

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**



**Kotvení agonistů PRRs na nádorové buňky s cílem navození
protinádorové imunitní reakce na úrovni vrozené imunity**

Diplomová práce

Bc. Markéta Wachtlová

školitel: RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice 2012

Wachtlová M., 2012: Kotvení agonistů PRRs na nádorové buňky s cílem navození protinádorové imunitní reakce na úrovni vrozené imunity. [Anchoring of agonists of PRRs on tumor cells with the aim to cause antitumor immune reaction based on the innate immunity. Mgr. Thesis, in Czech] –61 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Transduction of melanoma cells with the aim to induce avidine expression on tumor cell surface was studied. Subsequently the method enabling quantification of binding of ligands to the cell surface was developed.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval/a samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, dne 12. 12. 2012

.....
Markéta Wachtlová

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především svému školiteli RNDr. Janu Ženkovi, CSc. za odborné vedení a cenné rady, dále za ochotu s čímkoli pomoci a hlavně za jeho neuvěřitelně lidský a optimistický přístup. Mé poděkování patří také Mgr. Tereze Janotové za cenné připomínky a ochotu kdykoli pomoci, děkuji i za vytvoření příjemného pracovního prostředí a podporu. Velký dík patří i Filipu Šeniglovi, Ph.D. za konstrukci plazmidů a pomoc při přípravě virového vektoru, ráda bych ocenila i jeho velmi přátelský a ochotný přístup. Dále bych chtěla poděkovat prof. RNDr. Janu Kopeckému, CSc. za jeho vstřícnost a poskytnutí prostředků a zázemí na Oddělení imunologie parazitů Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích.

Mé velké poděkování patří také mé mamince za podporu a také za inspirativní a obdivuhodný optimistický přístup v jejím boji s vážnou nemocí. Za podporu také děkuji svému příteli a všem kamarádům.

Obsah

1. Nádorová onemocnění	1
1.1 Léčba rakoviny v historii	1
1.2 Klasifikace	2
1.2.1 Melanom	4
1.2.1.1 Klasifikace melanomů	4
1.2.1.2 Melanom B16 F10	5
1.3 Teorie vzniku rakoviny	5
1.4 Znaký nádorových buněk	6
1.5 Terapie nádorových onemocnění	7
1.5.1 Imunoterapie	8
1.5.1.1 Imunoterapie založená na použití protilátek	8
1.5.1.2 Imunoterapie pomocí mechanismů zprostředkovaných buňkami	9
1.5.1.3 Problémy imunoterapie	10
1.6 Imunitní systém a rakovina	10
1.6.1 Vrozená imunita v boji proti nádorům	11
1.6.2 Ukotvení PAMPs na nádorové buňky	13
1.6.2.1 Přenos genů pomocí virových vektorů	14
1.6.2.1.1 Přehled nejčastěji využívaných virových vektorů	14
1.6.2.2 Systém avidin-biotin	15
2. Cíle práce	21
3. Materiál a metodika práce	22
3.1 Chemikálie	22
3.2 Přístroje	22
3.3 Buněčné linie	23
3.3.1 Buněčná melanomová linie B16-F10	23
3.3.2 Pakážovací buňky GP 293 (linie z embryonální lidské ledviny)	23
3.4 Bakterie (E. coli – kmen STBL) s plazmidy	23
3.5 Izolace DNA	24
3.6 Příprava virového vektoru	24
3.6.1 Transfekce pakážovacích buněk	24
3.6.2 Sbíráání média	25
3.6.3 Titrace	25
3.7 Infekce melanomových buněk B16-F10	25

3.8 Vazba s biotinem a značení protilátkou.....	26
3.8.1 Optimalizace detekce vázaného biotinu	26
3.9 Mikroskopické ověření vazby biotinu	27
3.10 Virový vektor odvozený od lentiviru	27
3.11 Ověření vazby BAM a DOPE na nádorové buňky.....	27
3.11.1 Detekce pomocí hemoglobinu	27
3.11.2 Detekce pomocí bovinního sérového albuminu (BSA).....	29
3.11.3 Detekce pomocí B-phycoerytrinu (PE)	30
3.11.4 Statistická analýza dat	30
4. Výsledky.....	31
4.1 Instalace avidinu na nádorové buňky pomocí virového vektoru.....	31
4.2 Ověření vazby BAM a DOPE na nádorové buňky.....	36
4.2.1 Detekce pomocí hemoglobinu	36
4.2.2 Detekce pomocí bovinního sérového albuminu	37
4.2.3 Detekce pomocí B-phycoerythrinu.....	38
5. Diskuze	42
6. Závěr.....	46
7. Seznam literatury:.....	47

Zkratky

ADCC - na protilátkách závislá buněčná cytotoxicita

ATP - adenosintrifosfát

BAM - Biocompatible Anchor for cell Membrane

BSA - bovinní sérový albumin

CD - cluster of differentiation

DOPE - N-(Succinimidylxy-glutaryl)-L- α -phosphatidylethanolamine, Diolelyl

FasL - Fas ligand

FGF - fibroblastové růstové faktory

GM-CSF - faktor stimulující granulocyto-makrofágové kolonie

HEM - hemoglobin

IFN - interferon

IL - interleukin

LAK - zabíječské buňky aktivované lymfokiny

MHC- hlavní histokompatibilní komplex

NK - natural killers - přirozené zabíječe

PAMP - s patogenem asociované molekulové vzory

PBS - solný fosfátový pufr

PE - B-phycoerythrin

PRRs - receptory rozpoznávající motivy

SR/CR - spontánní regrese / kompletní rezistence

TGF - transformující růstový faktor

TIL - tumor infiltrující lymfocyty

TLR - Toll-like receptor

VEGF-A - vaskulární endoteliální růstový faktor A

1. Nádorová onemocnění

Pojem rakovina označuje skupinu více než 200 onemocnění, která jsou charakterizována nekontrolovatelným a abnormálním růstem buněk (Schulz, 2005).

Nádorová onemocnění patří k největším zdravotním problémům. Každý rok stoupá počet pacientů, kteří onemocní rakovinou. Některé studie předpovídají 22,2 milionů nových případů v roce 2030, v tom samém roce by na rakovinu mělo zemřít 13,2 milionů lidí (Bray a kol., 2012). V České republice roste celková incidence nádorových onemocnění, k nejčastějším malignitám zde patří nádory kolorekta, prsu, plic a prostaty (Dušek a kol., 2010).

V současné době probíhá 36717 klinických studií zabývajících se léčbou rakoviny, z čehož 1293 studií se zabývá léčbou melanomů (www.clinicaltrials.gov, 9.12.2012).

1.1 Léčba rakoviny v historii

Podle paleopatologických nálezů se tumory vyskytovaly již u zvířat v prehistorické době. Nejstarší psaný záznam o rakovině lze nalézt v Edwin Smith Papyru (asi 3000 let př. n. l.). Eberův Papyrus (asi 1500 let př. n. l.) jako první popisuje nádor měkkých tkání – tukový tumor – a dále se také zmiňuje o rakovině kůže, dělohy, žaludku a rekta.

Již starověké civilizace měly snahu nádory léčit. Egypťané nádory vypalovali nebo vyřízli, dále používali k léčbě různé soli či arsenikovou mast. Naproti tomu Sumerové, Peršani, Číňané nebo Hebrejci zastávali léčbu pomocí rostlin. Nádory tedy léčili pomocí čajů, ovocných šťáv, vařeného zelí nebo fíků. V pokročilejších případech pak aplikovali roztoky a pasty z mědi, rtuti, síry a železa. Řekové věřili, že rakovina je vyvolána nadbytkem či nedostatkem krve, hlenu, žluči a dalších tělních sekretů. Léčba spočívala v použití různých roztoků a vypalování v případě povrchových postižení, hluboko uložené tumory byly vyříznuty nebo považovány za nevléčitelné (Hajdu, 2011). Řekové také dali rakovině její jméno. Řeckému lékaři Hippokratovi připomínal rakovinný růst kraba – řecky „carcinus“ (odpovídajícím latinským slovem je „cancer“) (Wagener, 2009).

Léčebné postupy římských lékařů byly z dnešního pohledu rovněž zajímavé, patřila k nim například aplikace vařeného zelí; směsi medu, vaječného bílku a soli; vařené směsi popela z mořského kraba, vaječného bílku, medu a sušených výkalů sokolů. Claudius Galen

věřil, že příčinou neléčitelné rakoviny je hustá černá žluč, zatímco řídká žlutá žluč způsobuje vznik léčitelné rakoviny. Léčba tedy spočívala v podávání projímadel, která měla snížit hromadění černé žluči v těle.

S příchodem 6. století byla léčba nádorů pomocí „šamanských metod“ nahrazena odstraňováním zasažených tkání. Aetius (527-565) zavedl mastektomii, Paulus z Aeginy (625-690) zase thyroidektomii a polypektomii. Avicenna z Persie představil polypectomii pomocí drátěné kličky, která se každý den utahovala, dokud tumor neodpadl (Hajdu, 2011).

1.2 Klasifikace

Nádory můžeme dělit podle jejich biologického chování, dle tkáňového původu nebo na základě jejich závažnosti a rozsahu.

Podle biologického chování se nádory rozdělují na benigní a maligní. Maligní tumory invadují do okolních tkání a ničí sousední tkáň. Metastazují lymfatickým či krevním systémem do lymfatických uzlin a dalších tkání. Benigní tumory rostou expanzivně, obvykle jsou opouzdřené a nenarušují okolní tkáň. Mohou však být nebezpečné tlakem na nervy či cévy. Benigní tumory nemetastazují a rostou pomaleji než maligní tumory (Ruddon, 2007).

Podle tkáňového původu rozlišujeme nádory epitelové nebo mezenchymové tkáně, dále tumory retikuloendotelové či nervové soustavy, existují i nádory ze smíšených tkání (Franks a Teich, 1997):

- Nádory epitelové tkáně
 - benigní: papilomy, adenomy (ze žlázových tkání)
 - maligní: karcinomy, adenokarcinomy (ze žlázových tkání)

- Nádory mezenchymové tkáně
 - benigní: lipomy (tuková tkáň), fibromy (vazivo), osteomy (kost), angiomy (cévy), myomy (svalová tkáň), chondromy (chrupavka)
 - maligní: sarkomy
- Nádory retikuloendotelového systému
 - maligní: leukémie a lymfomy
- Nádory nervového systému
 - benigní: meningiomy, neurofibromy
 - maligní: neuroblastomy, retinoblastomy, neurofibrosarkomy
- Nádory ze zárodečných tkání
 - benigní: teratomy
 - maligní: teratokarcinomy

V letech 1943-1952 vytvořil Pierre Denoix TNM systém pro klasifikaci maligních tumorů. Klasifikace umožňuje naplánovat odpovídající léčbu, určit prognózu onemocnění, usnadňuje hodnocení léčby a dorozumění jednotlivých léčebných institucí. Posuzuje se velikost primárního tumoru (T), rozsah zasažení lymfatických uzlin (N) a přítomnost vzdálených metastáz (M):

- T kategorie
- TX – primární tumor nelze ohodnotit
 - T0 – bez známek primárního tumoru
 - Ti – karcinom in situ
 - T1-T4 – vzrůstající velikost a/nebo lokální rozsah primárního tumoru
- N kategorie
- NX – regionální mízní uzliny nelze ohodnotit
 - N0 – regionální mízní uzliny bez metastáz
 - N1-N3 – zvětšující se zasažení regionálních mízních uzlin

M kategorie - M0 – bez vzdálených metastáz

- M1 – vzdálené metastázy

Na základě seskupení kategorií T, N a M zařazujeme tumory do jednoho ze stádií (0-IV). Existují dvě základní klasifikace, a to: klinická a patologická – pTNM. Klinická klasifikace je založena na nálezech, které byly získány před léčbou a poskytuje vodítko pro výběr a hodnocení léčby. Patologická klasifikace je založena na nálezech, které byly získány před léčbou, při chirurgickém výkonu a při patologickém vyšetření. Umožňuje vybrat podpůrnou terapii a doplňuje data pro odhad prognózy (Sobin a kol., 2011).

1.2.1 Melanom

Výskyt maligních melanomů u bílé populace neustále stoupá, jednou z nejvíce dotčených zemí je Austrálie. Vznik melanomu bývá způsoben kombinací exogenních a endogenních faktorů. Až 65% maligních melanomů vzniká ve spojitosti se slunečním zářením (Bandarchi a kol., 2010).

Maligní melanomy se obvykle diagnostikují pomocí „ABCD“ pravidla: bývají asymetrické (**A**symetry), nepravidelně ohraničené (**B**order irregularity), barva není stejnoměrná (**C**olor variegation), jsou větší než 6 mm v průměru (**D**iameter) a v průběhu doby se vyvíjí (**E**volving) (Abbasi a kol, 2004).

Vývoj melanomů je charakterizován několika kroky, které zahrnují klinické a histomorfologické změny. Melanom, který na počátku zasahuje pouze do epidermis, postupně proniká do papilární dermis a následně vzniká melanom v tumorogenní či mitogenní fázi. V průběhu tohoto vývoje dochází k přechodu melanomu z růstové fáze radiální do fáze vertikální (Bandarchi a kol., 2010).

1.2.1.1 Klasifikace melanomů

Klasifikujeme tyto typy maligních melanomů:

- povrchově se šířící melanom, který je nejčastější; k jeho vzniku může dojít na jakémkoliv místě, v jakémkoliv věku; léze bývají vícebarevné

- nodulární melanom, který na rozdíl od ostatních typů neroste radiálně
- lentigo maligna melanom, který vzniká několikaletou progresí lentigo maligna; lentigo maligna je ložisko charakterizované atrofií epidermis a postupnou proliferací; tento typ se vyskytuje převážně u starších pacientů
- akrolentiginózní melanom, který postihuje především dlaně, chodidla a kůži pod nehty (černochoů a Japonců)
- desmoplastický melanom, který se vyskytuje ve formě ztvrdlých strupů a mohutného tumoru na hlavě a krku
- smíšená skupina

(Bandarchi a kol., 2010).

1.2.1.2 Melanom B16 F10

Myší melanomová buněčná linie B16 vznikla v roce 1954, tumor vyrostl spontánně v kůži myši C57BL/6J (Teicher, 2011). Linie B16-F10 je odvozená od rodičovské linie B16-F0 desetinásobnou selektivní metodou dle Fidlera (Nakamura a kol., 2002) a je vysoce metastatická (Cillo a kol., 1987). Metastazuje především do plic (Cameron a kol., 2000).

1.3 Teorie vzniku rakoviny

V posledních letech bylo navrženo pět základních modelů kancerogeneze, podle kterých mohou nádory způsobovat:

1. mutace, které jsou vyvolány například radiací, viry nebo různými chemickými látkami
2. dědičnost a nestabilita genomu; tento model je založen na výzkumech výskytu rakoviny v rodinách a podporuje ho například Knudsonova teorie dvou zásahů
3. negenetické příčiny; jedná se o vliv rizikových faktorů (strava, hormony atd.), které nepůsobí na úrovni strukturálních změn DNA, ale především prostřednictvím funkčních změn zahrnujících epigenetické jevy

4. klonální expanze a buněčná selekce; tento model je popisován jako Darwinův a předpokládá, že tumory vznikají selekcí buněk, které získaly nějakou výhodu
5. změna mikroprostředí nebo selhání morfostázy

Jednotlivé modely se samozřejmě překrývají, nejen časově ale i principiálně. Největší důraz je však kladen na první z nich (Vineis a kol, 2010).

1.4 Znaky nádorových buněk

Přes existenci širokého spektra typů nádorových onemocnění můžeme definovat několik znaků, které se vyskytují u většiny nádorových buněk.

Společnou vlastností všech nádorů je jejich nekontrolovatelný růst. Nádorové buňky mají schopnost nejen neustále uvolňovat růstové signály, které stimulují jejich růst, ale i inhibovat systémy, které působí proti buněčné proliferaci. Mnoho těchto systémů je závislých na aktivitě tumor supresorových genů.

Zdravé buňky mají limitovaný počet cyklů buněčného dělení, kterými mohou projít. Naproti tomu nádorové buňky získaly výhodu neomezeného počtu replikací. Za touto schopností stojí telomeráza, která se u zdravých buněk téměř nevyskytuje, zatímco u 90% imortalizovaných buněk (ke kterým nádorové buňky patří) se tato polymeráza nachází. Telomeráza zabraňuje zkracování telomer chránících konce chromozómů, a tím umožňuje nádorovým buňkám replikační nesmrtelnost. K dalším alteracím nádorových buněk patří jejich schopnost odolávat apoptóze.

U nádorů je téměř vždy aktivována angiogeneze. U zdravých tkání dochází k angiogenezi pouze přechodně, například při hojení poranění či během ženského reprodukčního cyklu. Neustálou indukci angiogeneze si nádorové buňky zajišťují dostatek živin a kyslíku a zároveň vylučování metabolitů a oxidu uhličitého. K faktorům, které udržují nádorovou angiogenezi, se řadí například vaskulární endoteliální růstový faktor A (VEGF-A) nebo fibroblastové růstové faktory (FGF). Krevní cévy jsou v případě tumorů odlišné: dochází ke komplikovanému a nadměrnému větvení, cévy jsou následně zvětšené a deformované, tok krve je proměnlivý, vznikají mikrohemoragie, cévy jsou děravé a hladina endoteliální proliferace a apoptozy je abnormální.

K nejnebezpečnějším vlastnostem nádorů řadíme jejich schopnost invaze a metastazování. Nádorové buňky ztrácí E-cadherin a další adhezivní molekuly, které drží buňky pohromadě. To je příčinou lokální invaze, která je následována intravazací do blízkých krevních či lymfatických tkání. Po průchodu lymfatickým a hematogenním systémem buňky unikají do parenchymu vzdálených tkání – extravazace.

Nádorové buňky mají též odlišný energetický metabolismus, probíhá u nich tzv. aerobní glykolýza. Zdravé buňky produkují většinu ATP oxidativní fosforylací, zatímco buňky nádorové využívají při tvorbě energie glykolýzu, která je ovšem méně efektivní (Hanahan a Weinberg, 2011).

1.5 Terapie nádorových onemocnění

Chirurgická terapie

Chirurgická terapie je nejstarší a zároveň nejefektivnější způsob léčby nádorových onemocnění. Využívá se nejen pro odstranění primárního nádoru, ale i při určování diagnózy a stádia onemocnění, dále při chemoterapii a radiační terapii pro zavádění portů, katetrů či pump (Ko a kol., 2008).

Chemoterapie

Podstatou většiny chemoterapeutik je zásah do buněčné proliferace. Proto velkou nevýhodou chemoterapie je její působení i na zdravé buňky, především na rychle se dělící. Inhibice buněčné proliferace může probíhat na několika úrovních: syntéza a funkce makromolekul, organizace cytoplazmy a přenos signálu, membrána buňky nebo syntéza, exprese a funkce buněčných povrchových receptorů, případně prostředí rakovinného růstu (Skeel a Khleif, 2011).

Radioterapie

Jako první využil metodu radioterapie pro léčbu rakoviny prsu Emil H. Grubbe v roce 1895 (Vujošević a Bokorov, 2010). Radioterapie je založena na působení fotonů (gamma záření a X-paprsků) a nabitých částic (elektronů) na nádorovou tkáň. Existují též modifikace pracující s neutrony či protony. Mechanismus terapie je založen na přímém

účinku záření, kdy dochází k poškození DNA; ale i na nepřímém účinku, tedy tvorbě radikálů (Vokes a Golomb, 2003).

Fotodynamická terapie

Fotodynamická terapie je založena na využití léčiv, která jsou aktivována světlem. Metoda využívá působení singletového kyslíku ($^1\text{O}_2$), který vzniká díky energetickým změnám fotosenzitivních molekul. Excitované molekuly mohou též emitovat fluorescenční světlo, toho je možné využít pro detekci a lokalizaci tumorů (Wilson, 2002).

Hormonální terapie

Hormonální terapie je využívána především pro léčbu rakoviny prsu a prostaty. Dále pak pro tumory spojené s nadměrnou produkcí hormonů (např. adenomy hypofýzy) (Minev, 2011). Pro léčbu se využívají antiestrogeny, antiandrogeny, inhibitory aromatázy nebo agonisté hormonu uvolňujícího luteinizační hormon (Jordan a Furr, 2009).

1.5.1 Imunoterapie

Metody využívané v imunoterapii nádorů indukují protinádorovou imunitu nebo využívají imunitní mechanismy za účelem cíleného transportu léčiv do nádoru. V současné době se většina metod založených na imunoterapii nachází zatím ve stádiu klinických testů.

1.5.1.1 Imunoterapie založená na použití protilátek

Protilátky mohou aktivovat komplement, indukovat ADCC, opsonizovat buňky nebo být nosiči léčiv a toxinů. Využívají se především monoklonální protilátky proti nádorovým antigenům a bispecifické protilátky.

Monoklonální protilátky proti nádorovým antigenům jsou například podstatou preparátů Herceptin, Mabthera nebo Mylotarg. Využívány jsou i konjugáty monoklonálních protilátek s toxiny nebo radioizotopy. Monoklonální protilátky proti nádorovému antigenu se dále používají k odstranění nádorových buněk ze suspenze buněk kostní dřeně, která byla pacientovi odebrána za účelem autologní transplantace. K nevýhodám použití monoklonálních protilátek se řadí selekce rezistentních nádorových buněk a riziko poškození normální tkáň.

Uměle vytvořené bispecifické protilátky disponují dvěma vazebnými místy. Jedna antigenní specifita je namířena proti nádorovému antigenu, zatímco druhá reaguje s molekulou na povrchu imunokompetentních buněk (T lymfocyty nebo NK buňky). Dále mohou být aktivovány fagocyty či NK buňky, a to reakcí Fc části protilátky s Fc receptory těchto buněk (Hořejší a Bartůňková, 2009).

1.5.1.2 Imunoterapie pomocí mechanismů zprostředkovaných buňkami

U těchto metod je velmi častý postup, kdy jsou požadované buňky odebrány pacientovi, *in vitro* stimulovány či pozměněny a následně vráceny do oběhu pacienta. Takto jsou například získány LAK (lymphokine activated killers) buňky, které mohou potlačit růst nádoru. Přípravují se stimulací T a NK buněk cytokiny (IL-2).

Dále se pomocí stimulace cytokiny z lymfocytů, které infiltrovaly do nádoru, připravují TIL (tumor infiltrating lymphocytes) buňky. Takto připravené buňky by měly vykazovat nádorovou specifitu.

Ve fázi zkoušek je terapie dendritickými buňkami, které jsou připravovány působením cytokinů (GM-CSF, IL-4) na periferní monocyty. Dendritické buňky se po kultivaci s nádorovými antigeny injikují pacientovi, kde stimulují T lymfocyty.

Při použití nádorových vakcín se stimulují Tc a Th1 lymfocyty pomocí synteticky připravených peptidů, které jsou rozeznávány nádorově specifickými T lymfocyty.

In vitro mohou být modifikovány také nádorové buňky. Jednou možností je fúze nádorových buněk s antigen-prezentujícími buňkami. Vzniká hybrid, který prezentuje nádorové antigeny T lymfocytům a stimuluje je. Nádorové buňky mohou být dále geneticky modifikovány, po změně například exprimují CD80 nebo CD86, mohou také produkovat cytokiny (IL-2, GM-CSF). Buňky se před vrácením do organismu ošetří tak, aby se nemohly dělit. Pozměněné buňky je možné též kultivovat s T lymfocyty pacienta, čímž se stimulují nádorově specifické klony.

Buněčné mechanismy imunity mohou být také zesíleny aplikací rekombinantních cytokinů. Za tímto účelem jsou využívány interleukiny (IL-2), interferony (IFN- α , IFN- γ) a kolonie stimulující faktory (GM-CSF).

Imunitní reakce proti nádoru může být vyvolána také nespecificky indukci zánětu v místě nádoru. Toho může být docíleno aplikací mykobakteriální vakcíny. Například u karcinomu močového měchýře.

Efektivní terapii některých leukemií může být alogenní transplantace kostní dřeně a infuze lymfocytů dárce, která zesiluje protinádorovou imunitu (Hořejší a Bartůňková, 2009).

1.5.1.3 Problémy imunoterapie

Nádorové buňky se imunitnímu ataku mohou vyhnout pomocí mnoha mechanismů imunosuprese. Mohou například snižovat expresi MHC molekul I. třídy, kostimulačních molekul (CD80 a CD86) nebo nádorových antigenů. Buňky mohou antigen dokonce ztratit v důsledku značné variability, antigeny mohou být dále maskovány sialylací povrchu buněk. Některé nádorové buňky na svém povrchu exprimují molekulu FasL, pomocí níž jsou schopné vyvolat v protinádorových T-lymfocytech apoptózu. Nádory mohou také uvolňovat imunosupresivní molekuly: např. adenosin, prostaglandin E2, TGF- β nebo VEGF-A. Ty mohou zesilovat funkci Treg buněk. Ty vznikají, pokud je antigen prezentován dendritickými buňkami, které nedozrály. Takové buňky brání protinádorové odpovědi. Imunosupresivní molekuly dále mohou potlačovat aktivaci T-lymfocytů, zabraňovat průniku T-lymfocytů do nádorů nebo suprimovat dendritické buňky (Mellman a kol., 2011; Hořejší a Bartůňková, 2009).

1.6 Imunitní systém a rakovina

Imunitní systém se skládá z širokého spektra buněk, rozpustných molekul a tkání, které jsou rozmístěny po celém těle. Jeho hlavní funkcí je ničení látek, které jsou pro tělo cizí. Bývá rozdělován do dvou hlavních kategorií: imunita vrozená a získaná. Oba systémy jsou však navzájem funkčně propojené.

Vrozená imunita je nespecifická - buňky neexprimují receptory specifické pro konkrétní antigeny. Zahrnuje anatomickou, buněčnou a látkovou obranu, která se účastní časně imunitní odpovědi. Buňky vrozené imunity nedisponují imunologickou pamětí. Vrozená imunita se brání pomocí anatomických bariér (mukus, kůže, řasinky), rezidentní flóry (především nepatogenní bakterie), humorálních faktorů (proteiny komplementu,

lactoferrin, lysozym, pepsin, acidita žaludku) a buněk (antigen prezentující buňky, bazofily, eozinofily, žírné buňky, NK buňky, fagocyty). Proteiny sekretované buňkami vrozené imunity hrají důležitou roli v dalším vývoji získané imunity.

Získaná imunita je vývojově mladší než vrozená, bývá označována jako specifická a má imunologickou paměť. Buněčnou složku tvoří T a B lymfocyty. Humorální složka je pak tvořena protilátkami, sekretovanými plazmatickými buňkami, které vznikají diferenciací B lymfocytů. Další složkou humorální imunity jsou cytokiny produkované Th lymfocyty (Stanley, 2002).

1.6.1 Vrozená imunita v boji proti nádorům

Ze studie, kterou provedl Cui na myších nesoucích mutaci SR/CR, vyplývá, že nádorové buňky mohou být likvidovány vrozenou imunitou. U těchto myší dochází po injikování širokého spektra nádorových buněk k mohutné infiltraci leukocytů do tumoru. Nádor je likvidován makrofágy, polymorfonukleáry a NK buňkami (Hicks a kol., 2006).

Buňky vrozené imunity mohou být aktivovány mikrobiálními molekulami zvanými PAMPs (pathogen-associated molecular patterns). Ty upozorňují organismus na vstup mikroorganismů. I přes svůj název se nevyskytují pouze u patogenů, ale u všech mikroorganismů. PAMPs jsou rozpoznávány receptory buněk vrozené imunity, zvanými pattern recognition receptors (PRRs), zejména toll-like receptory. Výsledkem je aktivace imunitního systému a následné zničení patogenu nebo jím infikovaných buněk. V těchto likvidačních procesech hrají důležitou úlohu rovněž další PRRs, a to fagocytární receptory. K nejznámějším PAMPs rozpoznávaným toll-like receptory (TLR) patří lipopolysacharid gramnegativních bakterií a peptidoglykan grampozitivních bakterií, k nejdůležitějším agonistům fagocytárních receptorů patří terminální manoza, beta glukan a formylmethioninové deriváty (Bianchi, 2007; Medzhitov a Janeway, 2002).

U lidí bylo doposud identifikováno deset toll-like receptorů (Tab.1). Lidské TLR se na základě lokalizace na chromosomu, struktury genu a aminokyselinových sekvencí rozčleňují do pěti skupin: TLR2 (skupina se skládá z TLR1, TLR2, TLR6 a TLR10), TLR3, TLR4, TLR5, TLR9 (skupina se skládá z TLR7, TLR8 a TLR9). TLR 10 je posledním objeveným lidským toll-like receptorem (Sandor a Buc, 2005).

Tab. 1: Seznam lidských toll-like receptorů a jejich ligandů (Takeuchi a Akira, 2010).

PRRs	Localization	Ligand	Origin of the Ligand
TLR			
TLR1	Plasma membrane	Triacyl lipoprotein	Bacteria
TLR2	Plasma membrane	Lipoprotein	Bacteria, viruses, parasites, self
TLR3	Endolysosome	dsRNA	Virus
TLR4	Plasma membrane	LPS	Bacteria, viruses, self
TLR5	Plasma membrane	Flagellin	Bacteria
TLR6	Plasma membrane	Diacyl lipoprotein	Bacteria, viruses
TLR7 (human TLR8)	Endolysosome	ssRNA	Virus, bacteria, self
TLR9	Endolysosome	CpG-DNA	Virus, bacteria, protozoa, self
TLR10	Endolysosome	Unknown	Unknown
TLR11	Plasma membrane	Profilin-like molecule	Protozoa

TLR se vyskytují i u nádorových buněk (Tab. 2). Tohoto jevu může být využito jak pro diagnostiku tumorů, tak pro jejich terapii. Kombinací TLR agonisty či antagonisty spolu s antigenem izolovaným z tumoru může být vyvolána vrozená imunitní odpověď proti nádoru. Bylo ovšem také zjištěno, že nadměrná exprese TLR u nádorových buněk může podporovat nádorový růst (So a Ouchi, 2010).

Tab. 2: Exprese toll-like receptorů na nádorových buňkách (So a Ouchi, 2010).

TLRs	Natural Ligand-origin	Expressing cancer cells and tissues
TLR1	Triacyl Lipopeptides-Bacteria Soluble factor- <i>Neisseria meningitidis</i>	Colon cancer
TLR2	Lipoprotein-various pathogens Peptidoglycan-Gram+bacteria Lipoteichoic acid-Gram+bacteria Zymosan-Fungi Heat-shock protein 70-host	Colon cancer Gastric cancer Hepatocellular carcinoma
TLR3	Double stand RNA-Virus	Breast cancer Colon cancer Melanoma Hepatocellular carcinoma
TLR4	Lipopolysaccharide-Gram negative bacteria Envelope protein-MMTV Oligosaccharides of hyaluronic acid-Host Heat-shock protein 60/70-Host	Breast cancer Colon cancer Melanoma Gastric cancer Lung cancer Hepatocellular carcinoma Ovarian cancer
TLR5	Flagellin-Bacteria	Gastric cancer Cervical squamous cell carcinomas
TLR6	Diacyl lipoproteins-mycoplasma	Hepatocellular carcinoma
TLR7	Single-strand RNA-virus	Chronic lymphocytic leukemia
TLR8	Single-strand RNA-virus	
TLR9	CpG-containing DNA-Bacteria and virus	Breast cancer Gastric cancer Hepatocellular carcinoma Cervical squamous cell carcinomas Glioma Prostate cancer

Z již zmíněné studie prof. Cui vyplývá, že pokud jsou nádorové buňky rozeznány buňkami vrozené imunity, mohou jimi být také likvidovány. Schopnost rozeznat nádorové

buňky měly buňky vrozené imunity u zkoumaných myší díky SR/CR mutaci (Hicks a kol., 2006). Běžné buňky tuto schopnost nemají. Proto je třeba instalovat agonisty PRRs (TLR resp. fagocytárních receptorů) na nádorové buňky uměle. Následující kapitoly rozebírají možnosti kotvení agonistů PRRs.

1.6.2 Ukotvení PAMPs na nádorové buňky

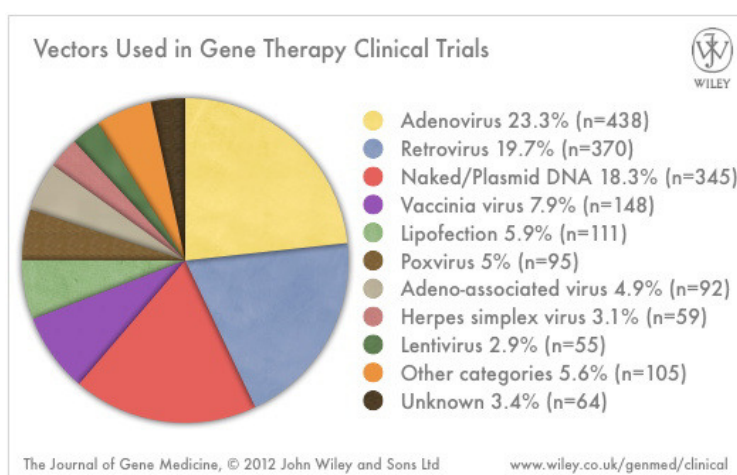
Buněčný povrch může být pozměněn především dvěma přístupy: chemicky nebo přenosem genů transfekcí či transdukci. Na buňku je možné vázat různé látky pomocí kovalentní vazby, případně na základě elektrostatických nebo hydrofobních interakcí. Poslední ze zmíněných interakcí využívá například biokompatibilní kotva pro membrány (BAM). Mnohé z těchto přístupů mají ale své nevýhody. Kovalentní vazba může narušit funkci membránových proteinů, většina kationických polymerů je cytotoxická (Teramura a Iwata, 2010; Kato a kol., 2004).

Další možností je pomocí transdukce vnést do nádorových buněk gen kódující přímo agonistu TLR. Tím může být například flagellin. Tosch a kol. (2008) pomocí adenovirového vektoru přenesli do nádorových buněk A549 gen pro flagellin z *Listerie monocytogenes* a také protein P40 z *Klebsielly pneumoniae*. Tato transformace vyvolala zrání dendritických buněk. Ve smíšené lymfocytární reakci transdukce vektorů nesoucích geny pro flagellin a protein P40 stimulovala proliferaci lymfocytů a sekreci IFN- γ . Dále byla provedena in vivo aplikace. Adenovirové vektory nesoucí tyto PAMPs byly podány intratumorálně myším s podkožními melanomy nesoucími cocksackie-adenovirový receptor (B16F0-CAR). Vektor nesoucí protein P40 dočasně inhiboval progresi nádoru.

Tato diplomová práce se zabývá další možností, a to pomocí transdukce vnést do nádorových buněk gen kódující avidin, který by mohl vázat biotinylované agonisty PRRs. Walker a kol. (1996) dosáhli přechodné exprese avidinu na dvou lidských nádorových buněčných liniích (HeLa a Hep G2), které transfekovali pomocí kationických lipidů. Dále pomocí retroviru kódujícího avidin dosáhli trvalé exprese avidinu na buňkách linie C/16. Přechodně i trvale exprimovaný avidin byl schopen vázat radioaktivně značený biotin.

1.6.2.1 Přenos genů pomocí virových vektorů

Přenos genetické informace do buněk je přirozenou vlastností virů, zajišťuje jejich množení. Aplikace virových vektorů je však komplikována jejich cytotoxickými, imunogenními a biohazardními vlastnostmi. Na druhou stranu oproti nevirovým metodám poskytují virové vektory vyšší účinnost a stabilitu exprese přeneseného genu. Tato vlastnost je založena na schopnosti virů obalit geny do těsného komplexu, který rozpozná specifická místa na povrchu cílových buněk a připojuje se na ně. Tímto způsobem je genetická informace při vstupu do buněk chráněna před buněčnými degradačními procesy (Friedmann a Rossi, 2007). K nejpoužívanějším vektorům v genové terapii patří podle statistik klinických zkoušek adenoviry a retroviry (Obr. 1).



Obr. 1: Nejčastěji používané vektory v genové terapii (www.wiley.com, 9. 12. 2012).

1.6.2.1.1 Přehled nejčastěji využívaných virových vektorů

Adenoviry jsou neobalené viry, jejichž velikost je 70-90 nm. Obsahují lineární molekulu dvoušroubovicové DNA, velikost genomu se pohybuje v rozmezí 26-48 kbp (King, 2012). Vysoká transdukční účinnost dělicích i nedělicích se buněk patří k přednostem adenovirových vektorů, stejně jako schopnost produkovat až 104 virových částic na infikovanou buňku. Vektory mohou nést velké geny – až do velikosti svého vlastního genomu. Jejich DNA polymeráza je velmi přesná, což zajišťuje poměrnou stabilitu genomu. Adenovirové genomy se neintegrují do hostitelské DNA, riziko inzerční mutagenese je tedy

minimální. Nevýhodou těchto vektorů je jejich schopnost vyvolat silnou imunitní odpověď (Khare a kol., 2011).

Retroviry jsou obalené viry, jejichž velikost je 80-100 nm. Jedná se o ssRNA viry, které obsahují reverzní transkriptázu, velikost jejich genomu je 7-13 kb (King, 2012). Retroviry mají schopnost stabilně inkorporovat svou DNA do hostitelského chromosomu, tato vlastnost přináší určité výhody, ale i problémy. Inkorporace přenášeného genu zajišťuje jeho dlouhotrvající expresi. Nespecifická inkorporace do hostitelského genomu ale může narušit hostitelský gen v místě inkorporace nebo způsobit abnormální expresi blízkých hostitelských genů. Dalším rizikem těchto vektorů je možnost vyvolat vznik retroviru schopného replikace (Yi a kol., 2011).

Lentiviry, které patří do skupiny Retroviridae, mají podobné vlastnosti jako retroviry – integrují virový genom do hostitelského genomu. Na rozdíl od retrovirů ale lentiviry infikují úspěšně i nedělící se buňky. Většina lentivirových vektorů je založena na viru lidské imunodeficiency (Yi a kol., 2011).

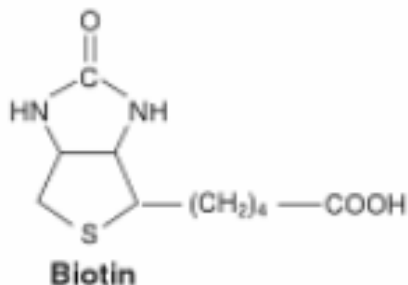
Adeno-asociované virové vektory patří do skupiny Parvoviridae. Jedná se o skupinu neobalených virů s velikostí 21-26 nm. Parvoviridae mají genom ve formě ssDNA o velikosti 4-6,3 kb (King, 2012). K přednostem adeno-asociovaných virových vektorů řadíme jejich schopnost infikovat dělicí i nedělící se buňky a trvalou expresi přenášených genů. Vektory nevykazují zřejmou cytotoxicitu. Využití různých serotypů umožňuje infikovat širokou řadu tkání. Adeno-asociované virové vektory se integrují do míst, která neobsahují transkribované geny a nenacházejí se ani blízko onkogenů, riziko onkogeneze je tudíž zanedbatelné (Daya a Berns, 2008). Většina těchto vektorů se integruje do specifického místa na chromosomu 19, které umožňuje latentní infekci (Kotin a kol., 1990).

1.6.2.2 Systém avidin-biotin

Jedním z hlavních cílů této práce byla exprese avidinu na nádorových buňkách a následná vazba avidinu s biotinem. Pomocí této modifikace bychom na buňky mohli vázat biotinylované agonisty PRRs.

Biotin (Obr. 2) je ve vodě rozpustný vitamín. Je koenzymem pěti (lidských) karboxyláz (acetyl-CoA karboxyláza 1 a 2, pyruvát karboxyláza, propionyl-CoA karboxyláza a 3-methylcrotonyl-CoA karboxyláza), které katalyzují klíčové kroky

v metabolismu mastných kyselin, glukózy a aminokyselin. K jeho dalším funkcím patří regulace genové exprese. Ta probíhá na základě biotinylyzace lyzinových zbytků v histonech H2A, H3 a H4 nebo na post-transkripční úrovni (Erdman a kol., 2012).



Obr. 2: Struktura biotinu (Erdman a kol., 2012).

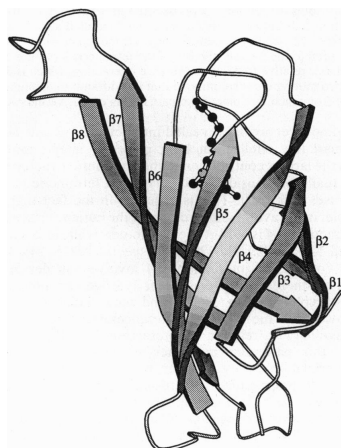
Avidin je homotetramerický protein (Obr. 3), který tvoří maximálně 0,05% celkových proteinů ve vaječném bílku (Zerega a kol., 2001).



Obr. 3: Kvarterní struktura avidinu (Wilchek a kol., 2006).

Každý monomer (Obr. 4) obsahuje 128 aminokyselinových zbytků, molekulová váha avidinu je asi 67 kDa. Jeho biologická funkce není známa, ale pro jeho vysokou afinitu

k biotinu se předpokládá, že slouží jako obranný protein proti mikroorganismům závislým na biotinu (Huopalahti a kol., 2007). Další předpokládanou funkcí avidinu je regulace buněčné proliferace myoblastů a chondrocytů během buněčné diference (Zerega a kol., 2001).



Obr. 4: Struktura avidin-biotin monomeru: 8 antiparalelních β -vláken, které tvoří β -barel (Livnah a kol., 1993).

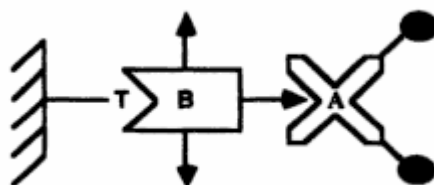
Biotin má stejně silnou afinitu také ke streptavidinu, který je bakteriálního původu. Pochází ze *Streptomyces avidinii*. Oproti avidinu vykazuje méně častou nespecifickou vazbu a má tudíž větší senzitivitu (Deshpande, 1996).

System avidin-biotin má několik předností (Deshpande, 1996):

- Avidin má na každé své molekule 4 vazebná místa pro biotin, což umožňuje amplifikaci signálu.
- Biotin má obrovskou afinitu pro (strept)avidin. Disociační konstanta této vazby je 10^{-15} l/mol.
- Biotin má velmi malou molekulovou váhu (244 Da) a ve většině případů nemění funkci molekul, na které se váže.
- Biotin navázaný na molekuly s nízkou či vysokou molekulovou váhou může být stále rozpoznán avidinem.
- Vazba vzniká velmi rychle.
- Komponenty systému avidin-biotin jsou komerčně dostupné.

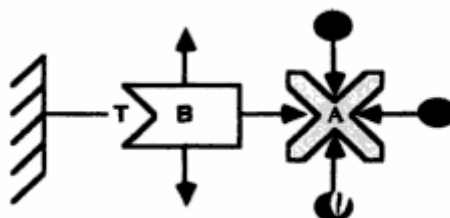
Techniky využívající systém avidin-biotin bychom mohli rozdělit do dvou základních kategorií: detekční a afinitní metody. Detekční techniky bývají založeny na některé ze tří konfigurací:

- Avidin je značen detekovatelnou molekulou (př. enzymem, fluorescenční sondou, ...). Biotinylovaná protilátka poté váže cílovou molekulu nebo antigen ke značenému avidinu (Obr. 5). Tato technika je využívána především pro imunologické testy.



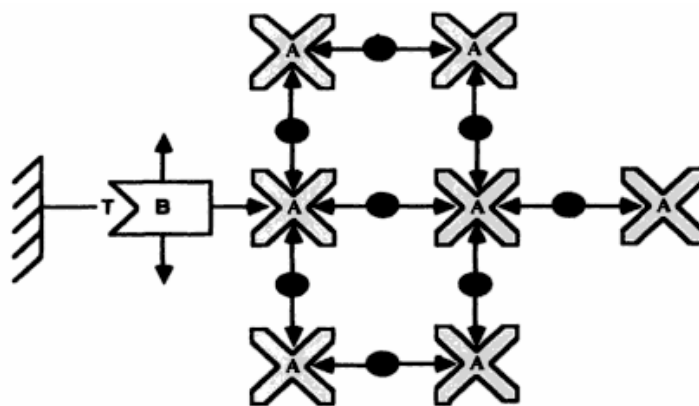
Obr. 5: Konfigurace detekční techniky založená na systému avidin-biotin; T-cílová molekula, A-avidin, B-binder (Deshpande, 1996).

- Neznačený avidin slouží jako spoj mezi dvěma nebo více molekulami konjugovanými s biotinem (Obr. 6). Tato technika je rovněž využívána hlavně pro imunologické testy.



Obr. 6: Konfigurace detekční techniky založená na systému avidin-biotin; T-cílová molekula, A-avidin, B-binder (Deshpande, 1996).

- Třetí konfigurace je kombinací dvou předchozích. Jelikož avidin má čtyři vazebná místa pro biotin, může tak tvořit spoj mezi dvěma a více konjugáty s biotinem (Obr. 7). Tato technika je vysoce citlivá (Deshpande, 1996).



Obr. 7: Konfigurace detekční techniky založená na systému avidin-biotin; T-cílová molekula, A-avidin, B-binder (Deshpande, 1996).

K příkladům využití tohoto systému se řadí například detekce molekul (Li a kol., 2012; Morpurgo a kol., 2012), značení buněčných komponent (Heitzmann a Richards, 1974; Heggeness a Ash, 1977), detekce vazby protilátka-antigen (Warnke a Levy, 1980) nebo lokalizace antigenů (Hsu a kol., 1981).

Druhou kategorií metod založených na principu avidin-biotin tvoří afinitní systémy. K prvním aplikacím tohoto systému patřily především izolační metody využívající afinitní chromatografii (Bodanszky a Bodanszky, 1970). Systém avidin-biotin lze rovněž využít pro purifikaci látek (Magro a kol., 2012; Kurien a Scofield, 2012) nebo cílenou radioimunoterapii (Grana a kol., 2012). Dále k selekci buněk (Davis a kol., 1994), cílenému transportu látek (Soininen a kol., 2012; Murugan a kol., 2012; Lesch a kol., 2009), cílenému přenosu buněk do tkání (Nucera a kol., 2012), izolaci látek (Singh a Natarajan, 1987; Kim a Kato, 1994) nebo k uchycení molekul na různé povrchy (např. imobilizaci protilátek) (Orelma a kol., 2012). Systém avidin-biotin umožňuje např. i inaktivaci bakteriofágů (Becker a Wilchek, 1972).

V posledních letech byly pomocí genetického inženýrství vytvořeny modifikace streptavidinu a avidinu, které přinášejí nové možnosti aplikace a lepší vlastnosti tohoto systému. Tímto způsobem byly upraveny strukturní a farmakokinetické vlastnosti, vazebná afinita a specifita (Laitinen a kol., 2007).

Výhod systému avidin biotin bylo využito i v aplikacích týkajících se studia rakoviny. Kalophonos a kol. (1990) představili metodu lokalizace nádorů pomocí monoklonálních protilátek konjugovaných se streptavidinem, který následně vázal biotin značený ^{111}In . Podobnou metodu lokalizace zavedli Paganelli a kol. (1991). Sestávala z aplikace biotinylované protilátky, následované avidinem, v posledním kroku byl přidán derivát biotinu značený ^{111}In .

2. Cíle práce

- Pomocí virového vektoru nesoucího gen pro avidin infikovat melanomové buňky B16-F10. Po ověření exprese avidinu vázat biotinylované ligandy PRR.
- Optimalizovat systém pro detekci vazby BAM (Biocompatible Anchor for cell Membrane) a DOPE (N-(Succinimidyloxy-glutaryl)-L- α -phosphatidylethanolamine, Dioleyl) na nádorové buňky a určit množství těchto látek navázaných na buňky.

3. Materiál a metodika práce

3.1 Chemikálie

- RPMI 1640 (Sigma-Aldrich)
- DMEM (Sigma-Aldrich)
- Fetal Calf Serum (FCS) (Sigma-Aldrich)
- poly-L-lysin (Sigma-Aldrich)
- Trypsin EDTA (0,02 % trypsin a 0,02% EDTA v PBS)
- BAM – MW= 4000 (Biocompatible Anchor for cell Membrane) (NOF EUROPE, Belgie)
- DOPE (N-(Succinimidylxy-glutaryl)-L- α -phosphatidylethanolamine, Dioleyl) (NOF EUROPE, Belgie)
- Biotin (Sigma-Aldrich)
- Bovinní sérový albumin (Sigma-Aldrich)
- Bovinní hemoglobin (Sigma-Aldrich)
- Protilátka proti biotinu značená TRITC (Abcam)
- Protilátka proti biotinu značená Texas Red (Genetex)
- B-Phycoerythrin (AnaSpec)
- QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN)
- Puromycin (Sigma-Aldrich)

3.2 Přístroje

- mikroskop Olympus IX70; laser U-RFL-T; excitační filtry: WG (460-490 nm) a WB (510-550 nm)
- centrifugy - NF400R (rotor SC415)
 - Universal 32R (rotor S0052)
 - Optima XL-100K Ultracentrifuge (Beckman) – výkyvný rotor SV28
- spektrofotometry - Pye Unicam Sp 1800

- Absorbance Microplate Reader ELx800TM (BioTek)

- Infinite M200 (Tecan)

- FACS LSRII (Becton Dickinson)

3.3 Buněčné linie

3.3.1 Buněčná melanomová linie B16-F10

V experimentech byla používána buněčná linie myšního melanomu B16-F10 (dar od prof. Říhové, Mikrobiologický ústav AVČR Praha).

Buňky byly kultivovány v médiu RPMI 1640 s 10% bovinním fetálním sérem, antibiotiky, glutaminem a merkaptoetanolem v termostatu při teplotě 37°C v atmosféře nasycené vodními parami a obsahující 5% CO₂.

3.3.2 Pakážovací buňky GP 293 (linie z embryonální lidské ledviny)

Při přípravě virového vektoru byly používány pakážovací buňky GP 293 (Ústav molekulární genetiky AVČR Praha).

Buňky byly kultivovány v médiu DMEM s 10% bovinním fetálním sérem, antibiotiky a glutaminem (pH 7,2). Kultivace probíhala v termostatu při teplotě 37°C v atmosféře nasycené vodními parami a obsahující 5% CO₂. Jelikož buňky GP 293 špatně adherují, byly misky pro kultivaci pokryty roztokem poly-L-lysinu (0,1mg / ml destilované vody), poté byl roztok odsán a misky nechány oschnout.

3.4 Bakterie (E. coli – kmen STBL) s plazmidy

Bakterie s plazmidy byly poskytnuty Ústavem molekulární genetiky AVČR.

Plazmidy pro první konstrukt:

- pAspATIG2 - kóduje gen pro GFP a fúzní protein: avidin + transmembránový protein butyrophilin
- pVSV-G - kóduje obalový protein: G-protein viru vezikulární stomatitidy

Plazmidy pro druhý konstrukt:

- pCAspATIG - kóduje gen pro GFP a fúzní protein: avidin + transmembránový protein butyrophilin
- PMD2.G - kóduje obalový protein VSV
- psPAX2 – kóduje ostatní proteiny HIV (gag, pol, rev)

Metody

3.5 Izolace DNA

Bakterie s plazmidy byly kultivovány v LB médiu s ampicilinem (100 µg/ml média) přes noc při 37°C na třepačce. Následovala centrifugace kultury (6000 g). Pelet byl použit pro izolaci DNA. Ta probíhala pomocí kitu QIAGEN Plasmid Midi Kit. Koncentrace vyizolované DNA byla zjištěna na spektrofotometru.

3.6 Příprava virového vektoru

3.6.1 Transfekce pakážovacích buněk

Den před transfekcí byly nasazeny pakážovací buňky GP 293 (10^7 buněk / 15 cm misku). Druhý den byla provedena transfekce těchto buněk kalcium-fosfát precipitační metodou. Dle následujícího schématu byly připraveny a důkladně promíchány roztoky A a B:

Roztok A: 2,25 ml HBS + 45 µl PO_4

Roztok B: 270 µl 2M CaCl_2 + 60 µg DNA (pVSV-G a pAspATIG2 v poměru 1:5) + 2,1 ml H_2O

HBS = Hepes (10 g/l), NaCl (16 g/l); pH 7.0

PO_4 = 70 mM Na_2HPO_4 , 70 mM NaH_2PO_4

Za neustálého třepání se zkumavkou byl do roztoku A po kapkách přidáván roztok B. Vzniklá směs byla opatrně přidána na buňky s médiem. Po 4 hodinách bylo z buněk odstraněno médium, byl přidán předehřátý 15% roztok glycerolu v HBS, po 1 minutě byl odsán a buňky byly následně opláchnuty roztokem PBS. Nakonec bylo opět doplněno samotné médium. Druhý den po transfekci byl k médiu přidán 25% roztok glukózy tak, aby tvořil 1/15 objemu média.

3.6.2 Sbíráání média

Médium s virovým vektorem bylo sbíráno druhý den po transfekci, třetí den (ráno i večer) a čtvrtý den. Jednotlivé alikvoty byly okamžitě zamrazeny (-80°C). Po posledním sběru byly všechny alikvoty rozmrazeny a ultracentrifugací zakoncentrovány.

Před ultracentrifugací bylo médium s virovým vektorem stočeno na centrifuze kvůli odstranění zbytků buněk. Ultracentrifugace probíhala 2,5 h při 4°C a rychlosti 80 tis. G (výkyvný rotor SV28, 23 tis. ot./min.). K peletu bylo přidáno 400 μl média a 40 μl 25% roztoku glukózy, vzorek byl 2 hodiny protřepáván na třepačce a poté ponechán 12 hodin ve 4°C . Nakonec bylo přidáno médium, vzorek byl rozsuspendován a zamražen (-80°C).

3.6.3 Titrace

Na 6-jamkovou desku byly vysety buňky ptačí buněčné linie DF-1 ($1.8 \cdot 10^5$ buněk / jamku). Za 2 hodiny byla provedena infekce: nejprve bylo odsáto médium, poté napipetována virová suspenze v 200 μl média na jamku. Pomocí ředící řady byly vždy v duplikátech připraveny jamky s 50 μl , 5 μl a 0,5 μl virové suspenze. Dva dny po infekci byly buňky změřeny na FACS. Podle procentuálního zastoupení GFP pozitivních buněk byl dopočítán titr viru.

3.7 Infekce melanomových buněk B16-F10

Melanomové buňky byly nasazeny na 96-jamkovou desku (10^4 buněk / jamku). Po 4 hodinách, kdy byly buňky dostatečně adheované, bylo odsáno médium. K buňkám byla přidána virová suspenze (20 μl / jamku) a polybren tak, aby výsledná koncentrace byla 20 μg polybrenu / ml virové suspenze. Buňky byly inkubovány 30 minut při pokojové teplotě.

Následně bylo přidáno médium tak, aby výsledná koncentrace polybrenu činila 4 μg / ml média.

3.8 Vazba s biotinem a značení protilátkou

2 dny po infekci byly buňky B16-F10 3x omyty PBS. Poté probíhala inkubace s biotinem a protilátkou proti biotinu značenou Texas Red. Na jamku bylo postupně nanášeno 50 μl roztok biotinu (0,2 mg biotinu / ml PBS) a 50 μl protilátky ředěné 1/100. Vazba s biotinem i protilátkou probíhala vždy 30 minut.

Kontroly byly provedeny dle následujícího schématu:

- neznačené infikované buňky
- infikované buňky s navázaným biotinem
- infikované buňky s navázaným biotinem, značené protilátkou proti biotinu
- infikované buňky značené protilátkou proti biotinu
- neznačené neinfikované buňky
- neinfikované buňky s navázaným biotinem
- neinfikované buňky s navázaným biotinem, značené protilátkou proti biotinu
- neinfikované buňky značené protilátkou proti biotinu

Mezi jednotlivými inkubacemi a po konečném značení byly vždy buňky 3x opláchnuty PBS. Značení probíhalo na ledu a za minimálního osvětlení, aby nedocházelo k fotodestrukcí značky na protilátce.

3.8.1 Optimalizace detekce vázaného biotinu

Z důvodu neúspěšné detekce biotinu byly provedeny následující modifikace:

- 1) Navázaný biotin byl dále detekován pomocí protilátky proti biotinu značené TRITC.
- 2) Detekce probíhala také na fixovaných buňkách. Buňky byly fixovány a permeabilizovány působením ethanolu (10 minut).

3.9 Mikroskopické ověření vazby biotinu

Vyhodnocení značených buněk probíhalo v Laboratoři veterinární a medicínské protistologie na mikroskopu Olympus IX70. Excitace byla provedena za pomoci laseru R-RFL-T a těchto filtrů: WG (460-490 nm) pro detekci GFP a WB (510-550 nm) pro detekci Texas Red nebo TRITC.

3.10 Virový vektor odvozený od lentiviru

Po neúspěšném pokusu s prvním virem připravil dr. Šenigl (ÚMG Praha) virový vektor odvozený od lentiviru. Tento virus nenesl gen pro GFP, ale měl expresní kazetu pro puromycinovou rezistenci. Bylo tedy třeba vyzkoušet citlivost buněk B16-F10 na puromycin. Buňky byly nasazeny na 6-jamkovou desku v cca 70% konfluenci a byl přidán puromycin tak, aby výsledná koncentrace odpovídala 1 μg , 2 μg nebo 4 μg / ml média (dvě jamky pro každou koncentraci). Citlivost buněk byla odečítána druhý a třetí den.

Jelikož buňky vykazovaly citlivost k puromycinu, bylo možné přejít k ověření vazby biotinu na exprimovaný avidin. Buňky byly infikovány virovým vektorem a po dvou dnech byl přidán puromycin (2 μg / ml média), tímto způsobem byla provedena selekce infikovaných buněk. Vazba a detekce biotinu probíhala 2 dny po přidání puromycinu. Postup průkazu exprese avidinu byl totožný jako v případě prvního virového vektoru, byla použita protilátka proti biotinu značená Texas Red i TRITC.

3.11 Ověření vazby BAM a DOPE na nádorové buňky

3.11.1 Detekce pomocí hemoglobinu

Nejprve bylo nutné zjistit absorpční spektrum hemoglobinu. Byl připraven 10^{-4} mol/l roztok hemoglobinu v PBS. Spektrum bylo změřeno na spektrofotometru Pye Unicam Sp 1800 v rozmezí vlnových délek 420-700 nm.

Dále bylo potřeba určit optimální koncentraci roztoku hemoglobinu, aby bylo dosaženo dostatečně vysoké citlivosti měření. Při vlnové délce 500 nm byly změřeny roztoky hemoglobinu o koncentracích: 10^{-4} mol/l, $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l a 10^{-5} mol/l.

Z předchozího měření byla jako optimální určena koncentrace $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l, kdy byla hodnota absorbance dostatečně vysoká. Byl tedy připraven roztok hemoglobinu o této koncentraci, dále roztok BAM a DOPE – oba o koncentraci: $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Při přípravě roztoků BAM a DOPE byly látky rozpuštěny v malém množství DMSO, poté byl přidán PBS do požadovaného množství. Následovala konjugace těchto roztoků v molárním poměru 1:1. 5 ml roztoku hemoglobinu bylo smícháno s 0,02 ml roztoku BAM nebo DOPE. Konjugace probíhala 2 hodiny při laboratorní teplotě. Roztok hemoglobinu byl také doředěn: k 5 ml roztoku hemoglobinu bylo přidáno 0,2 ml PBS. Dále byly sklizeny buňky B16-F10, promyty v 50 ml RPMI a stočeny (10 min., 1000 g, 4 °C). Po přidání RPMI byly buňky spočítány a nasazeny do desky.

Na 24-jamkové desce byly vždy v triplicátech připraveny následující vzorky. (Pozn.: HEM-BAM – konjugát BAM a hemoglobinu):

- 1 ml HEM-BAM (nebo 1 ml HEM-DOPE) + 1 ml suspenze B16-F10
- 1 ml HEM-BAM (nebo 1 ml HEM-DOPE) + 1 ml PBS
- 1 ml HEM + 1 ml suspenze B16-F10
- 1 ml HEM + 1 ml PBS

Uvedené suspenze buněk B16-F10 byly připraveny o 3 různých koncentracích:

- 5 000 buněk / ml PBS
- 50 000 buněk / ml PBS
- 500 000 buněk / ml PBS

Připravené vzorky byly inkubovány 1 hodinu při 37°C. Následně byly stočeny 2 min., 4°C, 1800 RPM (centrifuga Universal 32R, rotor S0052) Byly odebrány supernatanty, jejichž absorbance byla následně změřena při 500 nm na spektrofotometru Pye Unicam Sp 1800.

3.11.2 Detekce pomocí bovinního sérového albuminu (BSA)

Byly připraveny tyto roztoky: $2 \cdot 10^{-4}$ mol/l BSA, $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l BAM a $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l DOPE. Následovala konjugace těchto roztoků v molárním poměru 1:1. 5 ml roztoku BSA bylo smícháno s 0,2 ml roztoku BAM nebo DOPE. Roztok BSA byl také doředěn: k 5 ml roztoku BSA bylo přidáno 0,2 ml PBS. Při přípravě roztoků BAM a DOPE byly látky rozpuštěny v malém množství DMSO, poté byl přidán PBS do požadovaného množství. Konjugace probíhala 2 hodiny při laboratorní teplotě. Poté byly konjugáty i samotný BSA 20x zředěny roztokem PBS. Buňky B16-F10 byly sklizeny, promyty v 50 ml RPMI a stočeny (10 min., 1000 g, 4 °C). Po přidání RPMI byly buňky spočítány a nasazeny do desky.

Na 24-jamkové desce byly vždy v triplicátech připraveny následující vzorky. (Pozn.: BSA-BAM – konjugát BSA a BAM):

- 1 ml BSA-BAM (nebo 1 ml BSA-DOPE) + 1 ml suspenze B16-F10
- 1 ml BSA-BAM (nebo 1 ml BSA-DOPE) + 1 ml PBS
- 1 ml BSA + 1 ml suspenze B16-F10
- 1 ml BSA + 1 ml PBS

Uvedené suspenze buněk B16-F10 byly připraveny o 2 různých koncentracích:

- 20 000 buněk / ml PBS
- 100 000 buněk / ml PBS

Všechny vzorky byly poté inkubovány 1 hodinu při 37°C. Následně byly stočeny 2 min., 4°C, 1800 RPM (centrifuga Universal 32R, rotor S0052). Byly odebrány supernatanty a pomocí Bradford assay byla zjištěna koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích.

3.11.3 Detekce pomocí B-phycoerythrinu (PE)

Byl připraven roztok B-phycoerythrinu o koncentraci $5 \cdot 10^{-9}$ mol/l. Dále byly připraveny roztoky BAM a DOPE o koncentraci $1.12 \cdot 10^{-11}$ mol/l, při jejichž přípravě byly látky rozpuštěny v malém množství DMSO, poté byl přidán PBS do požadovaného množství. Následovala konjugace roztoků v molárním poměru 1:1. Bylo smícháno 450 μ l B-phycoerythrinu a 20 μ l BAM nebo DOPE, konjugace probíhala 40 minut ve tmě. Roztok B-phycoerythrinu byl také doředěn: ke 450 μ l B-phycoerythrinu bylo přidáno 20 μ l PBS. Dále byly sklizeny buňky B16-F10, promyty v 50 ml RPMI a stočeny (10 min., 1000 g, 4 °C). Po přidání RPMI byly buňky spočítány a nasazeny do desky v objemu 150 μ l.

Na 24-jamkové desce byly vždy v triplicátech připraveny následující vzorky. (Pozn.: PE-BAM – konjugát B-phycoerythrinu a BAM):

- 150 μ l PE-BAM (nebo 150 μ l B-PE-DOPE) + 150 μ l suspenze B16-F10 (100 000 bb.)
- 150 μ l PE-BAM (nebo 150 μ l B-PE-DOPE) + 150 μ l PBS
- 150 μ l PE + 150 μ l suspenze B16-F10 (100 000 bb.)
- 150 μ l B-PE + 150 μ l PBS

Pomocí dvojkového ředění byly připraveny 3 koncentrace konjugátů a PE. Všechny vzorky byly poté inkubovány 1 hodinu při 37°C. Následně byly stočeny 2 min., 4°C, 1800 RPM (centrifuga Universal 32R, rotor S0052) a byly odebrány supernatanty. Veškerá práce s B-phycoerythrinem probíhala za minimálního osvětlení. Intenzita fluorescence jednotlivých vzorků byla měřena v černé desce (Corning 96 Flat Black) při 545 nm na spektrofotometru Infinite M200.

3.11.4 Statistická analýza dat

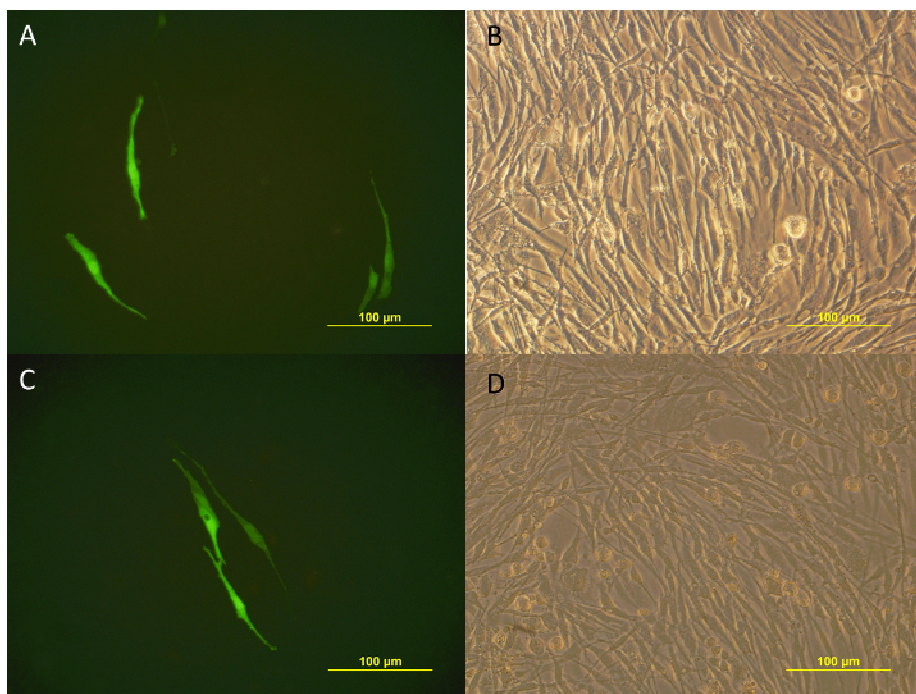
Statistická analýza byla provedena s použitím oboustranného Studentova t-testu.

4. Výsledky

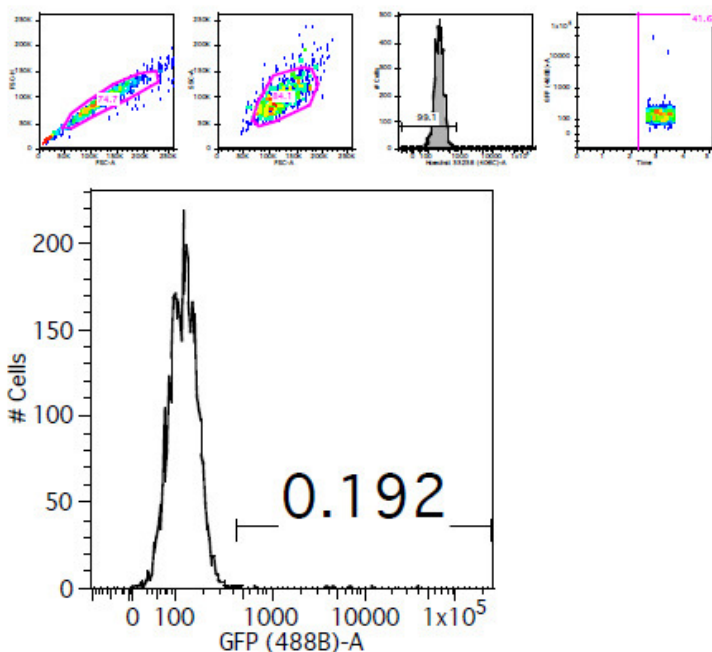
4.1 Instalace avidinu na nádorové buňky pomocí virového vektoru

4.1.1 Příprava virového vektoru

Z bakterií *E. coli* byla vyizolována DNA (pAspATIG2 a pVSV-G), která byla následně použita při transfekci pakážovacích buněk GP 293. Druhý, třetí a čtvrtý den po transfekci proběhl sběr média s virovým vektorem. Virová suspenze byla zakoncentrována ultracentrifugací. Buňky ptačí linie DF-1 po infekci vykazovaly expresi kontrolního genu: GFP (Obr. 8). Titrací (Obr. 9) byla zjištěna koncentrace virové suspenze.



Obr. 8: Buňky linie DF-1 po infekci. V levé části jsou zachyceny zeleně svítící buňky (A, C) exprimující GFP kódovaný virovým vektorem; pravá část fotografie doplňuje odpovídající transmisní obraz (B, D). Zvětšení: 40x.

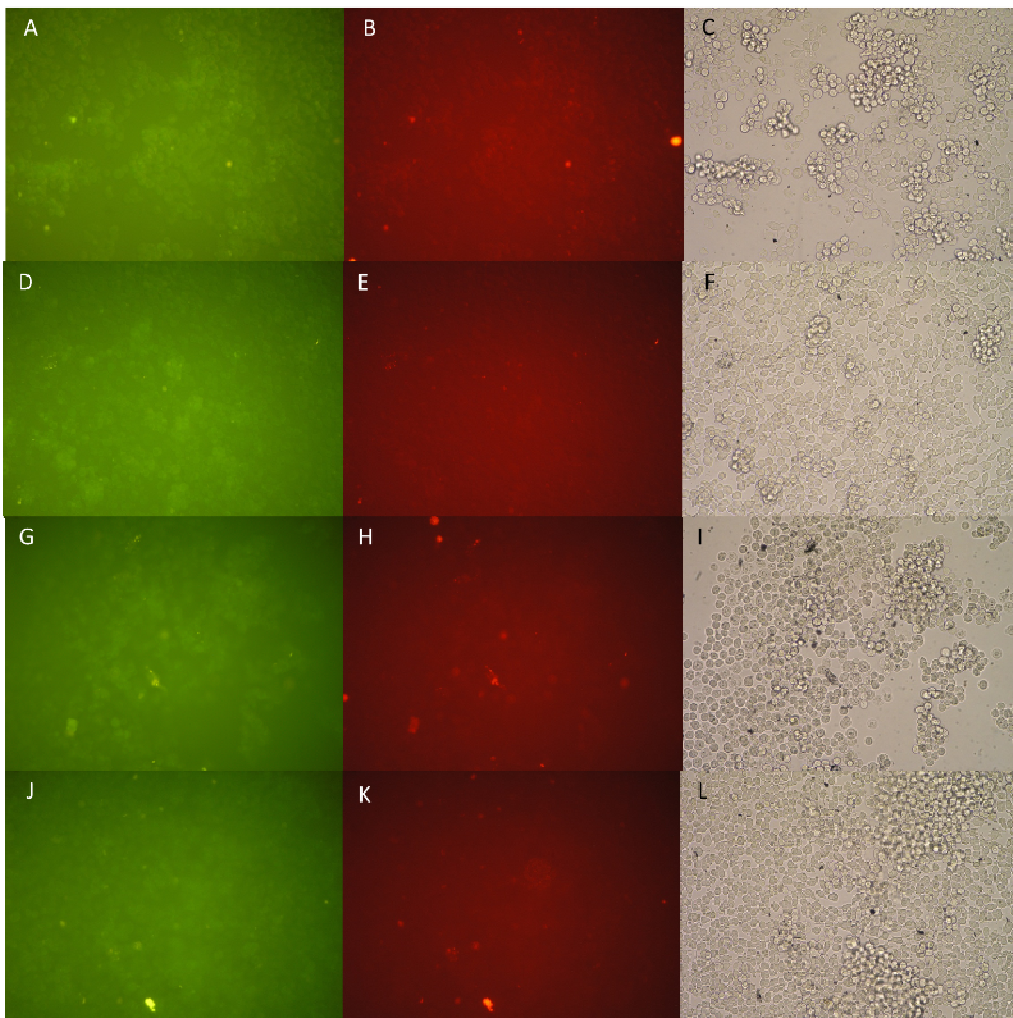


Obr. 9: Graf zobrazuje procentuální zastoupení GFP pozitivních buněk po infekci. Dle následujícího grafu ($1.8 \cdot 10^5$ buněk infikováno $0.5 \mu\text{l}$ virové suspenze) vychází titer cca $7 \cdot 10^5$ IFU/ml.

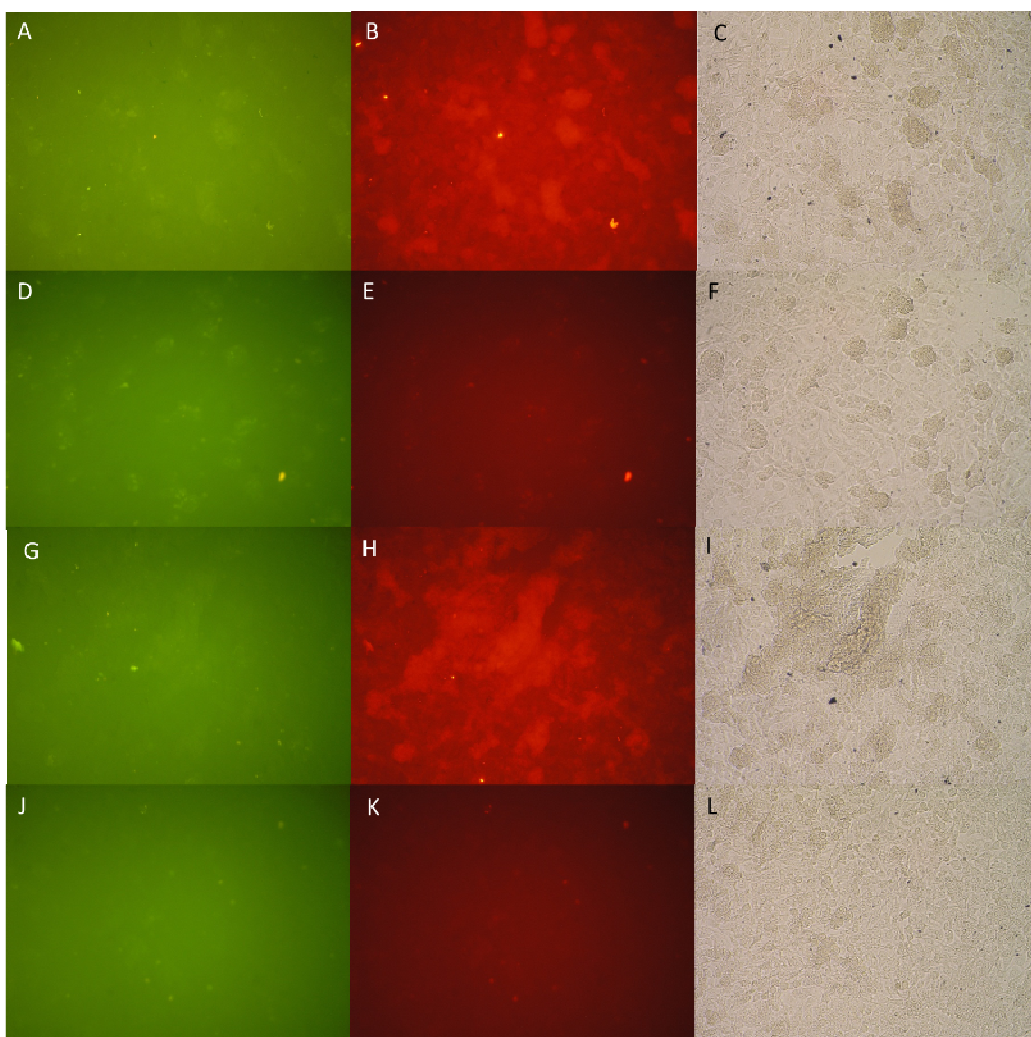
4.1.2 Mikroskopické ověření vazby biotinu

Detekce biotinu vázaného na exprimovaný avidin probíhala pomocí protilátky proti biotinu značenou Texas Red (Obr. 10). Z fotografií je zřejmé, že detekce nebyla úspěšná, proto byla provedena totožná detekce na fixovaných a permeabilizovaných buňkách (Obr. 11). Cílem bylo ověřit, zda se avidin neexprimuje uvnitř buňky. Bohužel protilátka se nespecificky vázala i na cytoplazmu neinfikovaných buněk. Dále byla testována protilátka proti biotinu značená TRITC, která má příznivější excitační spektrum pro dostupný filtr (Obr. 12). Ani v tomto případě se nepodařilo prokázat expresi avidinu. Buňky vykazovaly silné pozadí ve spektru GFP, z tohoto důvodu bylo obtížné detekovat infikované buňky.

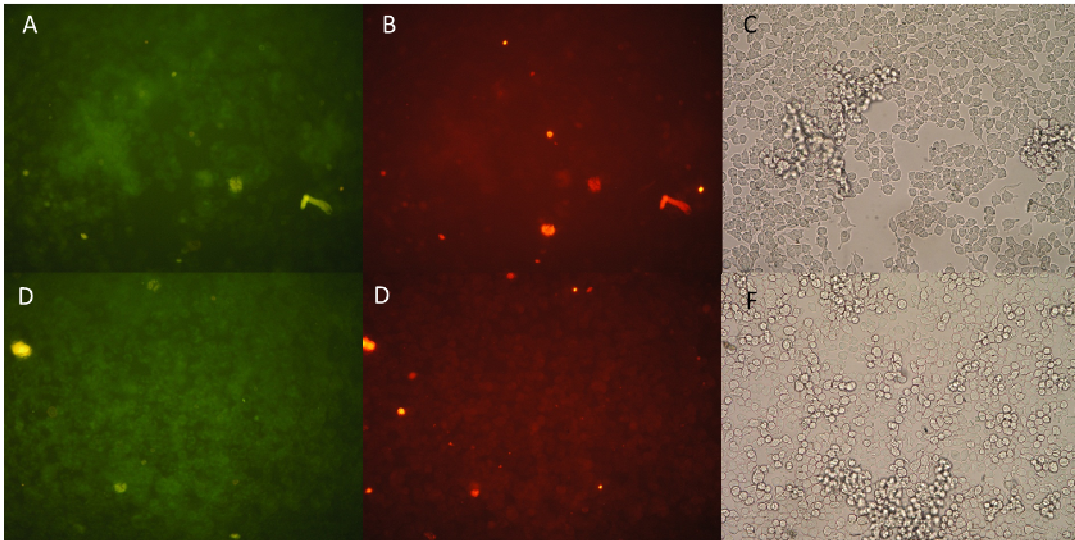
Po neúspěšném pokusu s prvním virem připravil dr. Šenigl (ÚMG Praha) virový vektor odvozený od lentiviru. Pro detekci biotinu byla použita protilátka proti biotinu značená Texas Red i TRITC (Obr. 13). Ze snímků není patrný rozdíl ve vazbě protilátky u infikovaných a neinfikovaných buněk.



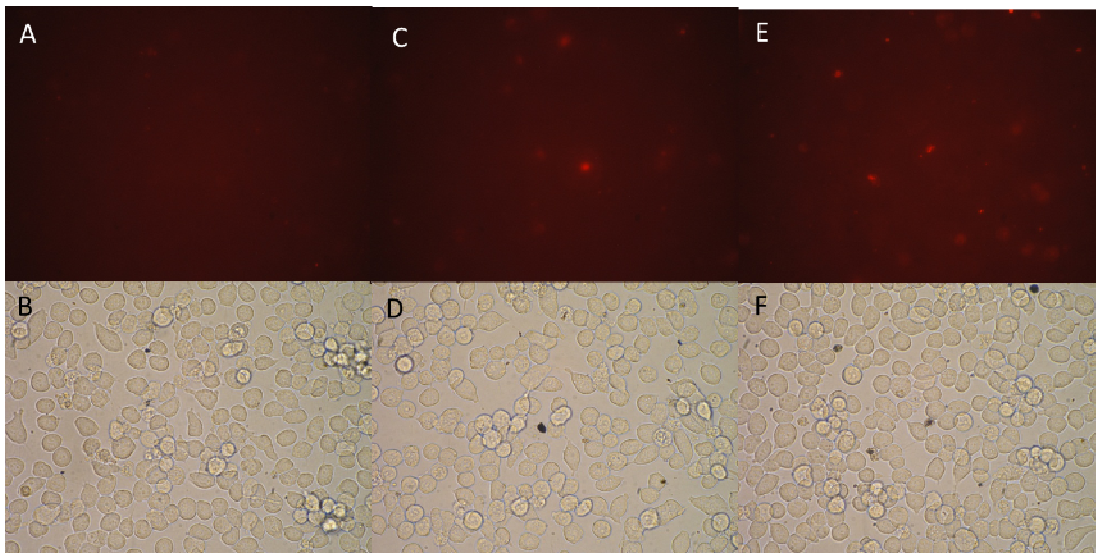
Obr. 10: Detekce vazby biotinu na exprimovaný avidin pomocí protilátky proti biotinu značenou Texas Red; A, B, C - Infikované buňky po inkubaci s biotinem a protilátkou proti biotinu značenou Texas Red; D, E, F – neznačené infikované buňky; G, H, I – neinfikované buňky po inkubaci s biotinem a protilátkou proti biotinu značenou Texas Red; J, K, L – neznačené neinfikované buňky; fotografie vlevo jsou foceny s excitačním filtrem pro detekci GFP, fotografie uprostřed jsou foceny s filtrem pro detekci Texas Red. Zvětšení: 20x.



Obr. 11: Detekce vazby biotinu na exprimovaný avidin pomocí protilátky proti biotinu značenou Texas Red, detekce probíhala na fixovaných buňkách; A, B, C – fixované infikované buňky po inkubaci s biotinem a protilátkou proti biotinu značenou Texas Red; D, E, F – fixované neznačené infikované buňky; G, H, I – fixované neinfikované buňky po inkubaci s biotinem a protilátkou proti biotinu značenou Texas Red; J, K, L – fixované neznačené neinfikované buňky; fotografie vlevo jsou foceny s excitačním filtrem pro detekci GFP, fotografie uprostřed jsou foceny s filtrem pro detekci Texas Red. Zvětšení: 10x.



Obr. 12: Detekce vazby biotinu na exprimovaný avidin pomocí protilátky proti biotinu značenou Texas Red; A, B, C - Infikované buňky po inkubaci s biotinem a protilátkou proti biotinu značenou TRITC; G, H, I – neinfikované buňky po inkubaci s biotinem a protilátkou proti biotinu značenou TRITC; fotografie vlevo jsou foceny s excitačním filtrem pro detekci GFP, fotografie uprostřed jsou foceny s filtrem pro detekci TRITC. Zvětšení: 20x.

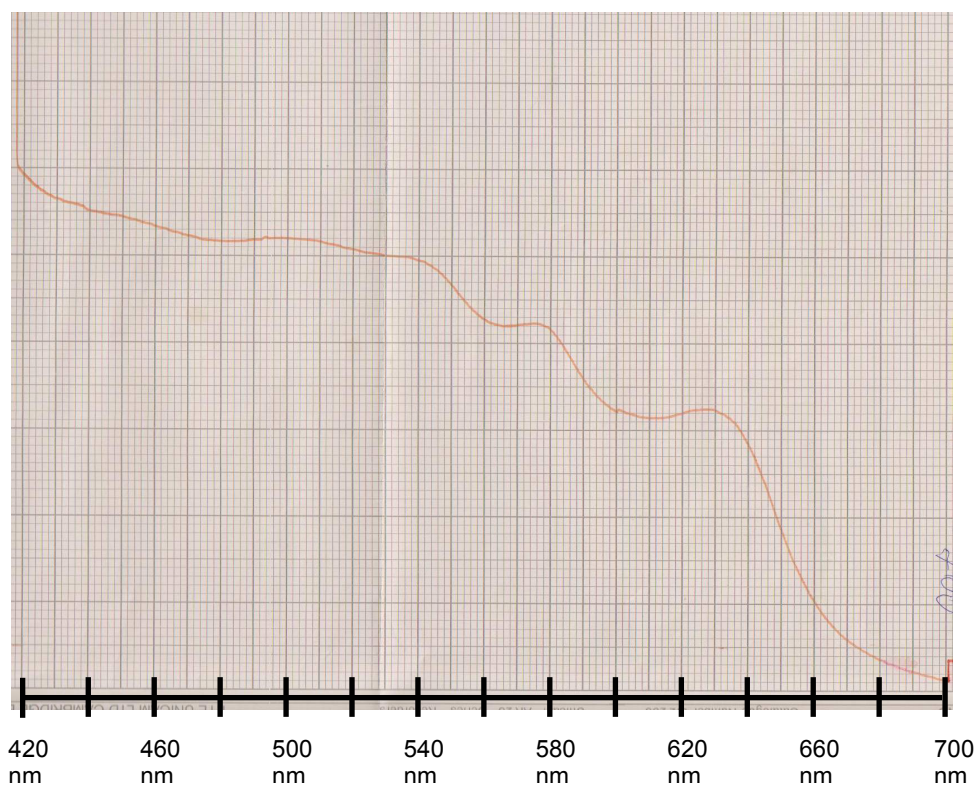


Obr. 13: Detekce vazby biotinu na exprimovaný avidin u virového vektoru odvozeného od lentiviru; A, B - Infikované buňky po inkubaci s biotinem a protilátkou proti biotinu značenou Texas Red; C, D – Infikované buňky po inkubaci s biotinem a protilátkou proti biotinu značenou TRITC; E, F – neznačené infikované buňky; horní snímky jsou foceny s filtrem pro detekci TRITC a Texas Red. Zvětšení: 40x.

4.2 Ověření vazby BAM a DOPE na nádorové buňky

4.2.1 Detekce pomocí hemoglobinu

Byl připraven 10^{-4} mol/l roztok hemoglobinu v PBS. Absorpční spektrum hemoglobinu bylo změřeno na spektrofotometru Pye Unicam Sp 1800 v rozmezí vlnových délek 420-700 nm (Obr. 14). Pro měření absorbance vzorků byla vybrána vlnová délka 500 nm.

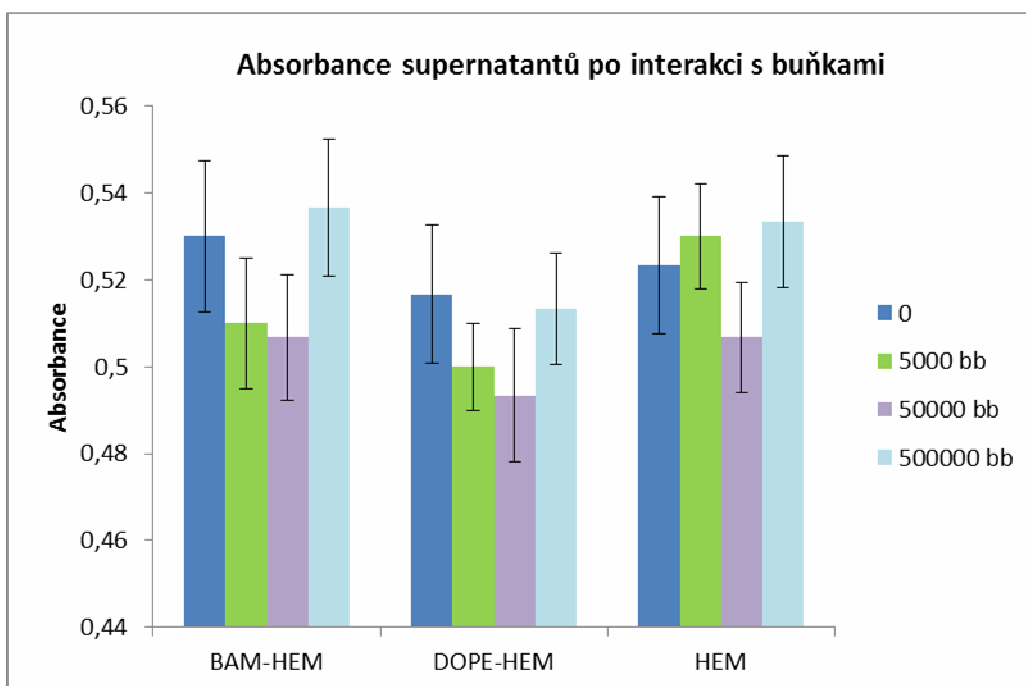


Obr. 14: Absorpční spektrum hemoglobinu.

Dále byla změřena absorbance připravených vzorků při 500 nm (Tab. 3). Z vypočtených hodnot průměrné absorbance a směrodatné odchylky (Obr. 15) je zřejmé, že tento systém není vhodný pro detekci vazby BAM a DOPE na nádorové buňky, změny absorbance jsou malé a často nelogické a na druhou stranu rozptyl hodnot je příliš velký.

Tab. 3: Průměrná absorbance supernatantů po interakci s buňkami, aplikovaná látka a množství buněk ve vzorku. Původní koncentrace látek aplikovaných na buňky byla $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l.

látka	absorbance supernatantu (při 500 nm)			
	0	5000 bb	50000 bb	500000 bb
BAM-HEM	0,5300	0,5100	0,5067	0,5367
DOPE-HEM	0,5167	0,5000	0,4933	0,5133
HEM	0,5233	0,5300	0,5067	0,5333



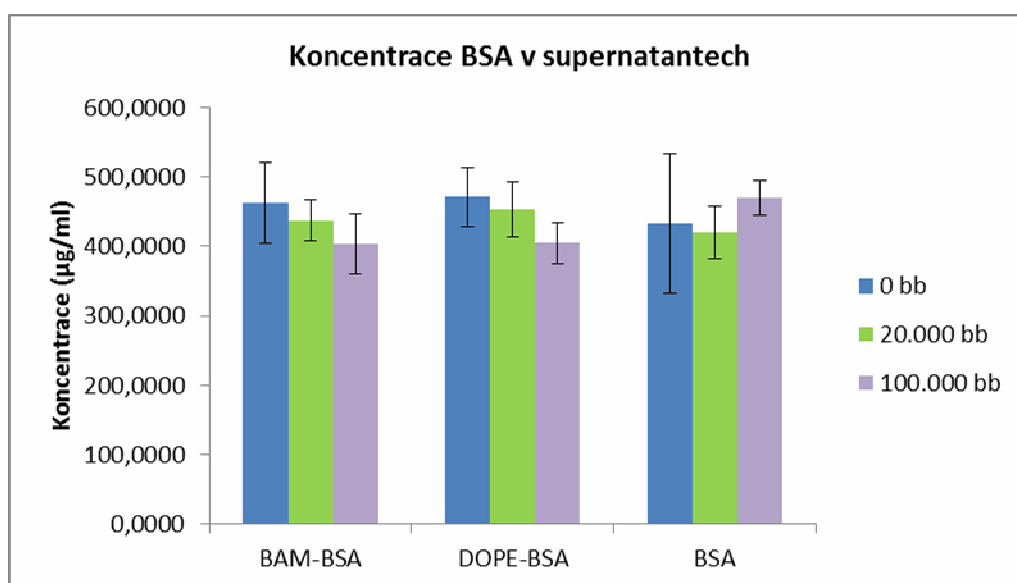
Obr. 15: Průměrná absorbance supernatantů se směrodatnými odchylkami. Ze zobrazených směrodatných odchylek je patrný rozptyl naměřených hodnot. Tento systém je nepřesný, a tedy není vhodný pro detekci vazby BAM a DOPE.

4.2.2 Detekce pomocí bovinního sérového albuminu

U vzorků byla naměřena absorbance, Dean-Dixonovým testem byly vyřazeny odlehlé hodnoty, zbývající hodnoty byly zprůměrovány a pomocí kalibrační křivky byla dopočítána koncentrace BSA v jednotlivých vzorcích (Tab. 4). Ze směrodatných odchylek koncentrací supernatantů je zjevný rozptyl zjištěných hodnot (Obr. 16). Systém detekce vazby BAM a DOPE pomocí bovinního sérového albuminu je pro svou nepřesnost nevhodný.

Tab. 4: Průměrná koncentrace BSA v supernatantech po interakci s buňkami, typ aplikované látky a množství buněk ve vzorku. Původní koncentrace látek aplikovaných na buňky byla $5 \cdot 10^{-6}$ mol/l (tedy 330 $\mu\text{g/ml}$).

látka	koncentrace ($\mu\text{g/ml}$)		
	0 bb	20.000 bb	100.000 bb
BAM-BSA	461,9167	436,9167	403,5833
DOPE-BSA	471,5000	453,1667	404,8333
BSA	433,1667	420,6667	470,2500

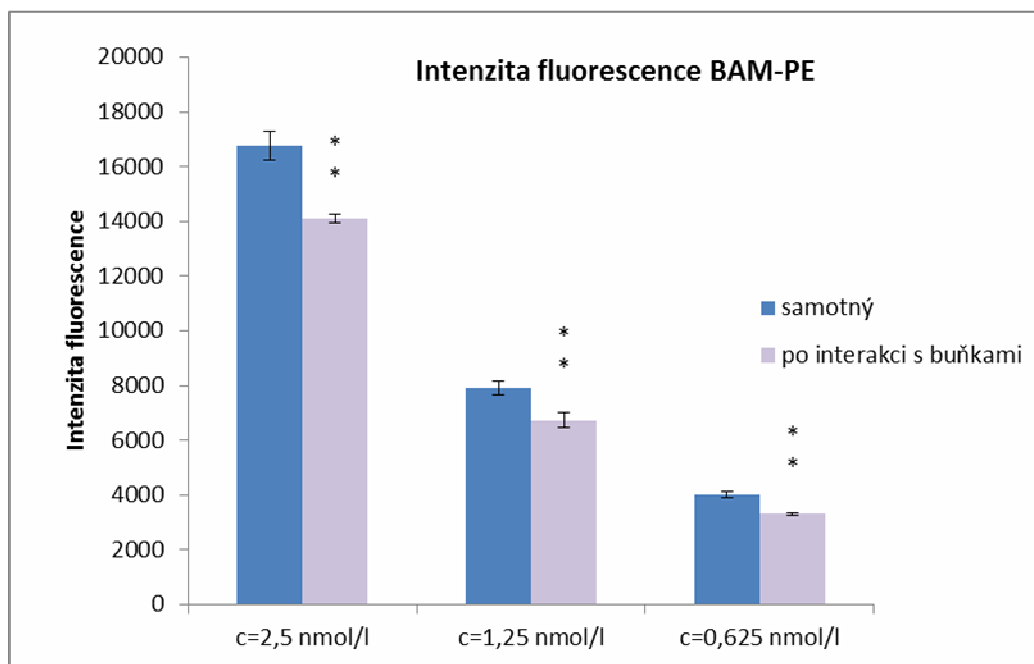


Obr. 16: Průměrná koncentrace supernatantů se směrodatnými odchylkami. Ze zobrazených směrodatných odchylek je patrný rozptyl naměřených hodnot.

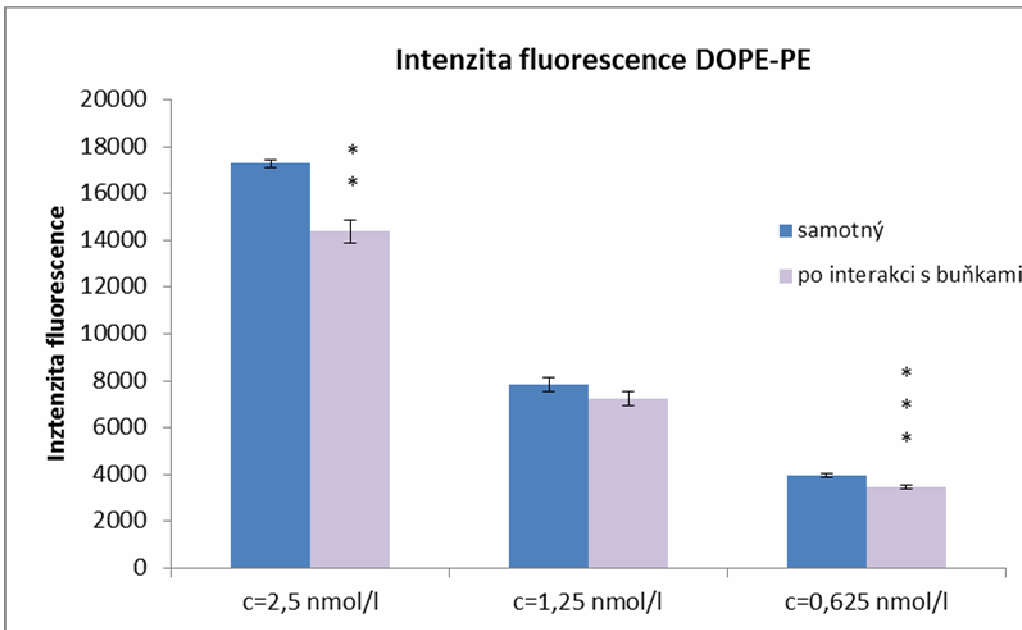
4.2.3 Detekce pomocí B-phycoerythrinu

Byla zjišťována statistická významnost vazby PE prostřednictvím BAM a DOPE na buňky (Obr. 17-18). K významnějším poklesům intenzity fluorescence po interakci s buňkami došlo u obou konjugátů, BAM-PE i DOPE-PE. To znamená, že BAM i DOPE velmi dobře PE na nádorové buňky vázaly. Z Obr. 19, který ukazoval nespecifickou vazbu PE na nádorové buňky, vyplývá, že navázané množství PE (pokles fluorescence) bylo nižší než při použití kotvení BAM, resp. DOPE a statistická významnost nespecifického kotvení byla rovněž nižší.

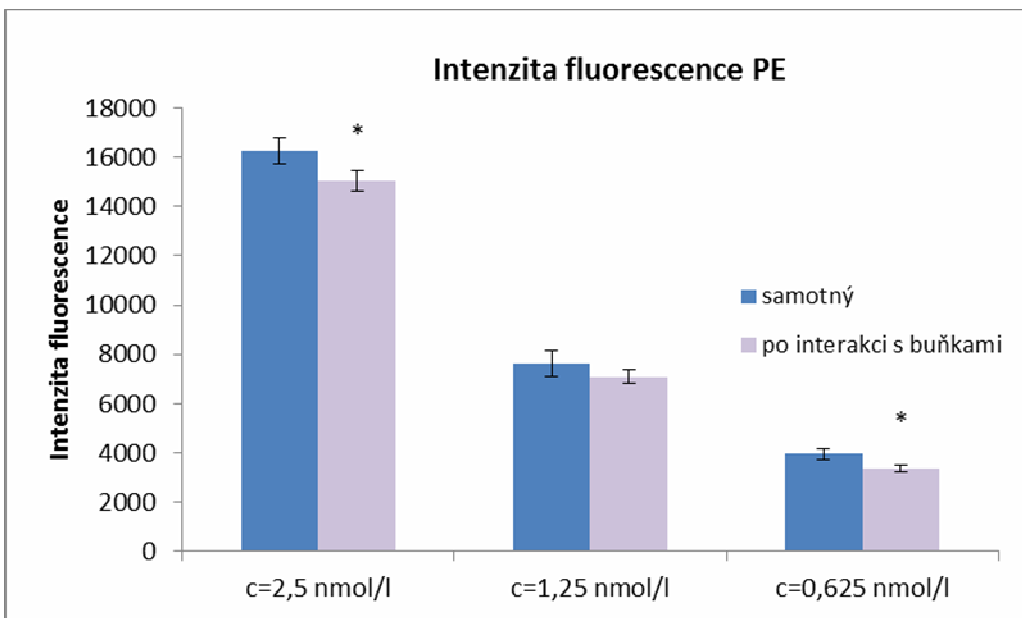
Pomocí kalibrační křivky byla dopočítána koncentrace jednotlivých vzorků a látkové množství navázané na buňkách (Tab. 5). Nakonec bylo dopočítáno navázané látkové množství na jedné buňce (Tab. 6). Při vyšších koncentracích se ukazuje, že BAM i DOPE mají stejnou vazebnou schopnost. V případě nižších vázaných koncentrací je vhodnější použít BAM.



Obr. 17: Statistická významnost poklesu intenzity fluorescence BAM-PE po interakci s buňkami při různých koncentracích. U všech koncentrací dochází k významnému poklesu: $P < 0,01$ (**).



Obr. 18: Statistická významnost poklesu intenzity fluorescence DOPE-PE po interakci s buňkami při různých koncentracích. Významný rozdíl je u koncentrace 2,5 nmol/l - $P < 0,01$ (**) a u koncentrace 0,625 nmol/l – $P < 0,005$ (***)



Obr. 19: Statistická významnost poklesu intenzity fluorescence PE po interakci s buňkami při různých koncentracích. Významný rozdíl je u koncentrací 2,5 nmol/l a 0,625 nmol/l – $P < 0,05$ (*).

Tab. 5: Koncentrace látek v supernatantech po interakci s buňkami a látkové množství vázané na buňky.

koncentrace použité látky (nmol/l)	koncentrace látky v supernatantu (nmol/l)		pokles koncentrace látky po interakci s buňkami (nmol/l)	látkové množství navázané na 100 000 buněk (fmol)
	samotná látka	po interakci s buňkami		
BAM-PE				
2,5000	2,1930	1,8435	0,3495	104,8404
1,2500	1,0328	0,8782	0,1545	46,3599
0,6250	0,5215	0,4285	0,0930	27,9103
DOPE-PE				
2,5000	2,2589	1,8796	0,3793	113,8031
1,2500	1,0345	0,9233	0,1112	33,3547
0,6250	0,5144	0,4511	0,0633	18,9868
PE				
2,5000	2,1260	1,9637	0,1623	48,6792
1,2500	0,9962	0,9249	0,0712	21,3717
0,6250	0,5020	0,4471	0,0549	16,4710

Tab. 6: Látkové množství jednotlivých látek navázané na buňky a počet molekul vázaných na jednu buňku.

koncentrace použité látky (nmol/l)	specificky navázané látkové množství (fmol)		specificky navázaný počet molekul na buňku
	na 100 000 buněk	na 1 buňku	
BAM-PE			
2,5000	56,1612	$5,6161 \times 10^{-4}$	338210,7095
1,2500	24,9882	$2,4988 \times 10^{-4}$	150482,4835
0,6250	11,4393	$1,1439 \times 10^{-4}$	68889,0866
DOPE-PE			
2,5000	65,1240	$6,5124 \times 10^{-4}$	392185,7107
1,2500	11,9831	$1,1983 \times 10^{-4}$	72163,7490
0,6250	2,5159	$2,5159 \times 10^{-5}$	15150,8363

5. Diskuze

Hlavním cílem této práce byla studie možnosti kotvení agonistů fagocytárních receptorů na nádorové buňky za účelem nasměrování fagocytárních složek vrozené imunity k ataku nádorových buněk. Protinádorové působení aktivace vrozené imunity je sledováno již delší dobu a spočívá především v použití ligandů signálních Toll-like receptorů. Velké množství prací je založeno na použití syntetických ligandů TLR (Kanzler a kol., 2007). Bohužel se stále častěji ukazuje, že pouhá aktivace signálních receptorů, ať systémová nebo nádor specifická, zdaleka nestačí a použití těchto ligandů v nádorové terapii dovedené na úroveň klinických zkoušek ztroskotalo (Guha, 2012).

Rozhodli jsme se proto zaměřit na ligandy fagocytárních receptorů s tím, že jsme zjistili, že sice fungují, ale účinnost terapie je značně podpořena, když použijeme kombinaci signálních a fagocytárních ligandů. Signální ligandy způsobí infiltraci buněk vrozené imunity, fagocytární navázané na nádorové buňky pak určí směr ataku (Auerová, 2012; Bruzlová, 2012; Čunátová, 2012; Kumžáková, 2012). Dosavadní přístup, přestože je velmi účinný, však přináší jistá úskalí. V případě, že nedojde k úplnému vyléčení myši, je další léčba limitována přítomností imunitních buněk v prostředí tumoru. Doposud používané látky se totiž nevážou specificky na nádorové buňky, mohou tedy poškozovat i přítomné buňky imunitního systému. Další nevýhodou dosud užívaných postupů je nutnost aplikace fagocytárních motivů do nádoru. Řešením by mohlo být využití virů, které často vykazují vysokou specifitu k nádorovým buňkám.

Onkolytické viry žádanou specifitu poskytují. Preferenčně se v nádorových buňkách replikuje například New castle disease virus (Reichard a kol, 1992). Dalším vhodným virem by mohl být herpes simplex virus. Dle klinických studií je stejně jako New castle disease virus lidmi dobře tolerován (Chiocca, 2002).

Ukotvení ligandů fagocytárních receptorů pomocí virových vektorů je možno dosáhnout několika způsoby. Jednou z možností je využít virové vektory jako nosiče genů pro samotné agonisty receptorů. Tímto se ve svých studiích zabýval zmíněný Tosch a kol. (2008), který dosáhl exprese flagellinu na nádorových buňkách.

Nevýhodou předchozího systému je jeho nízká variabilita. Proto bylo třeba přijít se strategií, která umožní agonisty fagocytárních receptorů měnit dle potřeby. Tohoto cíle jsme se snažili dosáhnout využitím obrovské afinity biotinu k avidinu. Nejprve bychom pomocí virového vektoru nesoucího gen pro avidin a transmembránový protein butyrofilin dosáhli exprese avidinu na membráně nádorových buněk. Následně bychom biotinylovali různé

agonisty fagocytárních receptorů (deriváty beta glukanů, manosy, mananu, formylmethioninové motivy) a již zmíněná afinita by měla zajistit jejich navázání na avidin kotvený v membránách nádorových buněk.

Ve spolupráci s dr. Filipem Šeniglem (Ústav molekulární genetiky, AVČR) byl připraven virový vektor odvozený od viru vezikulární stomatitidy (VSV) nesoucí gen pro fúzní protein avidin+butyrofilin. Virový vektor dále nesl gen pro expresi proteinu EGFP, který měl sloužit jako marker infekce. Po infikování melanomových buněk připraveným vektorem se však nepodařilo prokázat expresi avidinu a následnou vazbu biotinu. Po navázání biotinu na infikované buňky a následně protilátky proti biotinu s fluorescenční značkou vykazovaly buňky spíše nespecifickou fluorescenci. Navíc melanomové buňky vykazovaly vysoké pozadí ve spektru GFP, bylo tedy prakticky nemožné v mikroskopu odlišit infikované buňky od neinfikovaných.

Z tohoto důvodu byl připraven druhý virový vektor odvozený od lentiviru s novým infekčním markerem – expresní kazetou pro puromycin. Přestože jsme byli schopni selektovat infikované buňky, opět se nepodařilo prokázat expresi avidinu.

Neúspěch předchozích pokusů mohl mít mnoho příčin. Pro optimální afinitu avidinu k biotinu je potřeba, aby avidin vytvořil tetramer (Wilchek a kol, 2006). Bohužel nevíme, zda exprimovaný protein tetramer skutečně tvoří. Dále je možné, že se avidin exprimoval uvnitř buňky místo na membráně. Tuto možnost jsme ale z důvodu nespecifické vazby protilátky na cytoplazmu nádorových buněk nebyli schopni prověřit.

Walkerovi a kol. (1996) se podařilo nainstalovat avidin na dvě nádorové buněčné linie. Je ovšem obtížné provést srovnání s touto prací, jelikož ve zmíněné studii používali jinou buněčnou linii (C/16) a rovněž jiný systém virového vektoru.

Metody kvantifikace vazby BAM a DOPE byly zaváděny z několika důvodů. Přínosem je již představa, jaké množství BAM a DOPE se váže na buňky. Dále bylo potřeba vytvořit metodiku, která umožní testovat vazebné schopnosti BAM a DOPE a zároveň dalších systémů, jako například kovalentní vazbu pomocí SMCC nebo interakce specifických peptidů. Metodika bude dále využita při testování časové a kompetiční stability vazby. Pro detekci vazby BAM a DOPE byly testovány tři systémy: detekce pomocí hemoglobinu, bovinního sérového albuminu a B-phycoerythrinu.

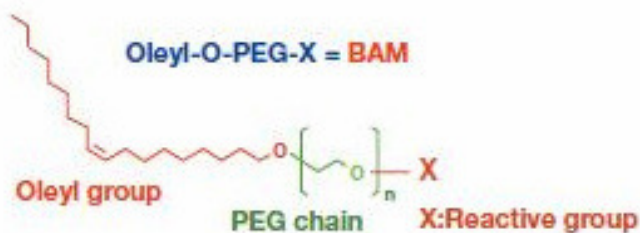
Detekce pomocí hemoglobinu není vhodná pro účel kvantifikace vazby z důvodu velkého rozptylu naměřených hodnot. Ten by mohl být způsoben nerovnoměrnou oxidací hemoglobinu na oxyhemoglobin. Absorpční spektra jednotlivých forem se totiž liší.

Bovinní sérový albumin se jako marker vazby také jeví jako problematický, rovněž vykazuje velký rozptyl hodnot. Důvodem je předpokládané uvolňování proteinů buňkami po interakci s látkami BAM a DOPE. Přestože detekce případného uvolňování proteinů buňkami byla zajištěna kontrolou (supernatanty po interakci PBS s buňkami), je možné, že uvolňování bílkovin bylo vyvoláno až vazbou BAM a DOPE.

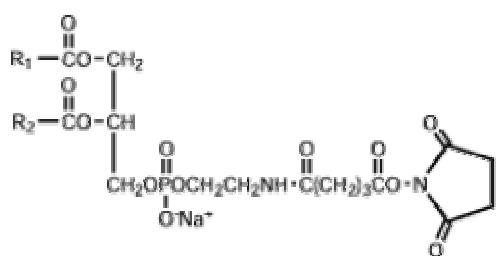
Metoda studující vazbu pomocí B-phycoerythrinu vykazovala malý rozptyl naměřených hodnot. Přestože je tato metoda nejnáročnější, především kvůli nutnosti pracovat s fluorescenčním markerem při minimálním osvětlení, jeví se jako nejspolehlivější.

K významnému poklesu intenzity fluorescence po interakci s buňkami došlo u obou konjugátů (BAM-PE a DOPE-PE). Tento pokles byl výrazně větší než změna intenzity fluorescence samotného phycoerythrinu po aplikaci na buňky.

Z výpočtu množství vázaných molekul vyplynulo, že při vyšších koncentracích je intenzita vazby pomocí BAM a DOPE srovnatelná, u nižších koncentrací je vhodnější BAM. DOPE se na membránu buněk váže pomocí dvou olejových kyselin, zatímco BAM pouze pomocí jedné (Obr. 20, 21). Dalo by se tedy očekávat, že DOPE bude pro kotvení molekul výrazně lepší. Zdá se, že během krátké inkubace se rozdíly tolik neprojeví, rozdíly lze očekávat až při měření stability kotvení. Kato a kol. (2004) uvádí, že zatímco BAM se kotví cca 1 hodinu, u DOPE lze počítat s 8 hodinami. My jsme se zaměřili na kvantifikaci interakce a metodiku jejího měření, stabilita interakce a vztah k terapeutické účinnosti vazby daného ligandu bude náplní dalšího studia.



Obr. 20: Struktura BAM (Biocompatible Anchor for cell Membrane); převzato z www.nofeurope.com (12. 12. 2012) a upraveno.



Obr. 21: Struktura DOPE (N-(Succinimidyl)oxy-L-α-phosphatidylethanolamine, Dioleil); převzato z nofamerica.net (12. 12. 2012).

6. Závěr

- Ani jeden z připravených virových vektorů neumožnil průkaznou expresi avidinu na nádorových buňkách B16-F10.
- Byla optimalizována metoda kvantifikace vazby BAM a DOPE.
- Byl zjištěn počet molekul BAM a DOPE vázajících se za konkrétních podmínek na buňky B16-F10.

7. Seznam literatury:

Abbasi NR, Shaw HM, Rigel DS, Friedman RJ, McCarthy WH, Osman I, Kopf AW, Polsky D. Early diagnosis of cutaneous melanoma. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. 2004;292(22):2771-2776.

Auerová, M., 2012: Terapie nádorových onemocnění založená na ukotvení laminarinu na povrch nádorových buněk. [Therapy of cancer based on the fixation of laminarine to the surface of tumor cells. Bc. Thesis, in Czech] – 42 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Bandarchi B, Ma L, Navab R, Seth A, Rasty G. From melanocyte to metastatic malignant melanoma. *Dermatology Research and Practice*. 2010;2010:583748.

Becker JM, Wilchek M. Inactivation by avidin of biotin-modified bacteriophage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 1972;264(1):165-170.

Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of Leukocyte Biology*. 2007;81(1):1-5.

Bodanszky A, Bodanszky M. Sepharose-avidin column for the binding of biotin or biotin-containing peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 1970;26(3):327-327.

Bray F, Jemal A, Grey N, Ferlay J, Forman D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study. *The Lancet Oncology*. 2012;13(8):790-801.

Bruzlová, P., 2012: Ověření možnosti terapie nádorových onemocnění pomocí instalace mananu na povrch nádorových buněk. [Verification of the possibility of cancer therapy by installation of mannan on the surface of tumor cells. Bc. Thesis, in Czech.] – 38 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Cameron MD, Schmidt EE, Kerkvliet N, Nadkarni KV, Morris VL, Groom AC, Chambers AF, MacDonald IC. Temporal progression of metastasis in lung: cell survival, dormancy, and location dependence of metastatic inefficiency. *Cancer Research*. 2000;60(9):2541-2546.

Cillo C, Dick J, Ling V, Hill R. Generation of drug-resistant variants in metastatic B16 mouse melanoma cell lines. *Cancer Research*. 1987;47(10):2604-2608.

Čunátová, Š., 2012: Ověření možnosti terapie nádorových onemocnění pomocí kotvení formylmethioninových derivátů na povrch nádorových buněk. [Verification of the possibility of cancer therapy based on formylmethionine derivatives anchored to the tumor cells surface. Bc. Thesis, in Czech.] – 38 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Davis LS, McIlraith MJ, Paecheo T, Becker B, Adix LM, Thomas R, Wacholtz MC, Lipsky PE. Assessment of a positive selection technique using an avidin column to isolate human peripheral blood T cell subsets. *Journal of Immunological Methods*. 1994;175(2):247-257.

Daya S, Berns KI. Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clinical Microbiology Reviews*. 2008;21(4):583-593.

Deshpande S. Enzyme immunoassays: from concept to product development. New York: Chapman, c1996, xiii, 464 s.

Dušek L, Mužík J, Gelnarová E, Fínek J, Vyzula R, Abrahámová J. Cancer incidence and mortality in the Czech Republic. *Klinická onkologie*. 2010;23(5):311-324.

Erdman JW, Macdonald I, Zeisel SH. Present knowledge in nutrition. 10th ed. Ames, Iowa: International Life Sciences Institute, 2012, 728 s.

Franks L, Teich N. Introduction to the cellular and molecular biology of cancer. 3rd ed. New York: Oxford University Press, 1997, xxi, 458 s.

Friedmann T, Rossi JJ. Gene transfer: delivery and expression of DNA and RNA: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, c2007, xiv, 793 s.

Grana CM, Chinol M, De Cicco C, Bartolomei M, Cremonesi M, Bodei L, Rocca PA, Pacifici M, Tiberini S, Baio SM. Eleven-year experience with the Avidin-Biotin pretargeting system in glioblastoma: toxicity, efficacy and survival. *The Open Nuclear Medicine Journal*. 2012;4:14-20.

Guha M. Anticancer TLR agonists on the ropes. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2012;11(7):503-505.

Hajdu SI. A note from history: landmarks in history of cancer, part 1. *Cancer*. 2011;117(5):1097-1102.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674.

Heggeness MH, Ash JF. Use of the avidin-biotin complex for the localization of actin and myosin with fluorescence microscopy. *The Journal of Cell Biology*. 1977;73(3):783-788.

Heitzmann H, Richards FM. Use of the avidin-biotin complex for specific staining of biological membranes in electron microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1974;71(9):3537-3541.

Hicks AM, Riedlinger G, Willingham MC, Alexander-Miller MA, Von Kap-Herr C, Pettenati MJ, Sanders AM, Weir HM, Du W, Kim J, Simpson AJG, Old LJ, Cui Z. Transferable anticancer innate immunity in spontaneous regression/complete resistance mice. *PNAS*, 2006;103:7753-7758.

Hořejší V, Bartůňková J. *Základy imunologie*. 4. vyd. Praha: Triton, 2009, 316 s.

Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1981;29(4):577-580.

Huopalahti R, López-Fandiño R, Anton M a Schade R. *Bioactive egg compounds*. New York: Springer, c2007, xx, 298 s.

Chiocca EA. Oncolytic viruses. *Nature Reviews Cancer*. 2002;2(12):938-950.

Jordan VC, Furr BJA. *Hormone therapy in breast and prostate cancer*. New York, N.Y: Humana Press, 2009, 420 s.

Kalofonos H, Rusckowski M, Siebecker D, Sivolapenko G, Snook D, Lavender J, Epenetos A, Hnatowich D. Imaging of tumor in patients with indium-111-labeled biotin and streptavidin-conjugated antibodies: preliminary communication. *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine*. 1990;31(11):1791-1796.

Kanzler H, Barrat FJ, Hessel EM, Coffman RL. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nature Medicine*. 2007;13(5):552-559.

Kato K, Itoh C, Yasukouchi T, Nagamune T. Rapid protein anchoring into the membranes of mammalian cells using oleyl chain and poly (ethylene glycol) derivatives. *Biotechnology Progress*. 2004;20(3):897-904.

Khare R, Chen CY, Weaver EA, Barry MA. Advances and future challenges in adenoviral vector pharmacology and targeting. *Current Gene Therapy*. 2011;11(4):241.

Kim NS, Kato S. In-tube cDNA cloning method using a biotinylated RNA probe. *Analytical Biochemistry*. 1994;217(1):20-24.

King AM. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses : ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Waltham, MA: Academic Press, c2012, x, 1327 s.

Ko AH, Dollinger M, Rosenbaum EH. Everyone's guide to cancer therapy: how cancer is diagnosed, treated, and managed day to day. Rev. 5th ed. Kansas City: Andrews McMeel Pub., c2008, xxxv, 988 s.

Kotin RM, Siniscalco M, Samulski RJ, Zhu X, Hunter L, Laughlin CA, McLaughlin S, Muzyczka N, Rocchi M, Berns KI. Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1990;87(6):2211-2215.

Kumžáková Z., 2012: Ověření možnosti terapie nádorových onemocnění pomocí sloučenin s terminální manosou. [Proving the possibility of cancer therapy using compounds with terminal mannose. Bc. Thesis, in Czech.] – 40 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Kurien BT, Scofield R. Protein electrophoresis: methods and protocols. New York: Springer, c2012, xiv, 648 s. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), svazek 869.

Laitinen OH, Nordlund HR, Hytönen VP, Kulomaa MS. Brave new (strept) avidins in biotechnology. *Trends in Biotechnology*. 2007;25(6):269-277.

Lesch HP, Pikkarainen JT, Kaikkonen MU, Taavitsainen M, Samaranayake H, Lehtolainen-Dalkilic P, Vuorio T, Määttä AM, Wirth T, Airene KJ. Avidin fusion protein-expressing lentiviral vector for targeted drug delivery. *Human Gene Therapy*. 2009;20(8):871-882.

Li X, Ni M, Zhang Y. Detecting miRNAs by liquid hybridization and color development. *Methods*. 2012;58(2):151-155.

Livnah O, Bayer EA, Wilchek M, Sussman JL. Three-dimensional structures of avidin and the avidin-biotin complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1993;90(11):5076-5080.

Magro M, Faralli A, Baratella D, Bertipaglia I, Giannetti S, Salviulo G, Zboril R, Fabio V. Avidin functionalized maghemite nanoparticles and their application for recombinant human biotinyl-SERCA purification. *Langmuir*. 2012;28(43):15392-15401.

Medzhitov R, Janeway Jr CA. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*. 2002;296(5566):298-300.

Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*. 2011;480(7378):480-489.

Morpurgo M, Facchin S, Pignatto M, Silvestri D, Casarin E, Realdon N. Characterization of Multifunctional Nanosystems Based on the Avidin-Nucleic Acid Interaction As Signal Enhancers in Immuno-Detection. *Analytical Chemistry*. 2012;84(7):3433-3439.

Minev BR. Cancer management in man: chemotherapy, biological therapy, hyperthermia and supporting measures. Dordrecht: Springer, 2011, 524 s.

Murugan S, Saarela U, Airene K, Shan J, Skovorodkin I, Ylä-Herttuala S, Vainio SJ. Conditional expression of iodavin, an avidin-tagged ldl receptor, for biotin-mediated applications in vivo. *Genesis*. 2012;50(9):693-699.

Nakamura K, Yoshikawa N, Yamaguchi Y, Kagota S, Shinozuka K, Kunitomo M. Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. *Life Sciences*. 2002;70(7):791-798.

Nucera E, Nicoletti C, Chiapparino C, Pacello M, D'Alessio V, Musarò A, De Santis R. AvidinOX™ for tissue targeted delivery of biotinylated cells. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. 2012;25(1):239.

Orelma H, Johansson L, Filpponen I, Rojas OJ, Laine J. Generic Method for Attaching Biomolecules via Avidin-Biotin Complexes Immobilized on Films of Regenerated and Nanofibrillar Cellulose. *Biomacromolecules*. 2012;13(9):2802-2810.

Paganelli G, Magnani P, Zito F, Villa E, Sudati F, Lopalco L, Rossetti C, Malcovati M, Chiolerio F, Seccamani E. Three-step monoclonal antibody tumor targeting in carcinoembryonic antigen-positive patients. *Cancer Research*. 1991;51(21):5960-5966.

Reichard KW, Lorence RM, Cascino CJ, Peeples ME, Walter RJ, Fernando MB, Reyes HM, Greager JA. Newcastle disease virus selectively kills human tumor cells. *Journal of Surgical Research*. 1992;52(5):448-453.

Ruddon RW. *Cancer biology*. 4th ed. New York: Oxford University Press, 2007, xiv, 530 s.

Sandor F, Buc M. Toll-like receptors. I. Structure, function and their ligands. *Folia Biologica*. 2005;51(5):148.

Schulz WA. *Molecular biology of human cancers: an advanced student's textbook*. Norwell, MA: Springer, c2005, xvii, 508 s.

Singh R, Natarajan V. A rapid affinity method for isolation and characterization of sequence specific DNA binding factor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1987;147(1):65-70.

Skeel RT, Khleif SN. *Handbook of cancer chemotherapy*. Eighth Edition. Philadelphia: Wolter Kluwer, 2011, xiv, 875 s.

So EY, Ouchi T. The application of Toll like receptors for cancer therapy. *International Journal of Biological Sciences*. 2010;6(7):675.

Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. *TNM Classification of Malignant Tumours*; 7. Vydání, Vydavatel John Wiley & Sons, 2011, 336 s.

Soininen SK, Lehtolainen-Dalkilic P, Karppinen T, Puustinen T, Dragneva G, Kaikkonen MU, Jauhiainen M, Allart B, Selwood DL, Wirth T. Targeted delivery via avidin fusion protein: Intracellular fate of biotinylated doxorubicin derivative and cellular uptake kinetics and biodistribution of biotinylated liposomes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012;47(5):848-856.

Stanley J. *Essentials of immunology: finest digital art in the known universe*. Editor Daniel Wade. Albany, NY: Delmar Thomson Learning, c2002, xxi, 538 s.

Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010;140(6):805-820.

Teicher BA. Tumor models in cancer research. 2nd ed. New York: Humana Press, c2011, xiv, 693 s.

Teramura Y, Iwata H. Cell surface modification with polymers for biomedical studies. *Soft Matter*. 2010;6(6):1081-1091.

Tosch C, Geist M, Ledoux C, Ziller-Remi C, Paul S, Erbs P, Corvaia N, Von Hoegen P, Balloul J, Haegel H. Adenovirus-mediated gene transfer of pathogen-associated molecular patterns for cancer immunotherapy. *Cancer Gene Therapy*. 2008;16(4):310-319.

Vineis P, Schatzkin A, Potter JD. Models of carcinogenesis: an overview. *Carcinogenesis*. 2010;31(10):1703-1709.

Vokes E, Golomb HM. Oncologic therapies. 2nd completely rev. and updated ed. New York: Springer, c2003, xiv, 659 s.

Vujošević B, Bokorov B. Radiotherapy: past and present. *Archive of Oncology*. 2010;18(4):140-142.

Wagener DJT. The history of oncology. Houten: Springer, 2009, 280 s.

Walker L, Kulomaa M, Bebok Z, Parker W, Allan P, Logan J, Huang Z, Reynolds R, King S, Sorscher E. Development of drug targeting based on recombinant expression of the chicken avidin gene. *Journal of Drug Targeting*. 1996;4(1):41-49.

Warnke R, Levy R. Detection of T and B cell antigens hybridoma monoclonal antibodies: a biotin-avidin-horseradish peroxidase method. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1980;28(8):771-776.

Wilchek M, Bayer EA, Livnah O. Essentials of biorecognition: The (strept) avidin–biotin system as a model for protein–protein and protein–ligand interaction. *Immunology Letters*. 2006;103(1):27-32.

Wilson BC. Photodynamic therapy for cancer: principles. *Canadian Journal of Gastroenterology= Journal Canadien de Gastroenterologie*. 2002;16(6):393.

Yi Y, Noh MJ, Lee KH. Current advances in retroviral gene therapy. *Current Gene Therapy*. 2011;11(3):218.

Zerega B, Camardella L, Cermelli S, Sala R, Cancedda R, Cancedda FD. Avidin expression during chick chondrocyte and myoblast development in vitro and in vivo: regulation of cell proliferation. *Journal of Cell Science*. 2001;114(8):1473-1482.

Internetové zdroje

www.clinicaltrials.gov

www.nofamerica.net

www.nofeurope.com

www.wiley.com