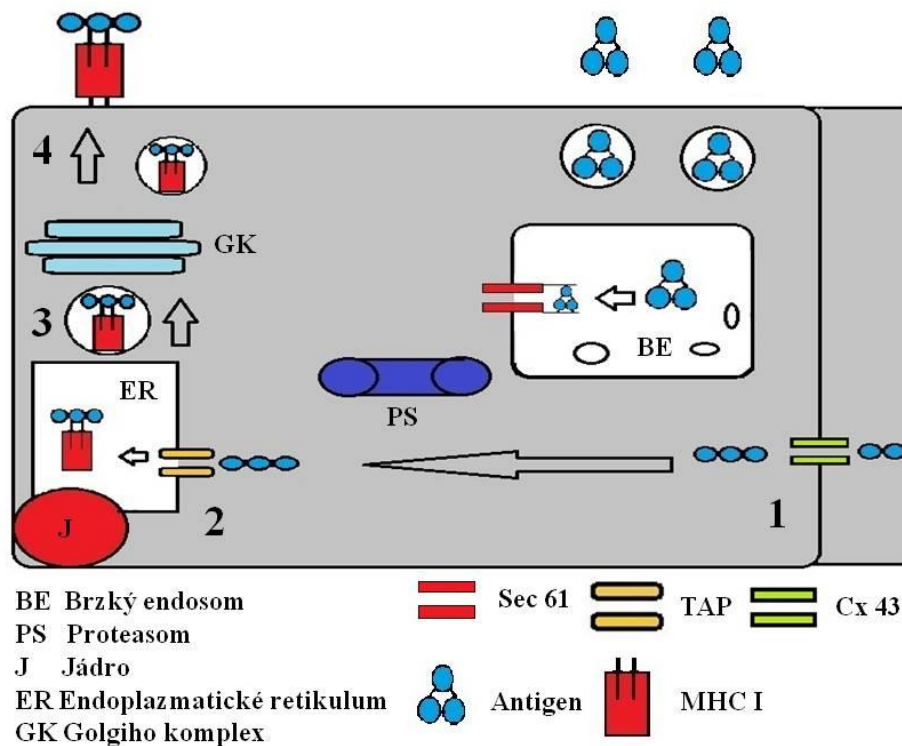
Cesta zkřížené prezentace vakuolární cestou je dost odlišná od předchozích cest, protože se nevyužívá proteasomu, TAP přenašečů ani endoplazmatického retikula. Na začátku je antigen pohlcen dendritickou buňkou a vytvoří se váčky obsahující antigen, které se následně spojí s brzkým endosomem. Následně se využívá recyklace molekuly MHC I, která přichází z buněčného povrchu do brzkého endosomu v podobě váčku. Proteasa Cathepsin S zastupující roli proteasomu štěpí antigen na krátké peptidy, které se následně spojí s MHC I molekulou. Takovýto komplex MHC I/peptid poté putuje na buněčný povrch (Campbell, 2000; Gromme, 1999; Shen, 2004; Pillay, 2002; Schirmbeck, 1995; Zachová, 2016).



Obr. 6 Schéma zkřížené antigenní prezentace vakuolární cestou
 1. Vytvoření endocytických váčků s antigenem 2. Sloučení váčků s brzkým endosomem 3. Štěpení antigenu v BE a jeho spojení s MHC I molekulou
 4. Vystavování komplexu MHC I/antigen na buněčném povrchu

2.5.5.4 Zkřížená antigenní prezentace pomocí mezibuněčné komunikace

Zjistilo se, že ke zkřížené prezentaci dochází také při mezibuněčné komunikaci, která umožňuje širokou výměnu molekul. Tato výměna je zprostředkována pomocí tunelů, jež jsou vysoce uspořádané struktury skládající se z konnexinu (např. molekula Cx43) formujícího hexamery nazývané konexony. Malá molekula peptidu pocházejícího z antigenu projde pomocí tohoto tunelu do cytosolu druhé APC. Následně se peptid pomocí TAP přenašeče dostane do endoplazmatického retikula, kde se spojí s MHC I molekulou. Potom jako komplex MHCI/peptid putuje z endoplazmatického retikula přes Golgiho aparát na buněčný povrch (Handel, 2007; Mendoza-Naranjo, 2007; Neijssen, 2005; Pang, 2009; Zachová, 2016).



Obr. 7 Schéma zkřížené antigenní prezentace pomocí mezibuněčné komunikace
 1. Vstup rozloženého antigenu do buňky pomocí mezibuněčného kanálu
 2. Proniknutí peptidů antigenu pomocí TAP do ER 3. Spojení MHC I molekuly s antigenem 4. Vystavení komplexu MHC I/antigen na buněčném povrchu

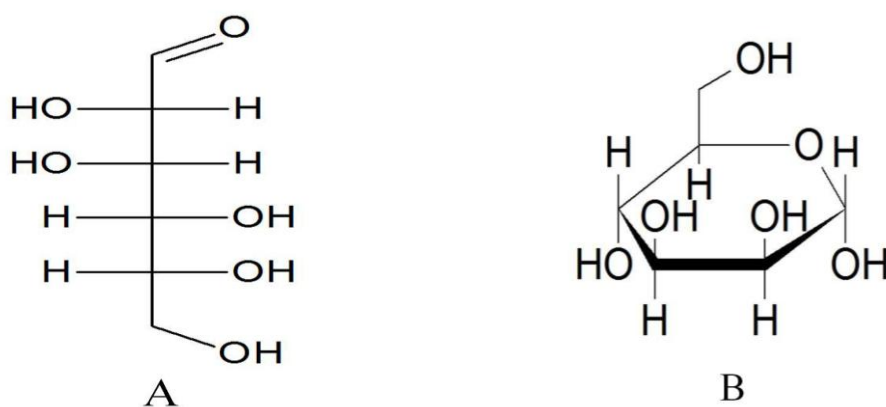
2.6 P24

Protein p24 se nachází v kapsidu viru HIV. Tento kapsid obaluje genom viru HIV a je složen z asi 1500 kopií kapsidového virového proteinu p24 (Teow, 2013). Protein p24 je vysoce konzervovaný virový protein a nejranějším imunologickým biomarkerem, který se detekuje při infekci virem HIV (Gaines, 1987). P24 hraje také klíčovou roli, jak v brzké, tak pozdní části replikace viru, a proto se stal předmětem studie (Mascarenhas, 2009).

2.7 MANAN

Manan je polysacharid nacházející se v celé přírodě. Tento polysacharid se skládá převážně z jednotek manosy. Tvoří nedílnou součást buněčných stěn rostlin, protože je součástí mnoha polysacharidů. Téměř čistý manan můžeme najít v palmovém ořechu, datlích či kávových zrnech (Reid, 1982). Podstatné je však zmínit, že manan obsahuje velké spektrum mikroorganismů. Této skutečnosti využívají buňky

imunitního systému, konkrétně dendritické buňky a makrofágy, které mají na svém povrchu manosový receptor. Tento receptor patří do proteinů s názvem lektiny, které se vyznačují schopností rozpoznávat a vázat na sebe cukry, a proto hraje důležitou roli při odstraňování patogenů, protože se váže na mikroorganismy, které obsahují manosu. Proto je tento receptor nesmírně důležitý pro fagocytózu buněk, a proto hraje nesmírnou roli při zlepšování zachycení, zpracování a prezentaci antigenu adaptativnímu imunitnímu systému dendritickými buňkami (Cutler, 1998).



Obr. 8 Chemická struktura A: D-Manosa (Fisherova projekce) a B: α -D-Manopyranosa

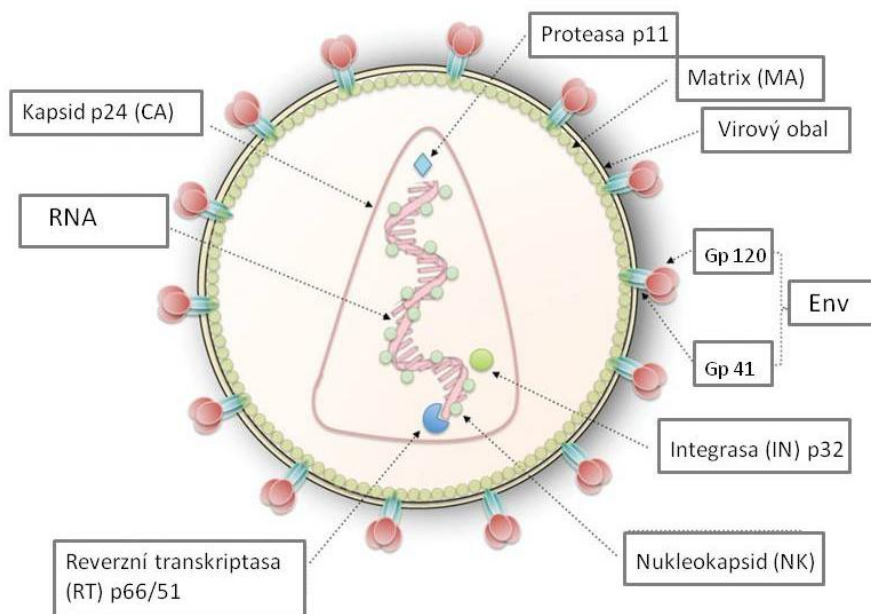
2.8 Virus HIV

HIV virus (Human immunodeficiency virus) je virus patřící do skupiny retrovirů. Tento retrovirus disponuje enzymem reverzní transkriptázou, která mu umožňuje přepis RNA do DNA (LOW, 2014). HIV napadá buňky imunitního systému především CD4+ T lymfocyty, což vede k poklesu těchto buněk a následnému rozvoji nemoci AIDS. Velký pokles CD4+ T buněk v trávicím traktu je typický pro ranní fázi infekce (Brenchley, 2004). Počet T buněk se už neobnoví do původního stavu a progresivní pokles lze pozorovat několik let, dokud hladina T buněk klesne pod $200 \mu\text{L}^{-1}$ (Lang, 1989). V této fázi nastává obrácený poměr mezi buňkami CD8+ a CD4+ v krvi. Nastává závažná imunodeficiencie doprovázená častými oportunními infekcemi.

Tyto oportunní infekce se poté často zaměňují s malárií či tuberkulózou, a proto následně vznikají rezistence vůči lékům na tyto patogeny (Flateau, 2011). V současnosti zatím neexistuje vakcína, která by byla účinná proti HIV. Hlavními prostředky, jak snižovat dopady nákazy je v dnešní době pouze prevence a antivirová léčba zpomalující průběh nemoci (Palella, 1998).

2.8.1 Struktura viru HIV

HIV virus se řadí mezi skupinu s názvem retroviry. HIV je schopný infikovat mitoticky aktivní nedělicí se buňky. Každý virion je v průměru asi $0,1 \mu\text{m}$ velký. Obal virové částice je převzat z membrány hostitelské buňky. Ve virovém obalu jsou vloženy hostitelské proteiny a vystupující „hroty“ HIV proteinu nazývané Env. Každý hrot, který je uchycen k virionu pomocí třech stonků transmembránového glykoproteinu gp41, obsahuje 3 molekuly glykoproteinu gp 120 na extracelulární straně. Matrix se nachází mezi virovým obalem a kapsidem virionu. Virové jádro je tvarově podobné kuželu a je vyrobeno z kapsidového proteinu p24 (CA). Uvnitř jádra jsou 2 identické jednovláknové RNA a enzymy (reverzní transkriptasa, p66/51, proteasa p11, integrasa p32) důležité pro replikaci viru. Každé vlákno kóduje 3 strukturální geny (gag, pol, env) důležité při formování strukturálních proteinů a 6 regulačních genů (tat, rev, nef, vif, vpr and vpu) důležité při regulaci replikace HIV (Freed, 2001).



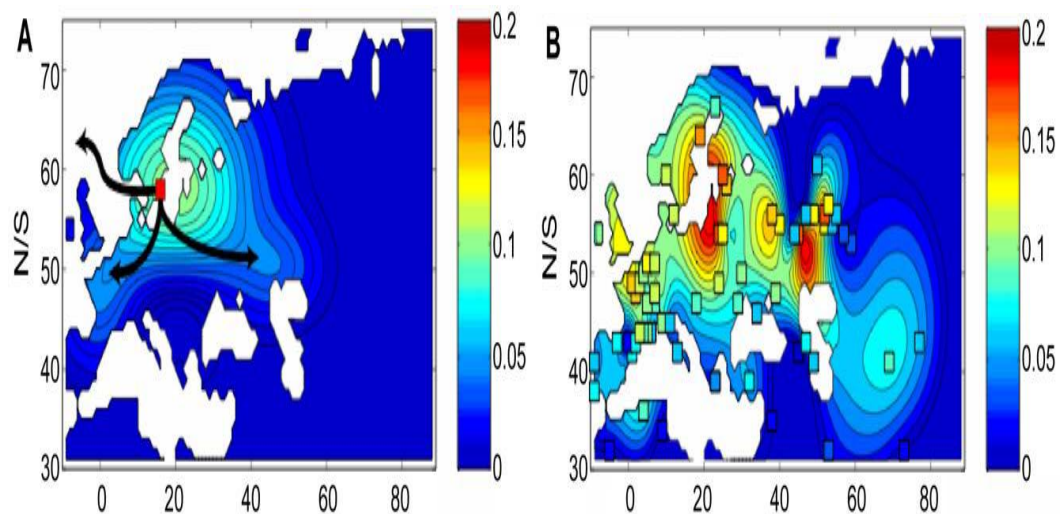
Obr. 9 Schématické znázornění struktury částice viru HIV-1. Převzato a upraveno dle Freed, 2001, LOW, 2014.

2.8.2 Přírozená imunita vůči některým kmenům viru HIV

Odhaduje se, že 0,8 % lidské populace je nakaženo virem HIV a v roce 2015 bylo nahlášeno více jak 1 milion obětí této nákazy. Při vývoji efektivních anti-retrovirových léků proti této nemoci byly zaznamenány pouze dva případy vyléčených pacientů. V roce 2007 HIV pozitivní pacient, který také trpěl leukemií, dostal od dárce, jenž byl homozygot s mutací v genu CCR5, kostní dřeň a díky této kostní dřeni se následně pacient vyléčil z leukémie, nicméně se také začaly ztrácet příznaky nemoci AIDS (Haworth, 2017). V roce 2009 se tento pacient známý jako „Berlínský pacient“ stal prvním pacientem, který už v sobě neměl žádné stopy viru HIV (Hütter, 2009; Allers, 2011). Druhý případ s názvem „Londýnský pacient“ také dostal kostní dřeň od dárce s touto mutací a v roce 2019 byla prohlášena remise u tohoto pacienta (Gupta, 2020). Tato mutace je známá jako CCR5 a inhibuje šíření viru HIV už v začátku infekce (Haworth, 2017). Jedinci, kteří jsou homozygoti mající 2 kopie CCR5 Δ 32 genu (delta 32 mutace (Δ 32) neexprimují povrchový CCR5 ko-receptor. Jsou tak imunní vůči některým kmenům viru HIV, které tento ko-receptor využívají pro vstup do buněk. U jedinců, kteří jsou heterozygoti a mají pouze jednu alelu pro tuto mutaci, je pozorována snížená náchylnost k infekci a také je opožděný nástup nemoci AIDS (Liu, 1996; Novembre, 2005).

2.8.3 Původ a rozšíření mutace genu pro chemokinový receptor CCR5

Mutace delta 32, která se týká ko-receptoru CCR5, představuje názorný příklad pro studování přirozeného výběru působícího na člověka (Novembre, 2005). V dnešní době se oblasti s nejvyšším výskytem této mutace nacházejí v severovýchodní Evropě, zejména pak pobaltská oblast. Tohoto zjištění se docílilo sběrem vzorků v zemích této oblasti (Švédsko, Finsko, Bělorusko, Estonsko a Litva). Nesmí se však zapomenout, že existují také další oblasti s vysokým výskytem této mutace. Těmito oblastmi je část Francie (severní pobřeží) nebo také západní části Ruska, konkrétně oblast Moskvy, Rjazaňu a Volho-Uralský region Ruska (Lucotte, 2003; Novembre, 2005). Existuje mnoho teorií, jak se D32 mutace dostala do dalších části Evropy. Jednou z nich je, že tato mutace byla distribuována pomocí Vikingů, kteří byli výborní mořeplavci, a díky toho se tato mutace dostala na Island, do Ruska a také do střední a jižní Evropy (Lucotte, 1998; Lucotte, 2003; Galvani, 2005).



Obr. 10 Schématické znázornění rozšíření mutace D32

- Schématické znázornění Lucotteho teorie o šíření mutace D32 Vikingy. Červený čtverec reprezentuje Skandinávský původ alely. Černé šipky představují šíření alely společností Vikingů směrem k severozápadu na Island, na jih směrem k Francii a na východ k Rusku.
- V dnešní době pozorovaná frekvence alely. Čtverce označují místo odběrů vzorků. Barva čtverců označuje frekvenci výskytu. Obrysové čáry představují interpolovanou frekvenci alel. Převzato a upraveno dle Galvani, 2005

2.9 Liposomy

Liposomy jsou synteticky vyrobené částice, které slouží jako nosiče bioaktivních molekul a léčiv do organismu. Jejich hlavní výhodou je biokompatibilita a nízká toxicita vůči organismu. Nevýhodou je špatná kontrola nad uvolňováním daného léčiva v organismu. Liposomy jsou obvykle kulovitěho tvaru. Jejich povrch se skládá z lipidové dvojvrstvy, na které se vyskytují specifické ligandy, značky či lipidové řetězce. Tyto specifické ligandy nebo lipidové řetězce hrají důležitou roli určující vlastnosti liposomů. Ovlivňují také zprostředkování vazby na receptory buněk. Úprava těchto ligandů může být využita při tvorbě vakcín, kde liposomy slouží jako nosič očkovací látky a díky úpravě ligandu může být očkovací vakcína přenesena přímo do cílených buněk imunitního systému (antigen prezentujících buněk), kde imunitní systém následně začne vytvářet specifickou imunitní odpověď (Mašek, 2011; Torchilin, 2003; De Serrano, 2017).

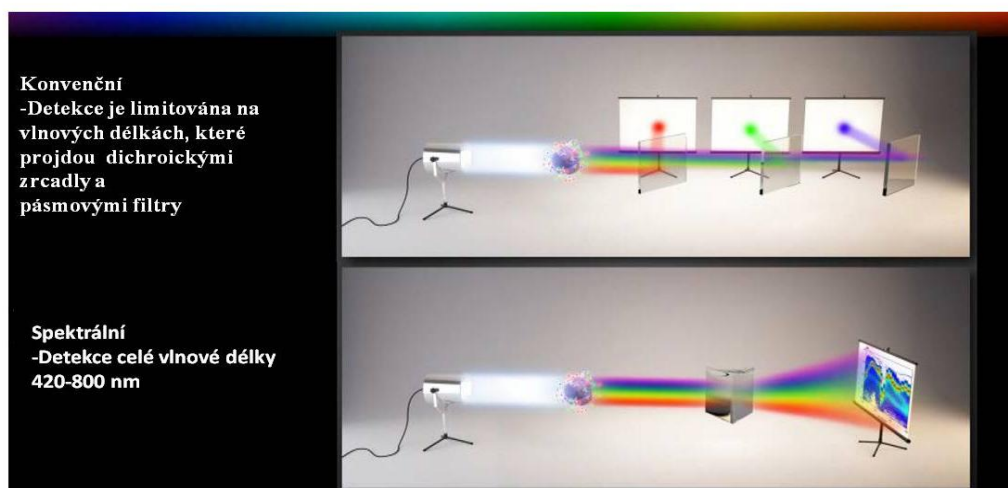
2.10 Metalochelatační liposomy

Jednou z možných variant modifikace liposomů mohou být tzv. metalochelatační liposomy obsahující lipofilní deriváty muramyl dipeptidu. Takto upravené liposomy představují nové biokompatibilní platformy pro strukturu experimentálních rekombinantních vakcín. V metalochelatačních liposomech se využívá lipofilní derivát muramyl dipeptidu (MDP), známý jako C-18-06-norAbuMDP (MT03), záměrně, protože tuto molekulu obsahují gram pozitivní a také gram negativní bakterie. Vystavení této molekuly na povrchu liposomu aktivuje buňky imunitního systému, konkrétně antigen prezentující buňky, což znamená hlavně dendritické buňky, které tento liposom pomocí fagocytózy pohltí, zpracují a následně předkládají na svém povrchu fragmenty antigenu v komplexu s MHC proteiny. Takto vystavené proteiny následně zaktivují T lymfocyty. V případě rekombinantních vakcín se jedná hlavně o rekombinantní proteiny. V jedné ze studií se využívá rekombinantní protein s názvem heat shock protein 90 (rHsp 90). Tento rekombinantní protein dokáže na sebe vázat proteiny a peptidy, které jsou následně zodpovědné za antigenně specifickou imunitní reakci (Mašek, 2011; Altin, 2006; Chami, 2011).

2.11 Spektrální průtoková cytometrie

V poslední době díky zlepšení optiky, datových systémů a detektorů se vyvinula nová metoda s názvem spektrální průtoková cytometrie, která může buňky a další části měřit ve velkém rozlišení rychle a citlivě. Přístrojový rozdíl mezi konvenční průtokovou cytometrií a spektrální průtokovou cytometrií spočívá v nahrazení klasických zrcadel, optických filtrů ve spektrografy a vícekanálové detektory. Hlavním principální rozdílem mezi konvenční průtokovou cytometrií a spektrální průtokovou cytometrií z pohledu sbíraného fotonu je disperze. Konvenční průtoková cytometrie foton přenáší, blokuje nebo odráží na základě vlnové délky, zatímco spektrální průtoková cytometrie foton rozptyluje podle vlnové délky. Díky této skutečnosti spektrální průtoková cytometrie může měřit fluorescenci v celé vlnové délce 420-800 nm. Následně vhodně nastavený software danou fluorescencí vykreslí v grafu. Nespornou výhodou této metody je, že nedetekuje falešné pozitivní buňky, a proto má analýza větší přesnost a nepotřebuje výpočetní kompenzaci. (Nolan, 2013; Lerner, 2006; Lerner, 2010; Sanders, 2013).

Rozdíl mezi konvenční a spektrální cytometrií



www.sonybiotechnology.com

Obr. 11 Porovnání konvenční a spektrální průtokové cytometrie Převzato a upraveno dle www.scientistlive.com/content/spectral-analyser-technology

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Použité chemikálie

Fosfátový pufr (PBS) 10x (Sigma- Aldrich, USA)

β -merkaptoethanol (Sigma- Aldrich, USA)

Trypsin-EDTA 0,25% (Gibco , UK)

Fetal bovine serum (Gibco, UK)

Paraformaldehyd (EMS, USA)

Trypanová modř (Pe-lab, Česká Republika)

Protilátka – CD80- PE-cy5 (eBioscience, USA)

Protilátka – MHC I- eF450 (eBioscience, USA)

Protilátka – MHC II- PE- eFluor610 (eBioscience, USA)

Protilátka – CD40- PE (eBioscience, USA)

Protilátka – CD11c – eFluor506 (eBioscience, USA)

Protilátka – CD86 - PE-cy7 (eBioscience, USA)

Montovací médium s DAPI (Vector, USA)

Triton X100 (Sigma-Aldrich, USA)

Mouse Anti V5 epitop (Invitrogen, USA)

Anti mouse IgG – Texas Red (Invitrogen, USA)

cDC1- Buněčná linie (Lausanne, Švýcarsko)

DAPI (Vector, USA)

UltraComp eBeads™ Compensation (Thermo Fisher Scientific, USA)

3.1.2 Použité roztoky

Roztok kompletního IMDM média- IMDM médium, 8% FBS,

Roztok pro fixaci buněk- 4 % PFA v PBS

Roztok β -merkaptoethanolu- 50 mmol·l⁻¹

Roztok na rozrušení vazeb 0,1% Triton X100 v PBS

Blokační roztok 1% FBS, 0,1% Triton X100 v PBS

Roztok premixu 750 μ g PBS s 5% FBS a 75 μ l protilátek (MHC I, MHC II, CD80, CD86, CD11c, CD40)

3.1.3 Přístroje a pomůcky

Zkumavky- plastové (Eppendorf, Německo)

Mikrozkumavky- plastové (Eppendorf, Německo)

Pipety Finnpipette (Thermo Fisher Scientific, USA)

Pipetor (Hirschmann, Německo)

Vortex IKA (Sigma-Aldrich, USA)

Kultivační materiál pro tkáňové linie (VWR International, USA)

Multichamber slide (Thermo Fisher Scientific, USA)

CO2 inkubátor (Panasonic, Japonsko)

Laminární box – Aura VF48 (BioAir, USA)

Mikroskop na počítání buněk (Leica, Německo)

Centrifugy (Hettich, Německo)

3.2 Použité metody

3.2.1 Příprava a kultivace adherentních buněk

Buňky byly dodány ze Švýcarska a následně byly kultivovány na kompletním IMDM médiu. Celkový obsah roztoku média byl 500 ml. Následně bylo médiu odsáto a promyto fosfátovým pufrem. Poté byl přidán 1 ml 0,25% trypsinu a buňky byly vloženy na 2 minuty do inkubátoru. Díky trypsinu byly buňky odlepeny. Po 2 minutách opět bylo přidáno kompletní IMDM médium. Ve zkumavkách typu falkon byly buňky centrifugovány (při 250 g a laboratorní teplotě) 5 minut. Ke stočeným buňkám bylo přidáno 5 ml kondiciovaného média. Následně v 1 ml čerstvého IMDM

média byla rozsuspendována peleta, která vznikla centrifugací. Takto vzniklá peleta byla 10x ředěna pomocí PBS kvůli vysokému počtu buněk.

3.2.2 Počítání buněk

K počítání buněk bylo použito 18 μl PBS a 2 μl buněčné suspenze. K takto připravenému roztoku v mikrozkuhavce bylo přidáno 20 μl trypanové modře. Pro počítání buněk byla použita světelná mikroskopie a Bürkerova komůrka. Bürkerova komůrka je tvořena 9 velkými čtverci (každý čtverec má obsah 1 mm^2). Každý čtverec je rozdělen do dalších 16 menších čtverců (každý menší čtverec má obsah 0,04 mm^2). Do Bürkerovy komůrky bylo použito 20 μl roztoku, který byl vložen mezi krycí a podložní sklo. Takto připravená komůrka byla vložena do zorného pole světelného mikroskopu. Po následném zaostření bylo přistoupeno k počítání buněk. Při počítání buněk byly započteny pouze buňky, které byly uvnitř čtverce a také buňky, které se z vnější či vnitřní strany dotýkaly dvou stanovených stran (např. dolní a levá).

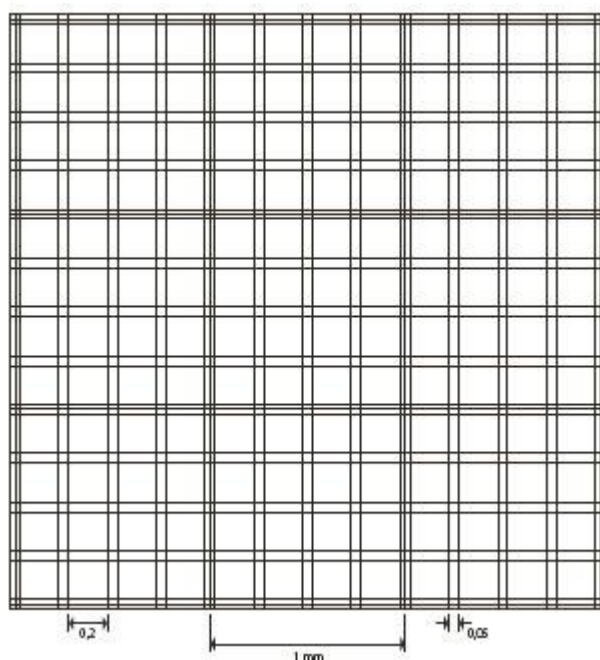
Pro stanovení koncentrace buněk v 1 ml suspenze byl použit výpočet:

$$K = \frac{a \times 10^4}{n}$$

K- Koncentrace buněk v 1 ml suspenze

a- Stanovený počet buněk

n- Počet spočítaných čtverců



Obr. 12 Bürkerova komůrka na počítání buněk. Převzato a upraveno dle <https://www.thermofisher.cz/produkty/pocitaci-komurka-dle-burkera-bez-svorek>

3.2.3 Pulzace buněk antigeny pro konfokální mikroskopii

Pro konfokální mikroskopii byl použit 8 jamkový panel. Do každé jamky bylo pipetováno 1×10^4 buněk v objemu 300 μ l kompletního média. Takto byly buňky ponechány do dalšího dne. Druhý den do každé jamky bylo přidáno 6 μ g antigenního konstruktů. V každé komůrce byly buňky pulzovány jednotlivými antigenními konstrukty. Tyto konstrukty byly p24, p24 navázaný na liposomu a p24 navázaným na liposomu společně s mananem. Jednotlivé antigenní konstrukty byly dodány Výzkumným ústavem veterinárního lékařství v Brně. Takto byly buňky inkubovány 90 minut při 37 °C a 5% CO₂.

Tab. 1 Schéma 8 jamkového panelu při pulzaci dendritických buněk jednotlivými antigenními konstrukty pro konfokální mikroskopii

Mutu DC	
P24	
P24L	
P24LM	

3.2.4 Pulzace buněk antigeny pro spektrální průtokovou cytometrii

Pro spektrální průtokovou cytometrii byl použit 24 jamkový panel. Jednotlivé buňky byly pulzovány v tripletech viz.Tab. 2. Do každé jamky bylo pipetováno 1×10^4 buněk v 500 μ l kompletního média Do každé z trojice jamek bylo přidáno 12,5 μ g antigenního konstruktu. V každém tripletu jamek byly buňky pulzovány jiným antigenním konstruktem Antigenní konstrukty byly p24, p24 navázaným na liposomu a p24 navázaným na liposomu společně s mananem. Jedna trojice jamek nebyla pulzována ničím jako negativní kontrola. Takto byly buňky inkubovány 24 hodin při 37 °C a 5% CO₂.

Tab. 2 Schéma 24 jamkového panelu při pulzování dendritických buněk jednotlivými antigenními konstrukty pro spektrální průtokovou cytometrii

Mutu DC	P24	P24L	P24LM	NK		
	P24	P24L	P24LM	NK		
	P24	P24L	P24LM	NK		

3.2.5 Postup barvení a příprava komůrek na konfokální mikroskopii

Po inkubaci bylo odsáto médium a jamky byly promyty pomocí PBS. Do každé jamky bylo přidáno 100 μ l fixačního roztoku a takto buňky byly inkubovány 10 minut při laboratorní teplotě. Následně byly buňky 2x promyty v PBS. Po odsání PBS byl přidán permeabilizační roztok. Délka inkubace buněk byla 10 minut při laboratorní teplotě. Poté byl roztok odsát a jamky byly promyty pomocí PBS. Následně byl k buňkám přidán blokační roztok na 30 minut. Po 30 minutách byl roztok odsán a jamka byla promyta pomocí PBS. Poté byla k buňkám na 60 minut přidána protilátka mouse anti -V5 v poměru 1:100. Následně byly buňky promyty 3x pomocí PBS a byla přidána na 30 minut sekundární protilátka anti-mouse IgG konjugovaná s Texas red v poměru 1:1000. Vždy po přidání protilátky inkubace probíhala ve tmě a při laboratorní teplotě. Po inkubaci byly jamky 3x promyty pomocí PBS. Stěny kultivační jamky byly odstraněny a vzniklo mikroskopické sklo. Ke každé jamce bylo přidáno montovací médium s DAPI. Následně bylo přiloženo sklíčko a okraje byly zalepeny lakem na nehty a buňky byly ponechány ve tmě.

3.2.6 Postup barvení na cytometrii

Druhý den po inkubaci bylo nejprve odsáno médium. Následně byl k buňkám přidán trypsin a buňky byly rozsuspendovány v 750 μ l PBS. Poté byly buňky přeneseny do mikroskopické zkumavky. Následovala centrifugace 5 minut při 250 g a laboratorní teplotě. Po centrifugaci byl odsán PBS a k buňkám byl přidán roztok premixu protilátek. Takto byly buňky inkubovány 30 minut ve tmě. Po inkubaci byly buňky promyty pomocí PBS a opět centrifugovány 5 minut při 250 g a laboratorní teplotě. Následovalo odsání a přidání 300 μ l PBS. Takto připraveny buňky byly přeneseny do cytometrických zkumavek, kde byly následně analyzovány na cytometru.

3.2.7 Vytvoření knihovny s fluorochromy

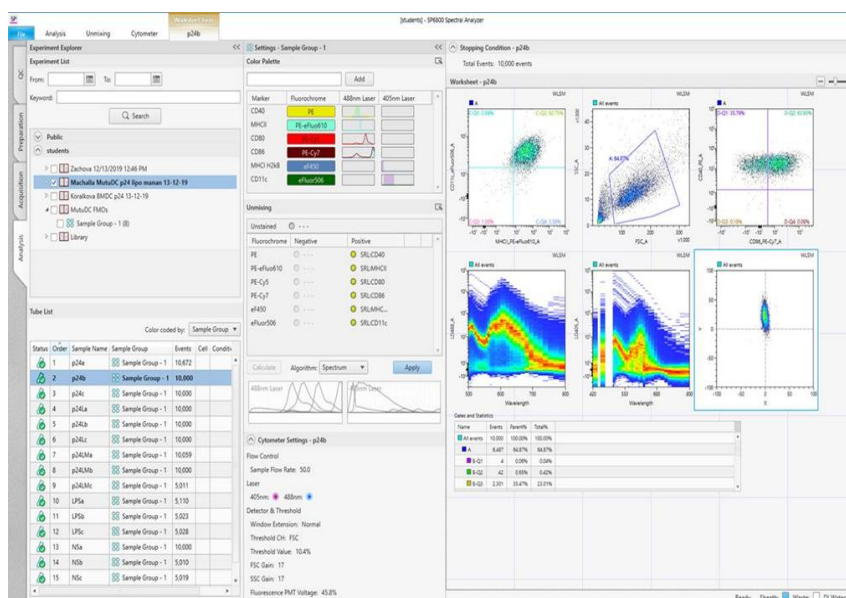
3.2.7.1 Nastavení knihovny pomocí kuliček

Pro stanovení fluorescence jednotlivých fluorochromů byla vytvořena knihovna. Ke konkrétnímu stanovení byly použity UltraComp eBeads™ Compensation (Beads), kde byly dvě populace. Jedna populace specificky vážala protilátku a druhá nevážala

žádnou protilátku. Tato druhá populace sloužila ke znázornění negativní kontroly. Celkem bylo v knihovně nastaveno 6 fluorochromů. Jednotlivé křivky fluorochromů byly nastavovány pomocí kuliček. Do každé fluorochromem označené zkumavky byla přidána jedna kapka UltraComp eBeads. Následně byly do každé označené zkumavky přidány určené protilátky (anti-CD40 PE, anti-CD80, anti-MHC I, anti-MHC II, anti-CD11c, anti-CD86). Každá zkumavka byla následně zvortexována a inkubována 15-20 minut při teplotě 2-8 °C (v lednici). Poté byl přidán 1 ml PBS a každá zkumavka byla centrifugována 5 minut při 500 g a laboratorní teplotě. Následovalo odsání supernatantu a přidání 0,4 ml PBS do každé zkumavky. Pro stanovení knihovny byla intenzita fluorescence daného fluorochromu stanovována pomocí změn v napětí na laserech (PMT) v intervalu 1×10^4 až 1×10^5 . Počet událostí byl nastavený na 5000. Pomocí těchto hodnot byla následně vytvořena knihovna.

3.2.8 Nastavení experimentu

Jednotlivé vzorky byly proměřovány v tripletech. Pro změření množství exprese buněčného markeru byla použita knihovna naměřených fluorochromů. V knihovně bylo nastaveno pro vyhodnocení experimentu 6 fluorochromů. Saturační poměr byl vždy menší jak 1 %. Pro všechny vzorky byla vždy nastavená jedna společná voltage a také jedna společná intenzita laseru (PMT).



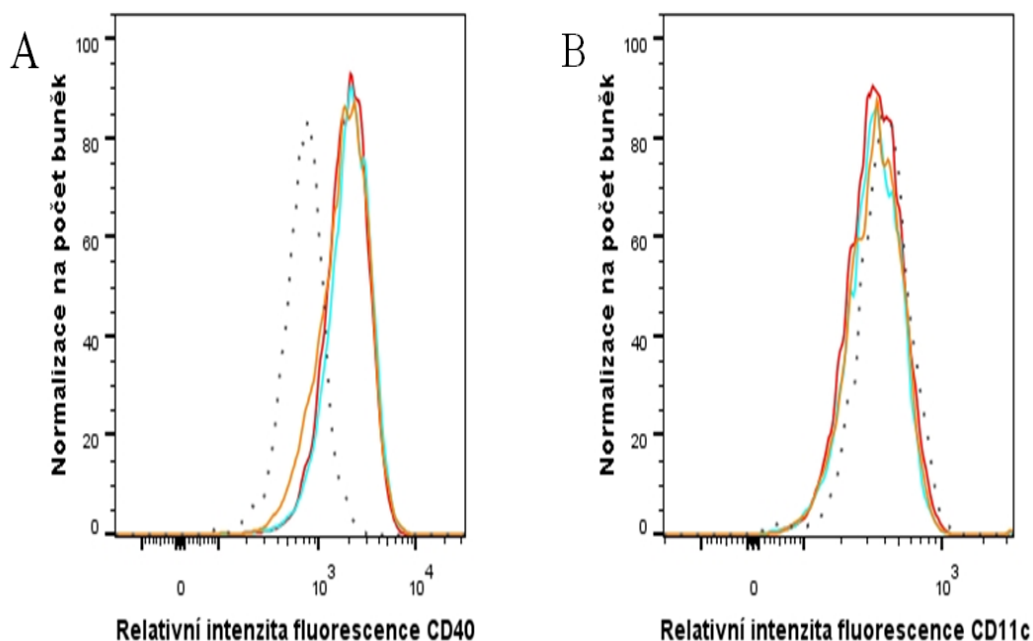
Obr. 13 Ilustrační foto nastavení parametrů pro měření

4 VÝSLEDKY

4.1 Stanovení exprese buněčných markerů

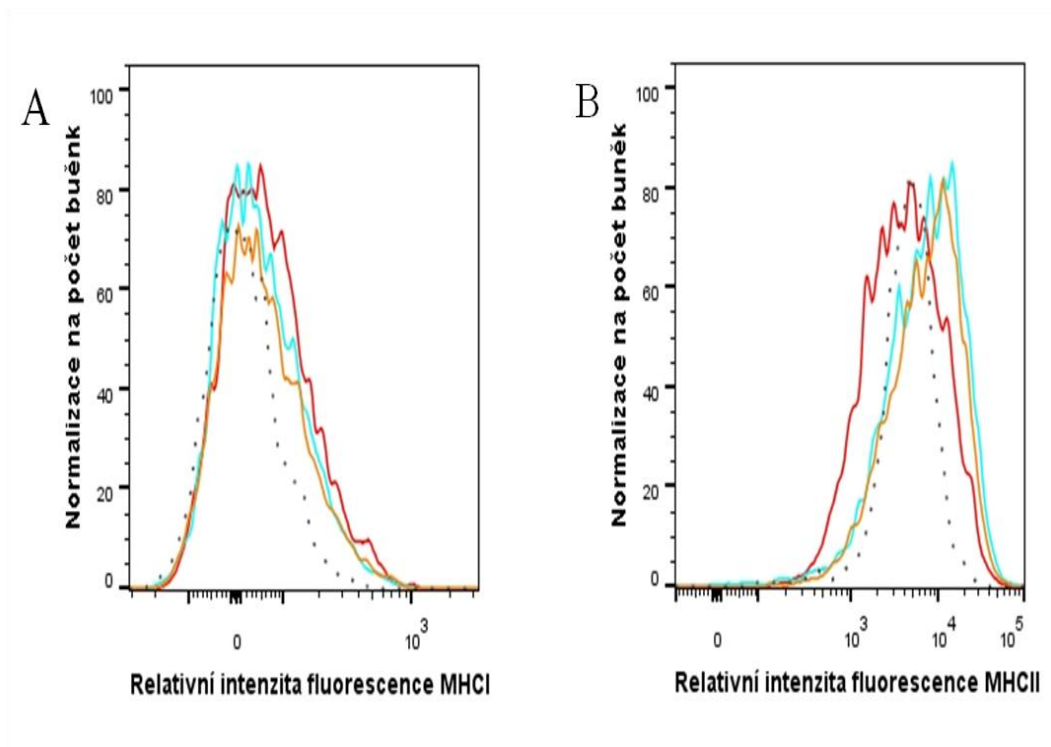
Pomocí průtokové cytometrie bylo provedeno stanovení buněčné exprese markerů u dendritických buněk. Konkrétně byly měřeny markery CD40, CD86, MHC I, MHC II, CD11c a CD80. Byly použity dendritické buňky, které byly pulzované různými antigenními konstrukty. Mezi tyto antigenní konstrukty patřil kapsidový protein viru HIV s označením p24, dále byly buňky pulzovány p24 proteinem, který byl navázaný na liposomu a třetí pulzující antigenní konstrukt tvořil p24 navázaný na liposomu společně s mananem. Výsledky, které se následně získaly, byly vyhodnoceny v programech FlowJo a GraphPad. Jednotlivé markery, které byly buňkou exprimovány, byly následně vyhodnoceny v jednotlivých grafech. Y osa grafu symbolizuje normalizaci počtu buněk, které fluoreskovaly. X osa znázorňuje relativní intenzitu fluorescence. Vrchol každé křivky je nejvyšší počet událostí (fluoreskujících buněk) při jedné konkrétní intenzitě. V každém grafu pro každý marker jsou celkem čtyři křivky. Každá křivka symbolizuje jednu určitou skupinu dendritických buněk. Tři křivky, které jsou od sebe odlišeny barevně, určují dendritické buňky, které byly pulzovány určenými antigenními konstrukty a jedna křivka jsou buňky, které nebyly pulzovány žádnou látkou. Tato křivka sloužila jako porovnání a je tvořena přerušovanou křivkou se šedou barvou.

U buněk, které byly pulzovány, došlo k zjevnému nárůstu exprese většiny markerů. U všech pulzovaných skupin buněk však nedošlo k zvýšení exprese markeru CD11c. Naopak došlo k jeho snížení. Zatímco v případě markeru CD40 došlo k jasnému zvýšení exprese u pulzovaných skupin buněk, nicméně exprese CD40 nebyla ovlivněna liposomem ani mananem. Expresse markeru CD40 je srovnatelně stejná ve všech třech případech pulzovaných skupin.



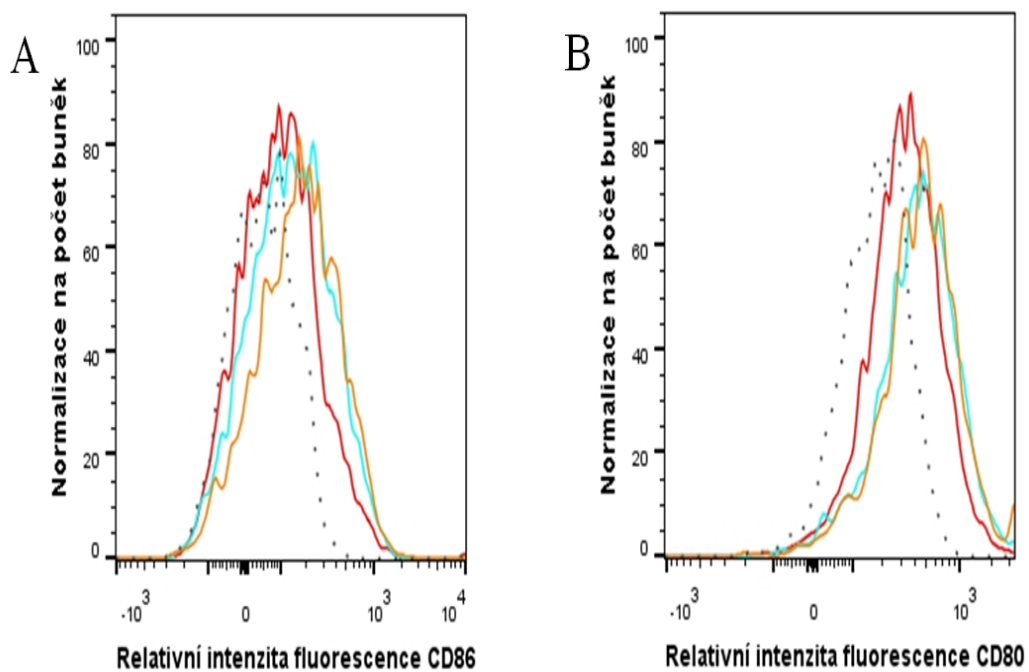
Obr. 14 Porovnání v grafickém znázornění exprese dvou buněčných markerů, konkrétně A CD40 a B CD11c. Červenou barvou je zobrazena exprese buněk, které byly pulzované pouze p24, modrou barvou byly označeny buňky pulzované p24 navázaným na liposomu, oranžovou byly označeny buňky, které byly pulzovány p24 navázaným na liposomu společně s mananem

Při měření exprese MHC I markeru bylo zjištěno, že všechny skupiny buněk, které byly pulzovány, zvýšily expresi tohoto markeru. V případě tohoto markeru však liposom ani mannan nepomohl zvýšit expresi. Expresi MHC II markeru liposomem, nicméně ovlivněna byla a to velice výrazně. Buňky, které byly pulzovány p24 navázaným na liposomu, měly o dost vyšší expresi tohoto markeru než buňky, které byly pulzovány čistě p24. Dokonce buňky, které byly pulzovány čistě p24 měly nižší expresi tohoto markeru než buňky, které nebyly pulzovány žádným antigenním konstruktem.



Obr. 15 Porovnání v grafickém znázornění exprese dvou buněčných markerů, konkrétně A MHC I a B MHC II. Červenou barvou je zobrazena exprese buněk, které byly pulzované pouze p24, modrou barvou byly označeny buňky pulzované p24 navázaným na liposomu, oranžovou byly označeny buňky, které byly pulzovány p24 navázaným na liposomu společně s mananem

Pouze u markerů CD86 a CD80 byl zjištěn nárůst exprese u pulzovaných buněk oproti buňkám, ke kterým se nepřidal žádný antigenní konstrukt, podle předpokladu, že liposom a manan pomůžou zvýšit stimulaci dendritických buněk. U obou markerů byla exprese nejvíce zvýšena p24 navázaným na liposomu společně s mananem a zároveň byl nejmenší nárůst zaznamenán u buněk, které byly pulzovány čistě p24 proteinem. U markeru CD86 byl zjištěný rozdíl exprese mezi nepulzovanými a pulzovanými buňkami celkově nejvyšší ze všech markerů.

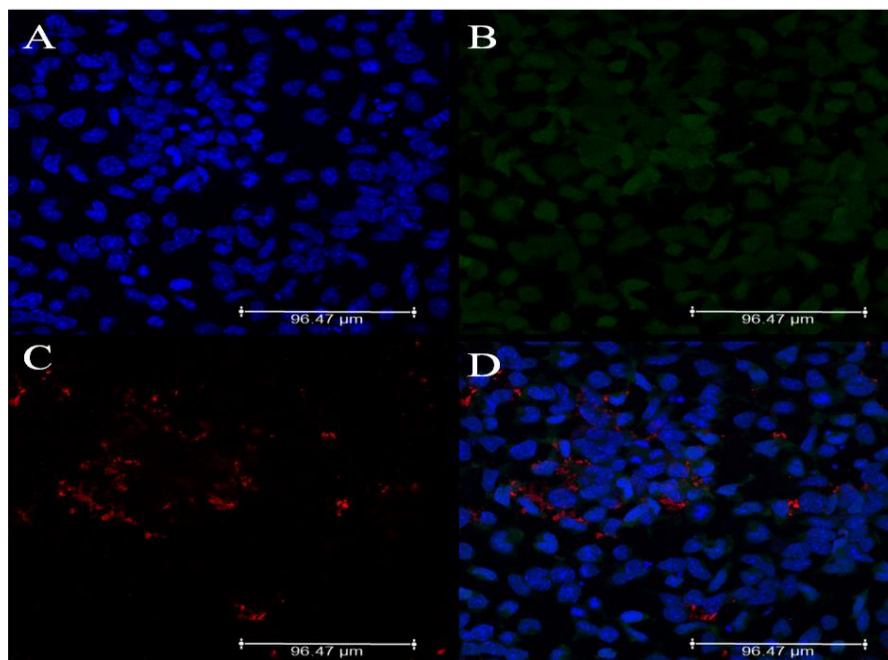


Obr. 16 Porovnání v grafickém znázornění exprese dvou buněčných markerů, konkrétně A CD86 a B CD80. Červenou barvou je zobrazena exprese buněk, které byly pulzované pouze p24, modrou barvou byly označeny buňky pulzované p24 navázaným na liposomu, oranžovou byly označeny buňky, které byly pulzovány p24 navázaným na liposomu společně s mananem

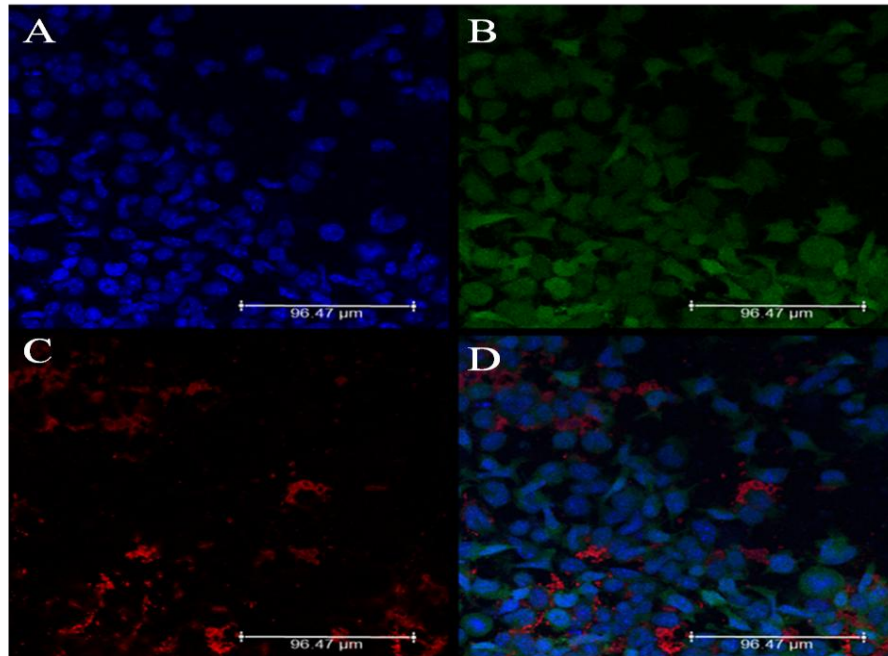
4.2 Pozorování buněk pomocí konfokální mikroskopie

Jednotlivé pulzující skupiny buněk byly pozorovány pomocí konfokální mikroskopie. V případě této metody byly buňky pozorovány po 1,5 hodině a tato metoda sloužila pouze jako důkazová metoda. Díky této metodě bylo prokázáno, že se opravdu jednalo o dendritické buňky, které byly pulzovány jednotlivými pulzujícími složkami. Byly pořízeny pouze 2 fotografie. Na první fotografii (obr. 17) jsou zobrazeny buňky, které byly pulzovány p24 proteinem navázaným na liposomu. Na druhé fotografii jsou zobrazeny buňky, jež byly pulzovány p24 proteinem navázaným na liposomu společně s mananem. Fotografie, kde by byly zobrazeny buňky pulzovány pouze p24, se nepodařilo pořídit. Fluorescence tohoto vzorku byla příliš nízká na to, aby mohl být pořízen využitelný snímek. Fotografie každé skupiny buněk je rozdělena na čtyři pole. V každém poli jsou pořízeny jiné části buňky až na jedno pole, kde jsou vyobrazeny všechny části v jednom snímku.

V první části označenou písmenem A jsou vyfoceny buněčná jádra jednotlivých buněk, která byla nabarvena pomocí barviva DAPI. V části s označením B jsou vyfoceny buňky jako samotné, a to díky GFP (Green fluorescence protein), který buňky exprimují. V případě C jsou vyobrazeny části buňky s názvem pozdní endosom, který hraje důležitou roli při zpracování určitého antigenu. Tento pozdní endosom byl nabarven pomocí barviva Texas red, které bylo navázáno na sekundární protilátce anti mouse IgG. V poslední části, která nese označení D, jsou vyobrazeny všechny části najednou.



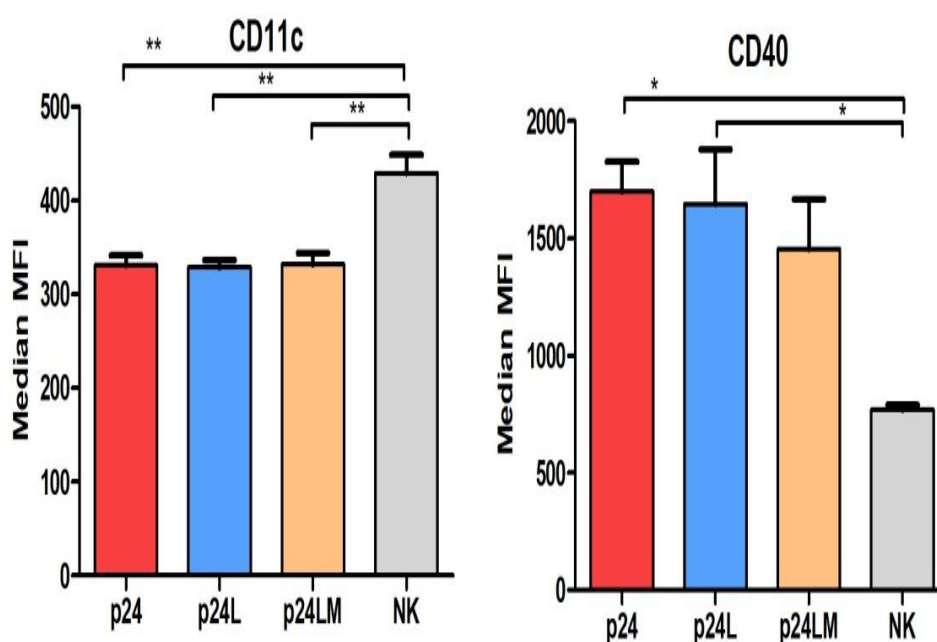
Obr. 17 Fotografie dendritických buněk pulzovaných pomocí p24 navázaným na liposomu. A) buněčná jádra (modrá) dendritických buněk obarvena pomocí DAPI. B) Dendritické buňky (zelené) díky GFP. C) Pozdní endosom (červený) dendritických buněk nabarvený pomocí Texas red. D) Zobrazení všech sledujících konstruktů v jednom snímku.



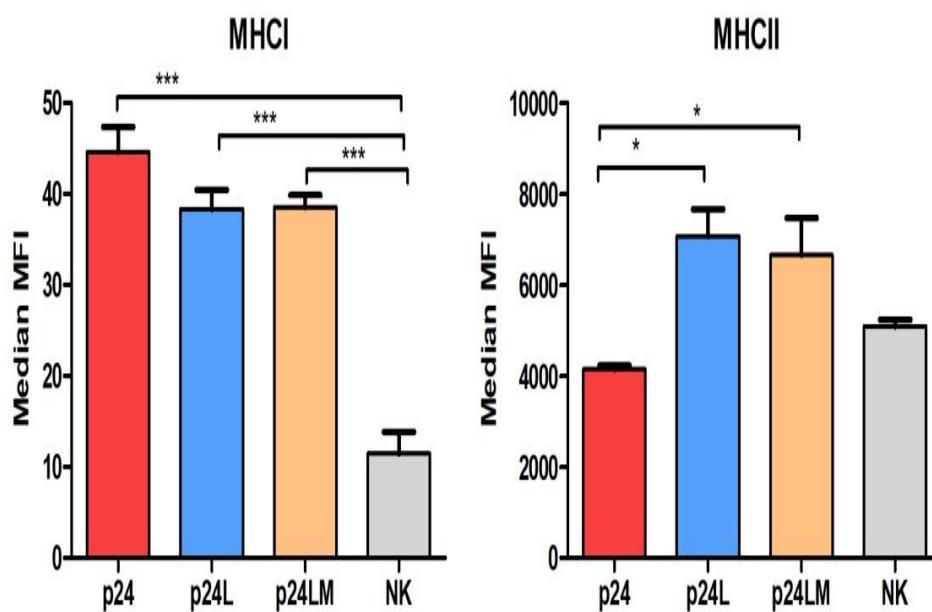
Obr. 18 Fotografie dendritických buněk pulzovaných pomocí p24 navázaným na liposomu společně s mananem. A) buněčná jádra (modrá) dendritických buněk obarvena pomocí DAPI. B) Dendritické buňky (zelené) díky GFP. C) Pozdní endosom (červený) dendritických buněk nabarvený pomocí Texas red. D) Zobrazení všech sledujících konstruktů v jednom snímku.

4.3 Porovnání hodnot exprese markerů získaných pomocí SPC

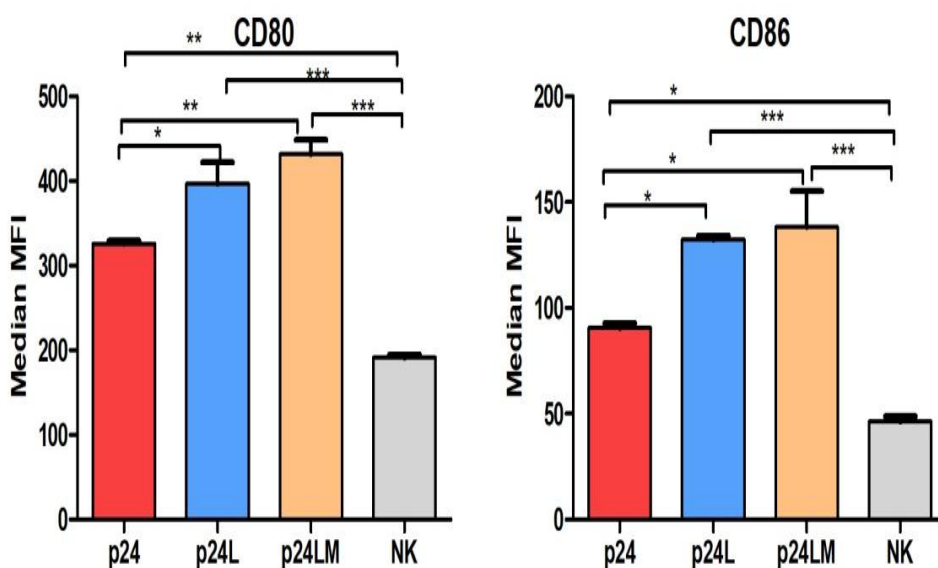
Pomocí programu Graphpad byla získaná data ze spektrální průtokové cytometrie statisticky vyhodnocena. U každého markeru byly porovnávány všechny skupiny buněk. Výsledky statistického vyhodnocení jsou uváděny v grafech (Obr. 18, 19, 20). Každý graf obsahuje 4 sloupce, které jsou barevně odlišeny. Výška každého sloupce charakterizuje hodnotu mediánu intenzity fluorescence. Každý sloupec charakterizuje jednu skupinu buněk, jež byly pulzovány určitým antigenním konstruktem. Červený sloupec jsou buňky, jež jsou pulzovány čistě proteinem p24. Modrý sloupec je skupina buněk, která byla pulzována p24 navázaným na liposomu a oranžový sloupec jsou buňky, kde byl použit antigenní konstrukt p24 navázaný na liposomu společně s mananem. Šedý sloupec je negativní kontrola, což jsou buňky, které nebyly pulzovány ničím. Pro porovnávání středních hodnot jednotlivých skupin buněk byla použita metoda analýza rozptylu (ANOVA - analysis of Variance).



Obr. 19 Grafy hodnoty signifikance byly vypočítány statistickou metodou ANOVA s použitím Tukey post-testu, kdy platí * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.



Obr. 20 Grafy hodnoty signifikance byly vypočítány statistickou metodou ANOVA s použitím Tukey post-testu, kdy platí * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.



Obr. 21 Grafy hodnoty signifikance byly vypočítány statistickou metodou ANOVA s použitím Tukey post-testu, kdy platí * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

5 DISKUZE

Studium zaměřené na účinný vývoj léků proti nemoci AIDS způsobené virem HIV je opodstatněné a je jedním z důležitých úkolů dnešní medicíny. Asi 37,9 miliónů lidí je nakaženo virem HIV a 770 tisíc lidí této nemoci ročně podlehnou. V roce 2018 přibylo 1,7 miliónů nových případů nakažených (UNAIDS, 2018).

Nalezením vhodné léčby, která by pacienty dokázala plně vyléčit z nemoci AIDS, by znamenalo záchranu miliónů lidských životů. V dnešní době jsou pouze 2 známé případy vyléčení z nemoci AIDS. Jeden z případů je známý jako „Berlínský pacient“ a druhý jako „Londýnský pacient“. Oba tyto případy vyléčení jsou díky přirozené mutaci pro chemokinový receptor CCR5 (Gupta, 2020). Bohužel virus HIV mutuje a vznikají různé kmeny tohoto viru. Přirozená mutace chemokinového receptoru CCR5, nicméně nezpůsobuje ochranu vůči všem kmenům viru HIV, a proto mnoho vědeckých výzkumů cílí na protein s označením p24, který je vysoce konzervativní a případně vytvořená vakcína by byla účinná proti všem známým kmenům viru HIV. Tato práce je zaměřena na dendritické buňky, které jsou pulzovány p24 proteinem, protože jsou důležitou částí k vytvoření specifické imunitní odpovědi.

Při tvorbě specifické imunitní odpovědi hrají důležitou roli adjuvancia, která mohou zesílit imunitní odpověď na určitý antigen, a proto se v této práci také používal liposom. Manan se také používal, protože dendritické buňky obsahují manosový receptor při rozpoznávání antigenů, které následně fagocytují. Ne vždy se však pomocí liposomu a mananu povedlo zvýšit expresi povrchových aktivačních molekul. Jednotlivé naměřené a zpracované hodnoty exprese markerů pomocí spektrální průtokové cytometrie u jednotlivých skupin buněk byly vyhodnocovány a porovnávány pomocí metody ANOVA s použitím Tukey post testu jak je uvedeno v obrázcích 19,20,21.

Zajímavý je případ markeru CD11c, kde došlo ke snížení exprese tohoto markeru u všech pulzovaných skupin buněk oproti negativní kontrole. Je pozoruhodné a nečekané, že tento případ se týká pouze dendritických buněk pocházejících z kostní dřeně a sleziny myši. U dendritických buněk pocházejících z člověka se po aktivaci dendritických buněk snížení exprese markeru CD11c nezpůsobovalo. Proto v případě myších dendritických buněk může snížení markeru CD11c sloužit jako nový aktivační marker (Singh-Jasuja, 2013).

U případů markerů MHC II, CD80 a CD86 došlo ke zvýšení exprese díky liposomu, což se nedá úplně říct o mananu, který sice pomohl zvýšit expresi v případech markerů CD80 a CD86, ale jeho zvýšení není nijak znatelné.

Velice zajímavý je případ MHC I markeru. U tohoto markeru byla nejvyšší exprese pozorována u buněk, které byly pulzovány čistě p24 proteinem, takže liposom ani manan nepomohly zvýšit expresi tohoto markeru. U markeru MHC II byla tato situace zcela opačná. P24 protein snížil expresi markeru MHC II oproti negativní kontrole, nicméně když byla použita adjuvancia, tak se exprese MHC II zvýšila oproti negativní kontrole. Je velice pravděpodobné, že při pulzaci dendritických buněk p24 proteinem musí být použita vhodná adjuvancia, aby se docílilo zvýšení exprese MHC II markeru. Tuto skutečnost také potvrzuje zvýšení exprese markeru MHC II pomocí p24 proteinu navázaným na povrchu aniontových nanočástic polymléčné kyseliny (PLA). Myší dendritické buňky účinně absorbovaly nanočástice potažené p24. Pohlčení těchto částic následně indukovalo v dendritických buňkách zvýšenou expresi nejen MHCII markeru, nicméně také MHCI, CD40, CD80 a CD86 (Aline, 2009).

Naměřená data v této práci potvrzují spolu s dalšími pracemi, že vhodná adjuvancia jsou velmi důležitou součástí vytvářených vakcín a jejich používání je ve výzkumu velice významné.

6 ZÁVĚR

Teoretická část práce byla zaměřena na část imunitního systému s názvem dendritické buňky. Velká pozornost byla věnována schopnosti s názvem antigenní prezentace, jež dendritické buňky disponují. Dále tato část bakalářské práce je věnována pulzujícím látkám (kapsidový protein viru HIV s označením p24, liposom a manan), které byly v experimentální části využívány.

V experimentální části byla provedena pulzace dendritických buněk. Dendritické buňky byly rozděleny do čtyř skupin. První skupina byla tvořena dendritickými buňkami, které nebyly pulzovány žádnou antigenní složkou. Druhá skupina byla tvořena buňkami, které byly pulzovány čistě p24. Třetí skupinou buněk byly buňky, jež byly pulzovány p24 navázaným na liposomu. Poslední skupinou byly buňky, které byly pulzovány p24 navázaným na liposomu společně s mananem. Následně u těchto buněk byla měřena exprese různých buněčných markerů. Konkrétně se jednalo o markery CD40, CD80, CD86, CD11c, MHCI a MHCII. Pro měření exprese byla použita spektrální průtoková cytometrie. Jako důkazová metoda byla aplikována konfokální mikroskopie.

Množství exprese určitého markeru se u jednotlivých pozorovaných skupin pulzovaných buněk většinou zvýšilo. Nezvýšilo se hlavně v případě exprese markerů CD11c, kde byla exprese tohoto markeru snížena u všech pulzovaných skupin buněk oproti buňkám, které nebyly pulzovány žádným antigenním konstruktem. Dále jen případy exprese markerů CD80 a CD86 byly podle očekávání, kde exprese markerů byla nejnižší u nepulzovaných buněk, zatímco u pulzovaných buněk, které byly pulzovány p24 navázaným na liposomu společně s mananem, byla nejvyšší. U markerů MHCI a CD40 byla exprese zvýšená podle očekávání u pulzovaných buněk v porovnání s negativní kontrolou, kde se k buňkám nepřidal žádný antigenní konstrukt, nicméně exprese byla přibližně stejná, jak u buněk pulzovaných čistě p24, tak u p24 navázaným na liposomu, takže v případě těchto markerů liposom nepomohl zvětšit expresi. Významné úlohy však liposom dosáhl u exprese markeru MHC II. Zatímco dendritické buňky, které byly pulzovány čistě p24 proteinem, tak svou expresi markeru MHC II snížily, tak v případě pulzace p24 proteinu společně s liposomem byla exprese zvýšena a to významně.

Jednotlivé exprese markerů u jednotlivých skupin buněk byly porovnávány pomocí statistické metody ANOVA. Největší rozdíl mezi pulzovanými a nepulzovanými buňkami byl zaznamenán u markerů CD80, CD86 a MHCI. Vzhledem ke skutečnosti, že liposom nesnižoval nijak zdatelně žádnou expresi pozorovaných buněčných markerů, nýbrž ji v některých případech dokázal výrazně zvýšit, je jeho využití v imunologii a farmakologii oprávněné.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ACKERMAN, A. L., C. KYRITSIS, R. TAMPE a P. CRESSWELL, 2011. Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **100**(22), 12889-12894. DOI: 10.1073/pnas.1735556100. ISSN 0027-8424. Dostupné také z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1735556100>
- ALINE, F., D. BRAND, J. PIERRE, P. ROINGEARD, M. SÉVERINE, B. VERRIER a I. DIMIER-POISSON, 2009. Dendritic cells loaded with HIV-1 p24 proteins adsorbed on surfactant-free anionic PLA nanoparticles induce enhanced cellular immune responses against HIV-1 after vaccination. *Vaccine*. **27**(38), 5284-5291. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.05.028. ISSN 0264410X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X09007075>
- ALTIN, J. G. a CH. R. PARISH, 2006. Liposomal vaccines—targeting the delivery of antigen. *Methods*. **40**(1), 39-52. DOI: 10.1016/j.ymeth.2006.05.027. ISSN 10462023. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202306001605>
- BRENCHLEY, J. M., T. W. SCHACKER, L. E. RUFF, et al., 2004. CD4 T Cell Depletion during all Stages of HIV Disease Occurs Predominantly in the Gastrointestinal Tract. *The Journal of Experimental Medicine*. **200**(6), 749-759. DOI: 10.1084/jem.20040874. ISSN 1540-9538. Dostupné také z: <https://rupress.org/jem/article/200/6/749/40153/CD4-T-Cell-Depletion-during-all-Stages-of-HIV>
- CAMPBELL, D. J., T. SERWOLD a N. SHASTRI, 2000. Bacterial Proteins Can Be Processed by Macrophages in a Transporter Associated with Antigen Processing-Independent, Cysteine Protease-Dependent Manner for Presentation by MHC Class I Molecules. *The Journal of Immunology*. **164**(1), 168-175. DOI: 10.4049/jimmunol.164.1.168. ISSN 0022-1767. Dostupné také z: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.164.1.168>
- COFFEY, J. W. a C. DE DUVE, 1968. Digestive activity of lysosomes. I. The digestion of proteins by extracts of rat liver lysosomes. *The Journal of Biological Chemistry*. **243**, 3255-3263.
- CRESSWELL, P., N. BANGIA, T. DICK a G. DIEDRICH, 1999. The nature of the MHC class I peptide loading complex. *Immunological Reviews*. **172**(1), 21-28. DOI: 10.1111/j.1600-065X.1999.tb01353.x. ISSN 0105-2896. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-065X.1999.tb01353.x>
- CUTLER, A. J. a K. A. DAVIES, 1998. Antigen Clearance. *Encyclopedia of Immunology*. Elsevier, 1998, 182-188. DOI: 10.1006/rwei.1999.0050. ISBN 9780122267659. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B0122267656000438>
- DE SERRANO, L. O. a D. J. BURKHART, 2017. Liposomal vaccine formulations as prophylactic agents: design considerations for modern vaccines. *Journal of Nanobiotechnology*. **15**(1). DOI: 10.1186/s12951-017-0319-9. ISSN 1477-3155. Dostupné také z:

- <https://jnanobiotechnology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12951-017-0319-9>
- DESJARDINS, M, L. HUBER, RG PARTON a G. GRIFFITHS, 1994. Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *The Journal of Cell Biology*. 124(5), 677-688. DOI: 10.1083/jcb.124.5.677. ISSN 0021-9525. Dostupné také z: <https://rupress.org/jcb/article/124/5/677/28853/Biogenesis-of-phagolysosomes-proceeds-through-a>
- DESSELBERGER, U., 2002. Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, edited by M.H.V. van Regenmortel, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, E.B. Carstens, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle and R.B. Wickner, Virology Division, International Union of Microbiological Societies, Academic Press, San Diego, 1162 pp. ISBN. Virus Research. 83(1-2), 221-222. DOI: 10.1016/S0168-1702(01)00352-5. ISSN 01681702. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168170201003525>
- DONALDSON, J, N PORATSHLIOM a L COHEN, 2009. Clathrin-independent endocytosis: A unique platform for cell signaling and PM remodeling. *Cellular Signalling*. 21(1), 1-6. DOI: 10.1016/j.cellsig.2008.06.020. ISSN 08986568. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0898656808001885>
- FLATEAU, C., G. LE LOUP a G. PIALOUX, 2011. Consequences of HIV infection on malaria and therapeutic implications: a systematic review. *The Lancet Infectious Diseases*. 11(7), 541-556. DOI: 10.1016/S1473-3099(11)70031-7. ISSN 14733099. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309911700317>
- FREED, E.O. a M.A. MARTIN, c2001. HIVs and their replication. *Fields virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. ISBN 07-817-1832-5.
- FRYDMAN, J., 2001. Folding of Newly Translated Proteins In Vivo: The Role of Molecular Chaperones. *Annual Review of Biochemistry*. 70(1), 603-647. DOI: 10.1146/annurev.biochem.70.1.603. ISSN 0066-4154. Dostupné také z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.biochem.70.1.603>
- GAINES, H., A. SÖNNERBORG, J. CZAJKOWSKI, F. CHIODI, E. FENYÖ, M. SYDOW, J. Albert, P. PEHRSON, L. MOBERG, B. ÅSJÖ, M. FORSGREN, 1987. Antibody response in primary human immunodeficiency virus infection. *The Lancet*. 329(8544), 1249-1253. DOI: 10.1016/S0140-6736(87)92696-1. ISSN 01406736. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673687926961>
- GALVANI, A. P. a J. NOVEMBRE, 2005. The evolutionary history of the CCR5-Δ32 HIV-resistance mutation. *Microbes and Infection*. 7(2), 302-309. DOI: 10.1016/j.micinf.2004.12.006. ISSN 12864579. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1286457904003636>
- GRANT, B. D. a J. G. DONALDSON, 2009. Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 10(9), 597-608.

- DOI: 10.1038/nrm2755. ISSN 1471-0072. Dostupné také z:
<http://www.nature.com/articles/nrm2755>
- GROMME, M., F. G. C. M. UYTDEHAAG, H. JANSSEN, J. CALAFAT, R. S. VAN BINNENDIJK, M. J. H. KENTER, A. TULP, D. VERWOERD, J. NEEFJES, 1999. Recycling MHC class I molecules and endosomal peptide loading. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 96(18), 10326-10331. DOI: 10.1073/pnas.96.18.10326. ISSN 0027-8424. Dostupné také z:
<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.96.18.10326>
- GUERMONPREZ, P., L. SAVEANU, M. KLEIJMEER, J. DAVOUST, P. VAN ENDERT a S. AMIGORENA, 2003. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature*. 425(6956), 397-402. DOI: 10.1038/nature01911. ISSN 0028-0836. Dostupné také z:
<http://www.nature.com/articles/nature01911>
- GUPTA, R. K., D. PEPPA, A. L HILL, C. GÁLVEZ, M. SALGADO, M. PACE, L. E MCCOY, S. GRIFFITH, J. THORNHILL, A. ALRUBAYYI, L. E P HUYVENEERS, E. NASTOULI, P. GRANT, S. G EDWARDS, A. J INNES, J. FRATER, M. NIJHUIS, A. M. J WENSING, J. MARTINEZ-PICADO, E. OLAVARRIA, 2020. Evidence for HIV-1 cure after CCR5Δ32/Δ32 allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation 30 months post analytical treatment interruption: a case report. *The Lancet HIV*. 7(5), e340-e347. DOI: 10.1016/S2352-3018(20)30069-2. ISSN 23523018. Dostupné také z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352301820300692>
- HANDEL, A., A. YATES, S. S. PILYUGIN a R. ANTIA, 2007. Gap junction-mediated antigen transport in immune responses. *Trends in Immunology*. 28(11), 463-466. DOI: 10.1016/j.it.2007.08.006. ISSN 14714906. Dostupné také z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471490607002268>
- HAWORTH, K. G., CH. W. PETERSON a H. P. KIEM, 2017. CCR5-edited gene therapies for HIV cure: Closing the door to viral entry. *Cytherapy*. 19(11), 1325-1338. DOI: 10.1016/j.jcyt.2017.05.013. ISSN 14653249. Dostupné také z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1465324917306205>
- HOŘEJŠÍ, V. a J. BARTUŇKOVÁ, 2005. *Základy imunologie*. Vyd. 3. Praha: Triton. ISBN 80-725-4686-4.
- HOŘEJŠÍ, V., J. BARTUŇKOVÁ, T. BRDIČKA a R. ŠPÍŠEK, 2017. *Základy imunologie*. 6., aktualizované vydání. V Praze: Stanislav Juhaňák - Triton. ISBN 978-80-7553-250-3.
- HOUDE, M., S. BERTHOLET, E. GAGNON, S. BRUNET, G. GOYETTE, A. LAPLANTE, M.F. PRINCIOTTA, P. THIBAUT, D. SACKS, M. DESJARDINS, 2003. Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature*. 425(6956), 402-406. DOI: 10.1038/nature01912. ISSN 0028-0836. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/nature01912>
- HÜTTER, G., D. NOWAK, M. MOSSNER, S. GANEPOLA, A. MÜBIG, K. ALLERS, T. SCHNEIDER, J. HOFMANN, C. KÜCHERER, O. BLAU, I.W. BLAU, W.K. HOFMANN, E. THIEL, 2009. Long-Term Control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 Stem-Cell Transplantation. *New England Journal of*

- Medicine*. **360**(7), 692-698. DOI: 10.1056/NEJMoa0802905. ISSN 0028-4793.
Dostupné také z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa0802905>
- CHAMI, M., B. FRANKE, O. MAYANS a L. KREPLAK, 2011. Assembly of a protein “brush” by end-grafting titin fragments to liposomes. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **112**(2), 178-179. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2011.04.014. ISSN 13891723. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389172311001836>
- ICHIYANAGI, T., T. IMAI, CH. KAJIWARA, S. MIZUKAMI, A. NAKAI, T. NAKAYAMA a H. UDONO, 2010. Essential Role of Endogenous Heat Shock Protein 90 of Dendritic Cells in Antigen Cross-Presentation. *The Journal of Immunology*. 185(5), 2693-2700. DOI: 10.4049/jimmunol.1000821. ISSN 0022-1767. Dostupné také z: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1000821>
- IMAI, T., Y. KATO, C. KAJIWARA, S. MIZUKAMI, I. ISHIGE, T. ICHIANAGI, M. HIKIDA, J.-Y. WANG, H. UDONO, 2011. Heat shock protein 90 (HSP90) contributes to cytosolic translocation of extracellular antigen for cross-presentation by dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108(39), 16363-16368. DOI: 10.1073/pnas.1108372108. ISSN 0027-8424. Dostupné také z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1108372108>
- KOVACSOVICS-BANKOWSKI, M. a K. ROCK, 1995. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science*. 267(5195), 243-246. DOI: 10.1126/science.7809629. ISSN 0036-8075. Dostupné také z: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.7809629>
- KRISHNA, P a G GLOOR, 2001. The Hsp90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana*. *CELL STRESS & CHAPERONES*. 6(3), 238-246.
- KRUPKA, M., K. ZACHOVA, R. CAHLIKOVA, J. VRBKOVA, Z. NOVAK, M. SEBELA, E. WEIGL a M. RASKA, 2015. Endotoxin-minimized HIV-1 p24 fused to murine hsp70 activates dendritic cells, facilitates endocytosis and p24-specific Th1 response in mice. *Immunology Letters*. 166(1), 36-44. DOI: 10.1016/j.imlet.2015.05.010. ISSN 01652478. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165247815000863>
- LERNER, J. M., 2006. Imaging spectrometer fundamentals for researchers in the biosciences—A tutorial. *Cytometry Part A*. **69A**(8), 712-734. DOI: 10.1002/cyto.a.20242. ISSN 1552-4922. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/cyto.a.20242>
- LERNER, J. M., N. GAT a E. WACHMAN, 2010. Approaches to Spectral Imaging Hardware. *Current Protocols in Cytometry*. **53**(1), 12.20.1-12.20.40. DOI: 10.1002/0471142956.cy1220s53. ISSN 19349297. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471142956.cy1220s53>
- LIU, R., W. A PAXTON, S. CHOE, D. CERADINI, S. R MARTIN, R. HORUK, M. E MACDONALD, H. STUHLMANN, R. A KOUP, N. R LANDAU, 1996. Homozygous Defect in HIV-1 Coreceptor Accounts for Resistance of Some Multiply-Exposed Individuals to HIV-1 Infection. *Cell*. 86(3), 367-377. DOI:

- 10.1016/S0092-8674(00)80110-5. ISSN 00928674. Dostupné také z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867400801105>
- LOW, J. S. a A. FASSATI, 2014. Hsp90: a chaperone for HIV-1. *Parasitology*. 141(9), 1192-1202. DOI: 10.1017/S0031182014000298. ISSN 0031-1820. Dostupné také z:
https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0031182014000298/type/journal_article
- LUCOTTE, G. a P. SMETS, 2003. CCR5- Δ 32 Allele Frequencies in Ashkenazi Jews. *Genetic Testing*. 7(4), 333-337. DOI: 10.1089/109065703322783716. ISSN 1090-6576. Dostupné také z:
<http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/109065703322783716>
- LUCOTTE, G. a F. DIETERLEN, 2003. More about the Viking hypothesis of origin of the Δ 32 mutation in the CCR5 gene conferring resistance to HIV-1 infection. *Infection, Genetics and Evolution*. 3(4), 293-295. DOI: 10.1016/j.meegid.2003.07.001. ISSN 15671348. Dostupné také z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567134803000960>
- LUCOTTE, G. a G. MERCIER, 1998. Distribution of the CCR5 Gene 32-bp Deletion in Europe. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*. 19(2), 174-177. DOI: 10.1097/00042560-199810010-00011. ISSN 1077-9450. Dostupné také z:
<https://insights.ovid.com/crossref?an=00042560-199810010-00011>
- MASCARENHAS, A. P. a K. MUSIER-FORSYTH, 2009. The capsid protein of human immunodeficiency virus: interactions of HIV-1 capsid with host protein factors. *FEBS Journal*. 276(21), 6118-6127. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2009.07315.x. ISSN 1742464X. Dostupné také z:
<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1742-4658.2009.07315.x>
- MAŠEK, J., E. BARTHELDYOVÁ, P. TURÁNEK-KNOTIGOVÁ, M. ŠKRABALOVÁ, Z. KORVASOVÁ, J. PLOCKOVÁ, Š. KOUDELKA, P. ŠKODOVÁ, P. KULICH, M. KŘUPKA, K. ZACHOVÁ, L. CZERNEKOVÁ, M. HORYNOVÁ, I. KRATOCHVÍLOVÁ, A. D. MILLER, D. ZÝKA, J. MICHÁLEK, J. VRBKOVÁ, M. ŠEBELA, M. LEDVINA, M. RAŠKA, J. TURÁNEK, 2011. Metallochelating liposomes with associated lipophilised norAbuMDP as biocompatible platform for construction of vaccines with recombinant His-tagged antigens: Preparation, structural study and immune response towards rHsp90. *Journal of Controlled Release*. **151**(2), 193-201. DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.01.016. ISSN 01683659. Dostupné také z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365911000228/>
- MENDOZA-NARANJO, A., P. J. SAÉZ, C. CH. JOHANSSON, M. RAMÍREZ, D. MANDAKOVIĆ, C. PEREDA, M. N. LÓPEZ, R. KIESSLING, J. C. SÁEZ, F. SALAZAR-ONFRAY, 2007. Functional Gap Junctions Facilitate Melanoma Antigen Transfer and Cross-Presentation between Human Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*. 178(11), 6949-6957. DOI: 10.4049/jimmunol.178.11.6949. ISSN 0022-1767. Dostupné také z:
<http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.178.11.6949>

- MIERNYK, JA, 1997. The 70 kDa stress-related proteins as molecular chaperones. *TRENDS IN PLANT SCIENCE*. 2(5), 180-187.
- MUKAI, Y., T. YOSHINAGA, M. YOSHIKAWA, K. MATSUO, T. YOSHIKAWA, K. MATSUO, K. NIKI, Y. YOSHIOKA, N. OKADA, S. NAKAGAWA, 2011. Induction of Endoplasmic Reticulum–Endosome Fusion for Antigen Cross-Presentation Induced by Poly (γ -Glutamic Acid) Nanoparticles. *The Journal of Immunology*. 187(12), 6249-6255. DOI: 10.4049/jimmunol.1001093. ISSN 0022-1767. Dostupné také z: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1001093>
- NEIJSEN, J., C. HERBERTS, J. W. DRIJFHOUT, E. REITS, L. JANSSEN a J. NEEFJES, 2005. Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions. *Nature*. 434(7029), 83-88. DOI: 10.1038/nature03290. ISSN 0028-0836. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/nature03290>
- NOLAN, J. P. a D. CONDELLO, 2013. Spectral Flow Cytometry. *Current Protocols in Cytometry*. 63(1). DOI: 10.1002/0471142956.cy0127s63. ISSN 1934-9297. Dostupné také z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/0471142956.cy0127s63>
- NOVEMBRE, J., A. P GALVANI, M. SLATKIN a A. CLARK, 2005. The Geographic Spread of the CCR5 Δ 32 HIV-Resistance Allele. *PLoS Biology*. 3(11). DOI: 10.1371/journal.pbio.0030339. ISSN 1545-7885. Dostupné také z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pbio.0030339>
- PANG, B., J. NEIJSEN, X. QIAO, L. JANSSEN, H. JANSSEN, CH. LIPPUNER a J. NEEFJES, 2009. Direct Antigen Presentation and Gap Junction Mediated Cross-Presentation during Apoptosis. *The Journal of Immunology*. 183(2), 1083-1090. DOI: 10.4049/jimmunol.0900861. ISSN 0022-1767. Dostupné také z: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.0900861>
- PILLAY, Ch. S., E. ELLIOTT a C. DENNISON, 2002. Endolysosomal proteolysis and its regulation. *Biochemical Journal*. 363(3). DOI: 10.1042/0264-6021:3630417. ISSN 02646021. Dostupné také z: <http://www.biochemj.org/bj/363/bj3630417.htm>
- Počítací komůrka dle Bürkera, bez svorek. *Fisherscientific* [online]. [cit. 2020-05-22]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.cz/produkty/pocitaci-komurka-dle-burkera-bez-svorek>
- RATAJCZAK, W., P. NIEDŹWIEDZKA-RYSTWEJ, B. TOKARZ-DEPTUŁA a W. DEPTUŁA, 2018. Immunological memory cells. *Central European Journal of Immunology*. 43(2), 194-203. DOI: 10.5114/ceji.2018.77390. ISSN 1426-3912. Dostupné také z: <https://www.termedia.pl/doi/10.5114/ceji.2018.77390>
- REID, J.S.G., 1982. *Plant Carbohydrates I*. Berlin: Springer, Berlin, Heidelberg. ISBN 978-3-642-68277-3.
- SANDERS, Claire K. a Judith R. MOURANT, 2013. Advantages of full spectrum flow cytometry. *Journal of Biomedical Optics*. 18(3). DOI: 10.1117/1.JBO.18.3.037004. ISSN 1083-3668. Dostupné také z: <http://biomedicaloptics.spiedigitallibrary.org/article.aspx?doi=10.1117/1.JBO.18.3.037004>

- SAVEANU, Loredana, Doriana FRUCI a Peter M VAN ENDERT, 2002. Beyond the proteasome: trimming, degradation and generation of MHC class I ligands by auxiliary proteases. *Molecular Immunology*. 39(3-4), 203-215. DOI: 10.1016/S0161-5890(02)00102-5. ISSN 01615890. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161589002001025>
- SERWOLD, T., F. GONZALEZ, J. KIM, R. JACOB a N. SHASTRI, 2002. ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature*. 419(6906), 480-483. DOI: 10.1038/nature01074. ISSN 0028-0836. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/nature01074>
- SERWOLD, T., S. GAW a N. SHASTRI, 2001. ER aminopeptidases generate a unique pool of peptides for MHC class I molecules. *Nature Immunology*. 2(7), 644-651. DOI: 10.1038/89800. ISSN 1529-2908. Dostupné také z: http://www.nature.com/articles/ni0701_644
- SHEN, L., L. J. SIGAL, Marianne BOES a Kenneth L. ROCK, 2004. Important Role of Cathepsin S in Generating Peptides for TAP-Independent MHC Class I Crosspresentation In Vivo. *Immunity*. 21(2), 155-165. DOI: 10.1016/j.immuni.2004.07.004. ISSN 10747613. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761304001748>
- SCHIRMBECK, R., K. MELBER a J. REIMANN, 1995. Hepatitis B virus small surface antigen particles are processed in a novel endosomal pathway for major histocompatibility complex class I-restricted epitope presentation. *European Journal of Immunology*. 25(4), 1063-1070. DOI: 10.1002/eji.1830250431. ISSN 00142980. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/eji.1830250431>
- SINGH, R. a P. CRESSWELL, 2010. Defective Cross-Presentation of Viral Antigens in GILT-Free Mice. *Science*. 328(5984), 1394-1398. DOI: 10.1126/science.1189176. ISSN 0036-8075. Dostupné také z: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1189176>
- SINGH-JASUJA, H., A. THIOLAT, M. RIBON, M-CH. BOISSIER, N. BESSIS, H-G. RAMMENSEE a P. DECKER, 2013. The mouse dendritic cell marker CD11c is down-regulated upon cell activation through Toll-like receptor triggering. *Immunobiology*. 218(1), 28-39. DOI: 10.1016/j.imbio.2012.01.021. ISSN 01712985. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0171298512000368>
- SLOTTÁ, Z., 2007. Výživa a imunita – vztah k jednotlivým živinám. Brno. Bakalářská práce. MASARYKOVA UNIVERZITA v BRNĚ, LÉKAŘSKÁ FAKULTA. Vedoucí práce MUDr. Zuzana Medková, Ph.D.
- Spectral analyser technology, 2014. *SCIENTISTLIVE* [online]. London: Setform Limited [cit. 2020-05-23]. Dostupné z: <https://www.scientistlive.com/content/spectral-analyser-technology>
- TEOW, S., S. MUALIF, T. OMAR, CH. WEI, N. YUSOFF a S. A ALI, 2013. Production and purification of polymerization-competent HIV-1 capsid protein p24 (CA) in NiCo21(DE3) Escherichia coli. *BMC Biotechnology*. 13(1). DOI: 10.1186/1472-6750-13-107. ISSN 1472-6750. Dostupné také z: <http://bmcbiotechnol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6750-13-107>

- TORCHILIN, V. a V. WEISSIG, 2003. *Liposomes: A Practical Approach*. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press. ISBN 978-01-9963-654-9.
- TROMBETTA, E. S., 2003. Activation of Lysosomal Function During Dendritic Cell Maturation. *Science*. 299(5611), 1400-1403. DOI: 10.1126/science.1080106. ISSN 00368075. Dostupné také z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1080106>
- UNAIDS [online], 2018. Geneva [cit. 2020-05-22]. Dostupné z: <https://www.unaids.org/en>
- WEGELE, H., L. MÜLLER a J. BUCHNER, 2004. Hsp70 and Hsp90—a relay team for protein folding. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1-44. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. DOI: 10.1007/s10254-003-0021-1. ISBN 978-3-540-22096-1. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10254-003-0021-1>
- WOODMAN, P. G a C. E FUTTER, 2008. Multivesicular bodies: co-ordinated progression to maturity. *Current Opinion in Cell Biology*. 20(4), 408-414. DOI: 10.1016/j.ceb.2008.04.001. ISSN 09550674. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955067408000720>
- YOUNG, J. C., I. MOAREFI a F. U. HARTL, 2001. Hsp90. *The Journal of Cell Biology*. 154(2), 267-274. DOI: 10.1083/jcb.200104079. ISSN 1540-8140. Dostupné také z: <https://rupress.org/jcb/article/154/2/267/32163/Hsp90-a-specialized-but-essential-proteinfolding>
- ZACHOVA, K., M. KRUPKA a M. RASKA, 2016. Antigen Cross-Presentation and Heat Shock Protein-Based Vaccines. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 64(1), 1-18. DOI: 10.1007/s00005-015-0370-x. ISSN 0004-069X. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00005-015-0370-x>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ANOVA Metoda analýzy rozptylu

APC Antigen prezentující buňky

BE Brzký endosom

DC Dendritické buňky

ER Endoplazmatické retikulum

ERAP Aminopeptidasa endoplazmatického retikula

FBS Fetalní bovinní sérum

GFP Zelený fluorescenční protein

IMDM Iscoveovo upravené Dulbeccovo médium

MDP Muramyl dipeptid

MHC Hlavní histokompatibilní komplex

MTO03 C-18-06-norAbuMDP

NK Přirození zabíječi

PBS Fosfátový pufr

PFA Paraformaldehyd

PLA Polykyselina mléčná

PS Proteasom

rHsp 90 Rekombinantní protein tepelného šoku 90

SPC Spektrální průtoková cytometrie

TAP Transportér spojený se zpracováním antigenu